

1, 2 - ジクロロプロパンのラットを用いた
吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号 : 0435

CAS No. 78-87-5

2003年12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

標題

1,2 - ジクロロプロパンのラットを用いた吸入による 13 週間毒性試験

試験目的

1,2 - ジクロロプロパン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、1,2 - ジクロロプロパンをラットに 13 週間全身暴露し、その生体影響を検索した。

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「労働安全衛生法に基づく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調査課
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
所長 松島 泰次郎
神奈川県秦野市平沢 2445

1, 2 - ジクロロプロパンのラットを用いた
吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号：0435

本文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	
I-1 被験物質の性状等	
I-1-1 名称等	2
I-1-2 示性式及び分子量	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	
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	
II-1 投与	
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 投与方法、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 被験物質の濃度測定	5
II-2 動物管理	
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

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	7
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	8
II-3-6	血液生化学的検査	8
II-3-7	病理学的検査	9
II-4	数値処理と統計方法	
II-4-1	数値の取り扱いと表示	9
II-4-2	母数の取り扱い	10
II-4-3	統計方法	10
III	試験成績	
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	尿検査	11
III-6	血液学的検査	12
III-7	血液生化学的検査	12
III-8	病理学的検査	
III-8-1	剖検	13
III-8-2	臓器重量	13
III-8-3	病理組織学的検査	14
IV	考察及びまとめ	16
V	文献	20

要約

1,2 - ジクロロプロパンのがん原性を検索する目的で、ラットを用いた吸入による 2 年間 (104 週間) の試験を実施するにあたり、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、F344/DuCrj(Fischer)ラットを投与群 5 群、対照群 1 群の計 6 群 (各群雌雄各 10 匹) に分け、1,2 - ジクロロプロパンの投与濃度は、2000 ppm、1000 ppm、500 ppm、250 ppm 及び 125 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。また、投与期間中の死亡動物についても剖検観察及び病理組織学的検査を行った。

1,2 - ジクロロプロパンの投与の結果、2000 ppm 群の雌 1 匹が死亡した。他の群には死亡はみられなかった。一般状態の観察では、死亡動物を含め 1,2 - ジクロロプロパンの暴露の影響と思われる変化はみられなかったが、投与濃度に対応した体重増加の抑制が 500 ppm 以上の群の雄及び 1000 ppm 以上の群の雌で認められた。

血液学的検査では、貧血の傾向が 500 ppm 以上の群の雌雄で認められた。また、血小板数の増加が 1000 ppm 以上の群の雄と 2000 ppm 群の雌で、プロトロンビン時間の延長が 2000 ppm 群の雌でみられた。

血液生化学的検査では、総ビリルビンの増加が 2000 ppm 群の雄と 1000 ppm 以上の群の雌で、 γ - GTP の増加が 2000 ppm 群の雄と 1000 ppm 以上の群の雌で、カリウムの増加が 500 ppm 以上の群の雄及び 1000 ppm 以上の群の雌でみられた。また、グルコースの減少が 2000 ppm 群の雄で、アルブミン、A/G 比、トリグリセライドの増加が 1000 ppm 以上の群の雌で、グルコースの増加が 250 ppm 以上の群の雌でみられた。尿検査では、ケトン体の陽性例の増加が 2000 ppm 群の雄でみられた。

剖検観察では、2000 ppm 群の雌の死亡動物には、肝臓、胸腺、肺に変化がみられ、生存動物には変化がみられなかった。臓器重量では、脾臓の重量増加が 1000 ppm 以上の群の雌雄で、肝臓の重量増加が 1000 ppm 以上の群の雌で、腎臓の重量増加が 2000 ppm 群の雌で認められた。病理組織学的検査では、2000 ppm 群の雌の死亡動物には、肝臓、胸腺、肺、鼻腔、脾臓、骨髄、副腎に変化がみられた。生存動物は雌雄ともに、肝臓、鼻腔、脾臓、骨髄及び副腎に変化がみられ、肝臓、副腎の変化は 1000 ppm 以上の群で、骨髄の変化は 500 ppm 以上の群で、脾臓の変化は 250 ppm 以上の群で、鼻腔の変化は全投与群で観察された。

