クロロホロム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

試験番号

2 週間：ラット/0089；マウス/0090

13 週間：ラット/0097；マウス/0098

平成 6 年 2 月 25 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

クロロホルム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

本　　文

目　次　　頁

要旨 1

クロロホルムについて 3

Ⅰ　試験材料

Ⅰ－1　被験物質の使用ロット等 7

Ⅰ－2　被験物質の同一性・安定性 7
Ⅰ－2－1　同一性 7
Ⅰ－2－2　安定性 7

Ⅰ－3　試験動物 7

Ⅱ　試験方法

Ⅱ－1　投与

Ⅱ－1－1　投与経路、投与方法及び投与期間 9
Ⅱ－1－2　投与濃度 9
Ⅱ－1－3　被験物質の発生方法と濃度調整 10
Ⅱ－1－4　被験物質の濃度測定 10

Ⅱ－2　動物管理
Ⅱ－2－1　群分け及び個体識別方法 11
Ⅱ－2－2　飼育条件 11

Ⅱ－3　観察・検査項目及び方法
Ⅱ－3－1　動物の一般症状の観察 12
Ⅱ－3－2　体重測定 12
Ⅱ－3－3　摂餌量測定 12
Ⅱ－3－4　血液学的検査 12
Ⅱ－3－5　血液生化学的検査 12
Ⅱ－3－6　尿検査 13
Ⅱ－3－7　病理学的検査 13

Ⅱ－4　数値処理と統計学的方法
Ⅱ－4－1　数値の取扱いと表示 14
Ⅱ－4－2　母数の取扱いと表示 14
Ⅱ－4－3　統計方法 15

Ⅱ－5　試資料の保管 15

Ⅲ　試験成績

Ⅲ－1　ラットを用いた2週間試験
Ⅲ－1－1 動物の状態観察 16
(1) 生死状況 16
(2) 一般状態 16
(3) 体重 16
(4) 摂餌量 16
Ⅲ－1－2 血液学的検査・血液生化学的検査 16
(1) 血液学的検査 16
(2) 血液生化学的検査 17
Ⅲ－1－3 病理学的検査 17
(1) 剖検 17
(2) 病理組織学的検査 17
(2)-1 死亡例 17
(2)-2 生存例 18

Ⅲ－2　ラットを用いた13週間試験
Ⅲ－2－1 動物の状態観察 19
(1) 生死状況 19
(2) 一般状態 19
(3) 体重 19
(4) 摂餌量 19
Ⅲ－2－2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査 19
(1) 血液学的検査 19
(2) 血液生化学的検査 20
(3) 尿検査 20
Ⅲ－2－3 病理学的検査 20
(1) 剖検 20
(2) 臓器重量 20
(3) 病理組織学的検査 21

Ⅲ－3　マウスを用いた2週間試験
Ⅲ－3－1 動物の状態観察 23
(1) 生死状況 23
(2) 一般状態 23
(3) 体重 23
(4) 摂餌量 23
Ⅲ－3－2 血液学的検査・血液生化学的検査 23
(1) 血液学的検査 23
(2) 血液生化学的検査 23
Ⅲ－3－3 病理学的検査 24
(1) 剖検 24
(2) 病理組織学的検査 24
(2)-1 死亡例 24
(2)-2 生存例 25

Ⅲ－4　マウスを用いた１３週間試験
Ⅲ－4－1 動物の状態観察 26
（1）生死状況 26
（2）一般状態 26
（3）体重 26
（4）摂餌量 26
Ⅲ－4－2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査 .. 26
（1）血液学的検査 26
（2）血液生化学的検査 27
（3）尿検査 27
Ⅲ－4－3 病理学的検査 27
（1）剖検 27
（2）臓器重量 27
（3）病理組織学的検査 28
（3）-1 死亡例 28
（3）-2 生存例 28

Ⅳ　考察及びまとめ 29

Ⅴ　文献 35

TABLES

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

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

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

TABLE 4 FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT(TWO-WEEK STUDY)

TABLE 5 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT(TWO-WEEK STUDY)

TABLE 6 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT (THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 7 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT (THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 8 FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT(THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 9 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT(THIRTEEN-WEEK STUDY)

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

TABLE 11 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE (TWO-WEEK STUDY)

TABLE 12 FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE(TWO-WEEK STUDY)

TABLE 13 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE(TWO-WEEK STUDY)

T A B L E S (CONTINUED)

TABLE 14 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 15 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 16 FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 17 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

F I G U R E S

FIGURE 1 CHLOROFORM VAPOR GENERATION SYSTEM AND INHALATION SYSTEM

FIGURE 2 BODY WEIGHT CHANGES : RAT:MALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 3 BODY WEIGHT CHANGES : RAT:FEMALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 4 FOOD CONSUMPTION : RAT:MALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 5 FOOD CONSUMPTION : RAT:FEMALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 6 BODY WEIGHT CHANGES : MOUSE:MALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 7 BODY WEIGHT CHANGES : MOUSE:FEMALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 8 FOOD CONSUMPTION : MOUSE:MALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 9 FOOD CONSUMPTION : MOUSE:FEMALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