以上の結果から、1,2 - ジクロロプロパンのラットに対する 13 週間吸入暴露による最小毒性量 (LOAEL) は、鼻腔への影響をエンドポイントとして 125 ppm であると考えられた。また、吸入による 2 年間のがん原性試験の最大耐量を 500 ppm と推定し、がん原性試験の投与濃度は、500 ppm を最高濃度とし、以下 200 ppm、80 ppm (公比 2.5) 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 : 1,2 - ジクロロプロパン (1,2 - Dichloropropane)
別 名 : 塩化プロピレン、プロピレンジクロライド、二塩化プロピレン
CAS No. : 78-87-5

I-1-2 示性式及び分子量 (文献 1)

示 性 式 : $\text{CH}_3\text{CHClCH}_2\text{Cl}$
分 子 量 : 112.99

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 無色透明の液体
沸 点 : 96.4°C
蒸 気 圧 : 53.3mmHg (25°C)
比 重 : 1.159 (25°C)
溶 解 性 : 水に難溶、エタノール、エーテルに易溶
保存条件 : 室温で暗所に保管

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : LDL5937
製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
グ レ ー ド : 和光特級
純 度 : 95%以上 (和光純薬工業 (株) 検査成績書データ)

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、そのマススペクトルを質量分析計 (Hitachi M-80B) により測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) により測定し、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示し、また、赤外吸収スペクトルも文献値 (文献 3) と同じ波数にピークが認められ、被験物質は 1,2 - ジクロロプロパンであることを確認した。

なお、それらの結果は、APPENDIX K1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質の安定性は、投与開始前及び投与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 (Hewlett Packard 5890A) により測定し、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、測定結果に差はみられず、被験物質は投与期間中、安定であることを確認した。

なお、それらの結果は、APPENDIX K2 に示した。

I-4 試験動物

動物は 1,2 - ジクロロプロパン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 F344/DuCrj (Fischer)ラット(SPF)の雌雄を使用した。なお、がん原性試験で使用する動物は、遺伝的に安定していること、腫瘍の自然発生率が低いこと、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の原因から、F344/DuCrj(Fischer)ラットと決定している。

ラット雌雄各 75 匹を生後 4 週齢で導入し (導入時体重範囲、雄:54~62g、雌:49~57g)、各 1 週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で異常を認めない動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 60 匹 (群構成時体重範囲、雄:117~130g、雌:90~99g) を選別し、試験に用いた。

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 1,2 - ジクロロプロパン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。なお、対照群は新鮮空気による換気のみとした。

II-1-3 投与期間

投与期間は 1 日 6 時間、1 週 5 日の暴露（祝祭日は暴露なし）で 13 週間とし、計 62 回の暴露を行った。

II-1-4 投与濃度

2000 ppm、1000 ppm、500 ppm、250 ppm 及び 125 ppm の 5 段階（公比 2）の投与濃度を設定した。

II-1-5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与方法は労働環境における暴露経路に合わせ、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 13 週間とした。

投与濃度は 2 週間の予備試験（試験番号 0424）の結果（文献 4）をもとに決定した。2 週間試験は 2000 ppm、1000 ppm、500 ppm、250 ppm 及び 125 ppm（公比 2）の濃度で行った。その結果、動物の死亡はみられなかった。2000 ppm 群では、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量及び病理組織学的検査に変化がみられたが、雄の体重増加の抑制及び病理組織学的検査でみられた鼻腔の変化（嗅上皮の萎縮）以外はいずれも軽度なものであった。また、2000 ppm 群の雄の体重は投与 2 週目には対照群と同程度の増加がみられること、一般状態の観察では特記すべき所見がみられないこと、さらに、鼻腔の変化は、その所見自体が直接、動物の生死に関わるものではないと考えられることから、13 週

間試験においても 2000 ppm は動物が十分、耐え得る濃度と考えられた。これらの結果より、13 週間試験の投与濃度は 2000 ppm を最高濃度とし、以下 1000 ppm、500 ppm、250 ppm、125 ppm（公比 2）とした。

II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質の発生方法は FIGURE 1 に示した。被験物質供給装置（柴田科学株式会社 特注）の発生容器内の 1,2 - ジクロロプロパン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 1,2 - ジクロロプロパンの蒸気を循環式恒温槽で一定温度に冷却した。次に、清浄空気（希釈空気）と混合して、再加熱し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を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 1,2 - ジクロロプロパン濃度はガスクロマトグラフにより監視し、その濃度データをもとに設定濃度になるように 1,2 - ジクロロプロパンの吸入チャンバーへの供給量を調節した。

II-1-7 被験物質の濃度測定

吸入チャンバー内の 1,2 - ジクロロプロパンの濃度は、自動サンプリング装置付のガスクロマトグラフ（Shimadzu GC-14B）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 APPENDIX L1 に示した。各投与群の 1,2 - ジクロロプロパン濃度は、その平均値と設定濃度の差は 0.3%以内、変動係数（標準偏差／平均値×100%）は 0.6%以内であり、高い精度でチャンバー内の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。

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	10 匹 (1001~1010)	10 匹 (2001~2010)
1	125 ppm 群	10 匹 (1101~1110)	10 匹 (2101~2110)
2	250 ppm 群	10 匹 (1201~1210)	10 匹 (2201~2210)
3	500 ppm 群	10 匹 (1301~1310)	10 匹 (2301~2310)
4	1000 ppm 群	10 匹 (1401~1410)	10 匹 (2401~2410)
5	2000 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、発育順調で異常を認めない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）。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間は色素塗布により、投与期間は耳パンチにより行い、またケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物はバリア区域（AC-6 空調エリア）内の独立した室（604 室）に收容し、飼育室に試験番号、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

動物は検疫室で 1 週間の検疫飼育を行った後、吸入チャンバー内に移動し、馴化を開始した。馴化期間も 1 週間とし、投与開始日の前日に群構成を行った。投与期間中は吸入チャンバー内で飼育した。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動物ケージを次頁に示した。検疫室、吸入試験室の温度、湿度については測定値（平均値±標準偏差）を（ ）内に記した。また、吸入チャンバー内環境の計測結果を APPENDIX L2 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は、動物の健康状態に影響を与える

ような変化は認められなかった。

	検疫室 (606 室)	吸入試験室 (604 室)	吸入チャンバー内	
			馴化期間	投与期間
温度	23±2℃ (22.8±0.0℃)	21±2℃ (21.0±0.2℃)	20～24℃	
湿度	55±15% (53±2%)	55±15% (58±2%)	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	15～17 回/時		12±1 回/時	
圧力	—	—	0～-15 ×10Pa	
ケージへの動物 の収容方法	単飼	—	単飼	単飼
ケージの材質・ 形状	ステンレス製 2 連網ケージ	—	ステンレス製 6 連網ケージ	ステンレス製 5 連網ケージ
ケージ寸法 1 匹当り (mm)	W170 D294 H176	—	W125 D216 H176	W150 D216 H176

飼料は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。ただし、定期解剖日前日の夕方からは給餌しなかった。

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、試験に使用した飼料の栄養成分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入手し、保管した。飼料中の夾雑物については(財)日本食品分析センター（東京都渋谷区元代々木町 52-1）の分析データを入手し、また、飲水については(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）に分析を委託し、それぞれ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後、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

全動物について、生死の確認を毎日 1 回行った。また、一般状態の詳細観察は、検疫及び馴化期間中は検疫開始日（導入時）、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日（群構成時）に行い、投与期間中は週 1 回、暴露開始前に行った。

II-3-2 体重測定

全動物について、検疫及び馴化期間中は検疫開始日（導入時）、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日（群構成時）に行い、投与期間中は週 1 回、暴露開始前に行った。また、死亡動物及び定期解剖動物の搬出時にも体重を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

全動物について、週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から摂餌量を算出した。

II-3-4 尿検査

投与期間の最終週に採尿可能な動物から、新鮮尿を採取し、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX M1 に示した。

[検査項目] pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、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及びクエン酸ナトリウム入り採血管（下記*印検査項目）に採血した。EDTA-2 カリウム入り採血管の血液は全血を用いて、クエン酸ナトリウム入り採血管の血液は、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 M1 に示した。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食させた。

[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、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、網赤血球比、プロトロンビン時間*、活性化部分トロンボプラスチン時間*、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 M1 に示した。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食させた。

[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、GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、CPK、尿素

窒素、クレアチニン、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 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

2 臓器重量

定期解剖動物について下記に示した各臓器の湿重量（実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の定期解剖時の体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

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 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定し、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。

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、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）

II-4 数値処理と統計方法

II-4-1 数値の取り扱いと表示

各数値データは計測機器の精度に合わせて表示した。

チャンバー内の被験物質濃度については ppm を単位として、小数点以下第 3 位まで計測し、小数点以下第 2 位を四捨五入し、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、整数値の 1 の位まで計測し、表示した。