PHOTOGRAPHS

PHOTOGRAPH 1 NASAL CAVITY, ATOROPHY OLFACTORY OF THE EPITHELIUM : A
AND EDEMA OF THE LAMINA PROPRIA : B
RAT, FEMALE, 1000ppm, ANIMAL NO.0089-2201
(H.E., X60)

PHOTOGRAPH 2 NASAL CAVITY, DISARRENGEMENT OF THE OLFACTORY EPITHELIUM : A
AND EDEMA OF THE LAMINA PROPRIA : B
RAT, MALE, 500ppm, ANIMAL NO.0089-1101
(H.E., X150)

PHOTOGRAPH 3 LUNG, CONGESTION,INFLAMMATION AND HYPERPLASIA OF PNEUMOCYT
RAT, FEMALE, Control, ANIMAL NO.0089-2306
(H.E., X150)

PHOTOGRAPH 4 LIVER, CENTROLOBULAR VACUOLIC CHANGE : A
RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO.0089-1202
(H.E., X150)

PHOTOGRAPH 5 KIDNEY, VACUOLIC CHANGE OF THE PROXIMAL TUBULE : A
RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO.0089-1204
(H.E., X60)

PHOTOGRAPH 6 KIDNEY, TUBULAR NECROSIS OF THE PROXIMAL TUBULE : A
RAT, FEMALE, 2000ppm, ANIMAL NO.0089-2302
(H.E., X300)

PHOTOGRAPH 7 NASAL CAVITY(OLFACTOLY EPITHELIUM), NECROSIS : A
MOUSE, MALE, 500ppm, ANIMAL NO.0090-1105
(H.E., X60)

PHOTOGRAPH 8 KIDNEY, TUBULAR NECROSIS : A AND DEGENERATION : B
OF THE PROXIMALE TUBULE
MOUSE, MALE(DEAD ANIMAL), 500ppm, ANIMAL NO.0090-1105
(H.E., X60)

PHOTOGRAPH 9 KIDNEY, TUBULAR NECROSIS OF THE PROXIMALE TUBULE : A
MOUSE, MALE(SCHEDULED SACRIFICED ANIMAL), 500ppm,
ANIMAL NO.0090-1106,
(H.E., X60)

PHOTOGRAPHS (CONTINUED)

PHOTOGRAPH 10 LIVER, CENTROLOBULAR SWELLING : A
MOUSE, MALE, 500ppm, ANIMAL NO.0090-1105
(H.E., X150)

PHOTOGRAPH 11 LIVER, CENTROLOBULAR VACUOLIC CHANGE : A
MOUSE, FEMALE, 1000ppm, ANIMAL NO.0090-2202
(H.E., X150)

PHOTOGRAPH 12 LIVER, CENTROLOBULAR NECROSIS WITH MINERALIZATION : A
MOUSE, FEMALE, 500ppm, ANIMAL NO.0090-2102
(H.E., X150)

PHOTOGRAPH 13 NASAL CAVITY(OLFACTORY EPITHELIUM), ATROPHY : A,
NECROSIS : B AND MINERALIZATION : C
RAT, MALE, 200ppm, ANIMAL NO.0097-1503
(H.E., X150)

PHOTOGRAPH 14 KIDNY, VACUOLIC CHANGE OF THE PROXIMAL TUBULE : A
RAT, MALE, 400ppm, ANIMAL NO.0097-1501
(H.E.,X150)

PHOTOGRAPH 15 LIVER, CENTROLOBULAR COLLAPSE : A AND DEPOSIT OF
CEROID(YELLOW PIGMENT) : B
RAT, MALE, 400ppm, ANIMAL NO.0097-1501
(H.E., X300)

PHOTOGRAPH 16 NASAL CAVITY(OLFACTORY EPITHELIUM), DEGENERATION : A
MOUSE, MALE, 100ppm, ANIMAL NO.0098-1408
(H.E., X300)

PHOTOGRAPH 17 NASAL CAVITY, EOSINOPHILIC CHANGE IN THE OLFACTORY EPITHELIUM : A
AND RESPIRATORY EPITHELIUM : B
MOUSE, FEMALE, 12ppm, ANIMAL NO.0098-2102
(H.E., X300)

PHOTOGRAPH 18 NASAL CAVITY(NASAL SEPTA), OSSEOUS METAPLASIA : A
MOUSE, FEMALE, 12ppm, ANIMAL NO.0098-2102
(H.E., X150)

PHOTOGRAPHS (CONTINUED)

PHOTOGRAPH 19 KIDNEY, TUBULAR NECROSIS : A OF THE PROXIMAL TUBULE
MOUSE, MALE, 200ppm, ANIMAL NO.0098-1509
(H.E., X300)