摂餌量については g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで計測し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を計測期間の日数で除し 1 日あ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、血液生化学的検査は APPENDIX M2 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 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、測定した動物数を母数とした。

尿検査は投与最終週に行い、採尿した動物数を母数とした。

血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量の測定は、定期解剖時まで生存した全動物を対象とし、検査動物数または測定動物数を母数とした。

剖検は、全動物数を母数とした。

病理組織学的検査は、欠損臓器を除いた動物数を母数とした。

II-4-3 統計方法

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等を基準として 1~4 にグレード分けし、 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。

なお、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

動物の生死状況を TABLE 1, 2 に示した。

<雄>

各群とも死亡はみられなかった。

<雌>

投与期間の 12 週目 (12 週-4 日) に 2000 ppm 群の 1 匹が死亡した。他の群には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 APPENDIX A1 に示した。

雌雄とも、被験物質の暴露の影響と思われる変化はみられなかった。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE 1, 2、FIGURE 2, 3 及び APPENDIX B1, B2 に示した。

<雄>

500 ppm 以上の群で、投与濃度に対応した体重増加の抑制が認められた。

なお、125 ppm 群の体重も対照群に比べて、やや低値であったが、同群の体重は投与期間を通じて、250 ppm 群より低値であり、投与濃度に対応した変化ではなかった。

<雌>

1000 ppm 以上の群で、投与濃度に対応した体重増加の抑制が認められた。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量 (1 日 1 匹あたり) を TABLE 3, 4 及び APPENDIX C1, C2 に示した。

雌雄とも、2000 ppm 群で摂餌量が低値であった。

Ⅲ-5 尿検査

検査の結果を TABLE 5 及び APPENDIX D1, D2 に示した。

<雄>

ケトン体の陽性例の増加が 2000 ppm 群でみられた。

その他、pH の変化が 250 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。

<雌>

被験物質の暴露の影響と思われる変化はみられなかった。

Ⅲ-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 6, 7 及び APPENDIX E1, E2 に示した。

<雄>

赤血球数とヘモグロビン濃度の減少が 500 ppm 以上の群で、ヘマトクリット値の減少が 1000 ppm 以上の群で、さらに、網赤血球比の増加が 1000 ppm 以上の群でみられ、500 ppm 以上の群で貧血の傾向が認められた。これら赤血球数等の変化により、MCV、MCH、MCHC の値が 500 ppm 以上の群で変化した。また、血小板数の増加が 1000 ppm 以上の群でみられた。

その他、活性化部分トロンボプラスチン時間の変化が 2000 ppm 群でみられたが、時間の短縮であり、毒性学的意義は不明であった。

<雌>

赤血球数の減少が 500 ppm 以上の群で、ヘモグロビン濃度の減少が 1000 ppm 以上の群で、ヘマトクリット値の減少が 2000 ppm 群で、さらに、網赤血球比の増加が 500 ppm 以上の群でみられ、500 ppm 以上の群で貧血の傾向が認められた。これら赤血球数等の変化により、MCV、MCH、MCHC の値が 500 ppm 以上の群で変化した。また、血小板数の増加とプロトロンビン時間の延長が 2000 ppm 群でみられた。

Ⅲ-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 8, 9 及び APPENDIX F1, F2 に示した。

<雄>

総ビリルビンの増加及びグルコースの減少が 2000 ppm 群でみられた。酵素系では、 γ -GTP の増加が 2000 ppm 群でみられた。電解質では、カリウムの増加が 500 ppm 以上の群でみられた。

その他、総蛋白とアルブミンの増加が 1000 ppm 群で、総コレステロールの減少が 1000 ppm 以上の群で、トリグリセライドの減少が 500 ppm 群を除く全投与群で、リン脂質の減少が 1000 ppm 群でそれぞれみられたが、投与濃度との対応が明確ではなく、被験物質との関連は不明であった。また、GOT、GPT の変化が 1000 ppm 以上の群で、ALP の変化が 1000 ppm 群でみられたが、いずれも低下性の変化であり毒性学的意義は不明であった。

<雌>

アルブミン、A/G比、総ビリルビン、トリグリセライドの増加が 1000 ppm 以上の群で、グルコースの増加が 250 ppm 以上の群でみられた。酵素系では、 γ -GTP の増加が 1000 ppm 以上の群でみられた。また、GOT、GPT、LDH の高値が 2000 ppm 群でみられたが、同群ではこの 3 項目について極めて高い値を示した動物が 3 匹おり、その結果、この 3 項目の平均値が高値となった。電解質では、カリウムの増加が 1000 ppm 以上の群でみられた。

その他、GOT、GPT の変化が 1000 ppm 群と 500 ppm 群でみられたが、いずれも低下性の変化であり毒性学的意義は不明であった。

Ⅲ-8 病理学的検査

Ⅲ-8-1 剖検

剖検所見を APPENDIX G1～G3 に示した。

2000 ppm 群で死亡した雌（1 匹）は、肝臓に小葉構造の明瞭化、胸腺と肺に赤色斑がみられた。

生存動物には、雌雄とも被験物質の影響と思われる所見は認められなかった。

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 10, 11 及び APPENDIX H1, H2（実重量）、APPENDIX I1, I2（体重比）に示した。

<雄>

脾臓の実重量と体重比の高値が 1000 ppm 以上の群にみられ、1000 ppm 以上の群で脾臓の重量増加が認められた。

その他、投与群では脾臓以外の器官、臓器で実重量の低値、あるいは体重比の高値がみられたが、それらは各投与群の解剖時体重の低値によるものと思われた。

<雌>

脾臓と肝臓の実重量と体重比の高値が 1000 ppm 以上の群にみられ、1000 ppm 以上の群で脾臓と肝臓の重量増加が認められた。また、腎臓の実重量と体重比の高値が 2000 ppm 群にみられ、2000 ppm 群で腎臓の重量増加が認められた。

その他、500 ppm 群の肝臓、1000 ppm 群と 500 ppm 群の腎臓でも、体重比の高値がみられたが、それらの実重量は対照群と同程度であり、これらの変化が解剖時体重の低値によるものか、被験物質の直接的な影響かは不明であった。また、投与群では上記以外の器官、臓器で実重量の低値、あるいは体重比の高値がみられたが、それらは各投与群の解剖時体重の低値によるものと思われた。

III-8-3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE 12～14 及び APPENDIX J1～J3 に示した。

肝臓、鼻腔、脾臓、骨髄、副腎及び腎臓に被験物質の暴露の影響と考えられる所見が観察された。

<雄>

[2000 ppm 群]

肝臓に小葉中心性の肝細胞の腫脹と壊死、セロイド沈着がみられた。鼻腔には、呼吸上皮の過形成と炎症、嗅上皮の萎縮、呼吸上皮化生及び壊死がみられた。脾臓にはヘモジデリン沈着と髓外造血の亢進、骨髄には造血亢進がみられた。また、副腎には脂肪変性がみられた。なお、腎臓では好酸体の出現の減少がみられた。

[1000 ppm 群]

鼻腔に呼吸上皮の過形成と炎症、嗅上皮の萎縮、呼吸上皮化生、壊死及び配列不整がみられた。脾臓にはヘモジデリン沈着と髓外造血の亢進、骨髄には造血亢進がみられた。

[500 ppm 群]

鼻腔に呼吸上皮の過形成と炎症、嗅上皮の萎縮、呼吸上皮化生及び壊死がみられた。また、脾臓にヘモジデリン沈着、骨髄に造血亢進がみられた。

[250 ppm 群]

鼻腔に呼吸上皮の過形成と炎症、嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生がみられた。

[125 ppm 群]

鼻腔に呼吸上皮の過形成、嗅上皮の萎縮と配列不整がみられた。

<雌>

[2000 ppm 群]

死亡動物は、肝臓に小葉中心性の壊死と脂肪変性、鼻腔に呼吸上皮の炎症と過形成及び嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生、肺に鬱血、脾臓にヘモジデリン沈着、骨髄に造血亢進、副腎に脂肪変性、胸腺に出血がみられた。

生存動物では、肝臓に小葉中心性の肝細胞の腫脹、壊死及び脂肪変性、セロイド沈着がみられた。鼻腔には、呼吸上皮の過形成と炎症、嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生がみられた。脾臓にはヘモジデリン沈着と髓外造血の亢進、骨髄には造血亢進がみられた。また、副腎には脂肪変性がみられた。

[1000 ppm 群]

鼻腔に呼吸上皮の過形成と炎症、嗅上皮の萎縮、呼吸上皮化生及び壊死がみられた。脾臓にはヘモジデリン沈着と髓外造血の亢進、骨髄には造血亢進がみられた。また、副腎に脂肪変性、肝臓に小葉中心性の肝細胞の腫脹がみられた。

[500 ppm 群]

鼻腔に呼吸上皮の過形成、嗅上皮の萎縮、呼吸上皮化生、壊死及び配列不整がみられた。

また、脾臓にヘモジデリン沈着と髄外造血の亢進がみられた。

[250 ppm 群]

鼻腔に呼吸上皮の過形成、嗅上皮の萎縮、呼吸上皮化生、壊死及び配列不整がみられた。
また、脾臓にはヘモジデリン沈着がみられた。

[125 ppm 群]

鼻腔に呼吸上皮の過形成と嗅上皮の萎縮がみられた。

その他の器官、組織については、被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

IV 考察及びまとめ

1,2 - ジクロロプロパンのがん原性を検索する目的で F344/DuCrj (Fischer)ラットを用いた吸入による2年間(104週間)の試験を実施するにあたり、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、1,2 - ジクロロプロパンの投与濃度は、2000 ppm、1000 ppm、500 ppm、250 ppm 及び 125 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。また、投与期間中の死亡動物についても剖検観察及び病理組織学的検査を行った。

(1) 用量-反応関係

1,2 - ジクロロプロパンの投与の結果、投与期間の12週目に2000 ppm 群の雌1匹が死亡した。他の群には死亡はみられなかった。一般状態の観察では、死亡動物を含め1,2 - ジクロロプロパンの暴露の影響と思われる変化はみられなかったが、投与濃度に対応した体重増加の抑制が500 ppm 以上の群の雄及び1000 ppm 以上の群の雌で認められた。摂餌量は、2000 ppm 群の雌雄で低値であった。

血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び網赤血球比等の変化が500 ppm 以上の群の雌雄にみられ、貧血の傾向が認められた。また、血小板数の増加が1000 ppm 以上の群の雄と2000 ppm 群の雌でみられたが、この変化は貧血に対する反応性変化と考えられた(文献6)。さらに、プロトロンビン時間の延長が2000 ppm 群の雌のみみられた。病理組織学的検査では、2000 ppm 群の雌の肝臓に傷害性の変化がみられており、プロトロンビン時間の延長はその変化に関連したものと考えられた(文献7)。

血液生化学的検査では、総ビリルビンの増加が2000 ppm 群の雄と1000 ppm 以上の群の雌でみられた。また、グルコースの減少が2000 ppm 群の雄で、アルブミン、A/G比、トリグリセライドの増加が1000 ppm 以上の群の雌で、グルコースの増加が250 ppm 以上の群の雌でみられた。酵素系では、 γ - GTPの増加が2000 ppm 群の雄と1000 ppm 以上の群の雌でみられ、電解質では、カリウムの増加が500 ppm 以上の群の雄及び1000 ppm 以上の群の雌でみられた。なお、GOT、GPT、LDHの3項目に極めて高い値を示した動物が、2000 ppm 群の雌3匹にみられた。

尿検査では、ケトン体の陽性例の増加が2000 ppm 群の雄でみられた。

剖検観察では、2000 ppm 群で死亡した雌(1匹)には、肝臓に小葉構造の明瞭化、胸腺と肺に赤色斑がみられたが、生存動物(定期解剖動物)には1,2 - ジクロロプロパンの影響と思われる所見は認められなかった。

臓器重量では、脾臓の重量増加が 1000 ppm 以上の群の雌雄で認められ、この変化は脾臓の病理組織学的変化に対応した変化と考えられた。さらに、肝臓の重量増加が 1000 ppm 以上の群の雌で、腎臓の重量増加が 2000 ppm 群の雌でそれぞれ認められた。

病理組織学的検査では、2000 ppm 群の雌の死亡動物（1匹）には、肝臓に小葉中心性の壊死と脂肪変性、胸腺に出血、肺に鬱血、鼻腔に呼吸上皮の炎症、過形成、嗅上皮の萎縮、呼吸上皮化生、脾臓にヘモジデリン沈着、骨髄に造血亢進、副腎に脂肪変性がみられた。この動物の死因は、肝臓の壊死と脂肪変性の程度が他の臓器の変化に比較して強く、肝臓の傷害が主因と推察されるが、脾臓でのヘモジデリン沈着も重度であり、血液への影響も加わっている可能性がある。

生存動物の病理組織学的検査では、2000 ppm 群で雌雄とも肝臓、鼻腔、脾臓、骨髄及び副腎に 1,2 - ジクロロプロパンの暴露の影響が観察された。肝臓には小葉中心性の肝細胞の腫脹、壊死、セロイドの沈着等の所見がみられた。小葉中心性の壊死は雄 1 匹と雌 3 匹に発生しており、発生動物数は少ないものの、死亡動物と同様に暴露により肝細胞に傷害が起きていることが示された。また、セロイドの沈着が雄 2 匹と雌 6 匹にみられた。セロイドは変性や壊死肝細胞に由来すると考えられている色素であり（文献 8）、その沈着は肝細胞の壊死が認められない動物にも、過去に肝細胞の傷害が起きていたことを示唆している。なお、血液生化学的検査で肝細胞の傷害を示すパラメーターである GOT、GPT、LDH に高値を示していた雌 3 匹には、小葉中心性の壊死またはセロイドの沈着がみられた。一方、小葉中心性の肝細胞の腫脹が雌雄とも多くの動物に認められ、その程度は雄が軽度であったのに対し、雌は中等度の変化を示す動物が多かった。小葉中心性の肝細胞の腫脹はチトクローム P-450 等の薬物代謝酵素の誘導に伴って観察される所見である（文献 9）。また、血液生化学的検査では γ - GTP の増加が雌雄とも認められており、その程度は雄に比較して雌で顕著であった。 γ - GTP は胆汁鬱滞や肝炎の発生に伴って上昇するが、肝臓での薬物代謝酵素の上昇と併行して認められることも知られており（文献 10、11）、本試験における γ - GTP の変化は、肝細胞の腫脹に伴って生じた可能性もある。

鼻腔には雌雄とも多くの動物で呼吸上皮に炎症と過形成、嗅上皮に萎縮や呼吸上皮化生等の変化がみられ、1,2 - ジクロロプロパンの吸入により呼吸上皮と嗅上皮の傷害が起きたことが示された。

脾臓には、雌雄ともヘモジデリン沈着が認められており、破壊された赤血球の脾臓での処理の亢進が起きていることが示唆された。これに対し、脾臓の髄外造血と骨髄の造血には亢進が認められており、貧血に対する修復性の造血反応の亢進が起きていたと考えられる。従って、血液学的検査でみられた貧血傾向の原因は、赤血球造血の抑制ではなく、赤血球の溶血や脆弱化による脾臓での破壊の促進によると推察される。また、総ビリルビンの増加も赤血球の溶血や脾臓での破壊の促進に伴う変化と考えられるが、肝臓からのビリルビンの排泄の抑制による可能性もある（文献 9）。

その他、副腎には雌の多くの動物に脂肪変性が観察された。

1000 ppm 群では、鼻腔（呼吸上皮の炎症、過形成、嗅上皮の萎縮や呼吸上皮化生等）、脾臓（ヘモジデリン沈着、髓外造血の亢進）及び骨髓（造血亢進）の変化が雌雄とも多くの動物にみられた。肝臓については、小葉中心性の肝細胞の腫脹が雌の 1 匹にみられたただけであった。また、副腎の脂肪変性は雌の 2 匹にのみ認められた。

500 ppm 群では、鼻腔の変化（呼吸上皮の過形成、嗅上皮の萎縮や呼吸上皮化生等）が雌雄とも多くの動物にみられた。脾臓については、雌にヘモジデリン沈着が全動物にみられたが、雄では 1 匹のみに認められたただけであった。

250 ppm 群では、鼻腔の変化（呼吸上皮の過形成、嗅上皮の萎縮等）が雌雄とも多くの動物にみられた。また、脾臓に軽度なヘモジデリン沈着が雌の 4 匹にみられた。

125 ppm 群でも、鼻腔の変化（呼吸上皮の過形成、嗅上皮の萎縮等）が雌雄とも多くの動物にみられたが、その程度はいずれも軽度であった。脾臓には変化がみられなかった。

(2) 無毒性量 (NOAEL) / 最小毒性量 (LOAEL)

以上のように、1,2 - ジクロロプロパンのラットへの 13 週間吸入暴露により、雌雄とも最低投与群の 125 ppm 群を含む全投与群に鼻腔の変化が認められた。従って、本試験における 1,2 - ジクロロプロパンのラットに対する 13 週間吸入暴露による最小毒性量 (LOAEL) は、鼻腔への影響をエンドポイントとして 125 ppm であると考えられた。

(3) 他文献との比較

Nitschke らは、F344 ラットに 150、50、15 ppm の濃度の 1,2 - ジクロロプロパンを、6 時間/1 日、5 日間/週で 13 週間、暴露した（文献 12）。その結果、動物の死亡はみられなかったが、150 ppm 群で体重増加の抑制（雄：対照群の 90%、雌：同 92%）がみられた。血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査では変化はみられなかったが、病理組織学的検査では、全投与群で鼻腔の呼吸上皮に過形成がみられた。また、50 ppm 以上の群では鼻腔の嗅上皮に僅かな変性、150 ppm 群では咽喉の炎症も認められた。

本試験では、体重増加の抑制がみられたのは 500 ppm 以上の群であった。125 ppm 群の雄の体重は対照群に比べてやや低値であったが、投与濃度に対応した変化ではなかった。125 ppm 群は、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査では変化はみられなかったが、鼻腔の変化（呼吸上皮の過形成、嗅上皮の萎縮等）が雌雄とも多くの動物にみられた。咽喉には変化がみられなかった。

(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 2000 ppm 群で雌が 1 匹死亡した。1000 ppm 以下の群では死亡がみられなかったが、500 ppm 以上の群の雄及び 1000 ppm 以上の群の雌で体重増加の抑制がみられ、500 ppm 以上の群の雌雄で貧血の傾向がみられた。病理組織学的検査では、1000 ppm 以上の群

で肝臓、副腎、500 ppm 以上の群で骨髄、250 ppm 以上の群で脾臓、全投与群で鼻腔に変化がみられた。これらの結果より、1000 ppm 群は雄の体重増加の抑制（最終体重：対照群の 84%）が大きく、がん原性試験の最高濃度としては高すぎると思われた。500 ppm 群では体重増加の抑制（雄）及び貧血傾向がみられ、鼻腔、脾臓、骨髄に病理組織学的変化がみられたが、雄の体重増加の抑制（最終体重：対照群の 92%）及び貧血は軽度であり、鼻腔と脾臓等の所見自体は直接、動物の生死に関わるものではないと考えられることから、500 ppm が 2 年間のがん原性試験における最大耐量であると考察した。がん原性試験の最低濃度は、125 ppm 群においても鼻腔の変化が認められることから、125 ppm 未満で現在の許容濃度 75 ppm (ACGIH-TLV,TWA) を考慮した濃度設定が望ましいと考えた。以上のことから、がん原性試験は最高濃度を 500 ppm とし、以下 200 ppm、80 ppm（公比 2.5）と決定した。

V 文献

1. U.S. National Library of Medicine, Specialized Information Services 2002. 1,2-Dichloropropane, Chemical/Physical Properties. Hazardous Substances Data Bank(HSDB). Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/BAA1Qaifr:1:cpp>[accessed 8 January 2003].
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). 2001. 1,2 - ジクロロプロパン, 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. 2003. 1,2 - ジクロロプロパン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. 宮地勇人. 2002. 血液細胞アトラス-2, 写真と検査データでみる血液細胞の実践的読み方 (東海大学医学部附属病院臨床検査科血液検査室 編). 東京 : 東海大学出版会, 13-14.
7. 谷本義文. 1982 .血液学 ヒトと動物の接点. 東京 : 清至書院, 822-832.
8. 横山武. 1983. 肝病理アトラス-針生検を主とした-. 東京 : 文光堂.
9. Popp JA, Cattley RC. 1991. Hepatobiliary system. In: Handbook of Toxicologic Pathology (Haschek WM, Rousseaux CG, eds). San Diego, CA : Academic Press, 279-314.
10. 山本俊夫, 足立幸彦. 1975. 薬物代謝酵素と体質性黄疸. 薬物と肝臓 (織田敏次, 市田文弘, 山中正巳 編). 東京 : 中外医学社, 265-286.

11. Plaa GL, Hewitt WR. 1989. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In: Principles and Methods of Toxicology, 2nd ed (Hayes AW, ed). New York, NY : Raven Press, 599-628.

12. U.S. EPA. 2003. 1,2-Dichloropropane (CASRN 78-87-5). Integrated Risk Information System. Available: <http://www.epa.gov/iris/subst/0601.htm> [accessed 8 January 2003].