PHOTOGRAPH 20 LIVER, CENTROLOBULAR SWELLING : A
MOUSE, MALE, 200ppm, ANIMAL NO.0098-1509
(H.E., X150)

PHOTOGRAPH 21 LIVER, CENTROLOBULAR NECROSIS : A AND ATYPICAL CELL : B
MOUSE, FEMALE, 200ppm, ANIMAL NO.0098-2501
(H.E., X150)

PHOTOGRAPH 22 LIVER, ATYPICAL CELL : A
MOUSE, FEMALE, 100ppm, ANIMAL NO.0098-2401
(H.E., X300)

APPENDIXES

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

APPENDIX A 1-2 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX A 1-3 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX A 1-4 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX A 2-1 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX A 2-2 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX A 2-3 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX A 2-4 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX A 3-1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX A 3-2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX A 3-3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX A 3-4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX A 4-1 HEMATOLOGY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX A 4-2 HEMATOLOGY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX A 4-3 HEMATOLOGY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX A 4-4 HEMATOLOGY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX A 5-1 BIOCHEMISTRY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX A 5-2 BIOCHEMISTRY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX A 5-3 BIOCHEMISTRY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX A 5-4 BIOCHEMISTRY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX A 6-1 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 6-2 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 6-3 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 6-4 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 6-5 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 6-6 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 6-7 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX A 7-1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 7-2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MRIBUND ANIMALS

APPENDIX A 7-3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 7-4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 7-5 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 7-6 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MRIBUND ANIMALS

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

APPENDIX A 7-8 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 8-1 IDENTITY AND PURITY OF CHLOROFORM
PERFORMED AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(TWO-WEEK STUDY)

APPENDIX A 8-2 STABILITY OF CHLOROFORM
AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(TWO-WEEK STUDY)

APPENDIX A 9-1 CONCENTRATION OF CHLOROFORM IN INHALATION CHAMBER
(TWO-WEEK STUDY)

APPENDIX A 9-2 ENVIRONMENT OF INHALATION CHAMBER
(TWO-WEEK STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX B 1-1 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 1-2 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 1-3 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 1-4 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 2-1 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 2-2 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 2-3 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 2-4 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 3-1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 3-2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 3-3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 3-4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 4-1 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 4-2 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 4-3 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 4-4 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX B 5-1 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 5-2 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 5-3 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 5-4 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 6-1 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 6-2 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 6-3 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 6-4 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 7-1 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 7-2 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 7-3 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX B 7-4 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 7-5 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX B 8-1 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),ABSOLUTE
RAT:MALE

APPENDIX B 8-2 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),ABSOLUTE
RAT:FEMALE

APPENDIX B 8-3 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),ABSOLUTE
MOUSE:MALE

APPENDIX B 8-4 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),ABSOLUTE
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 9-1 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),RELATIVE
RAT:MALE

APPENDIX B 9-2 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),RELATIVE
RAT:FEMALE

APPENDIX B 9-3 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),RELATIVE
MOUSE:MALE

APPENDIX B 9-4 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),RELATIVE
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 10-1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY) RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 10-2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY) RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 10-3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY) MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX B 10-4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY) MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 10-5 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY) MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX B 11-1 IDENTITY AND PURITY OF CHLOROFORM PERFORMED AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY (THIRTEEN-WEEK STUDY)

APPENDIX B 11-2 STABILITY OF CHLOROFORM AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY (THIRTEEN-WEEK STUDY)

APPENDIX B 12-1 CONCENTRATION OF CHLOROFORM IN INHALATION CHAMBER (THIRTEEN-WEEK STUDY)

APPENDIX B 12-2 ENVIRONMENT OF INHALATION CHAMBER (THIRTEEN-WEEK STUDY)

APPENDIX C 1 METHODS FOR HEMATOLOGY,BIOCHEMISTRY AND URINALYSIS

APPENDIX C 2 UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY

APPENDIX D TWO-WEEK AND THIRTEEN-WEEK STUDIES

要旨

クロロホルムの吸入によるがん原性を検索する目的でラットとマウスを用いて全身暴露による2年間(104週間)の試験を実施するにあたり、その投与濃度を設定するために、本予備試験(2週間試験、13週間試験及びマウス雄を用いた追加試験)を実施した。

2週間試験及び13週間試験は、ラット、マウスとも被験物質投与群:5群、対照群:1群の6群構成で行った。投与濃度は2週間試験のラット、マウスの雌雄とも 8000ppm、4000ppm、2000ppm、1000ppm、500ppmとし、13週間試験のラットは雌雄とも 400ppm、200ppm、100ppm、50ppm、25ppmとし、マウスは雌雄とも 200ppm、100ppm、50ppm、25ppm、12ppmとし投与した。投与はクロロホルムを全身暴露することにより行った。観察・検査項目は、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(13週間試験)、剖検、臓器重量測定(13週間試験)及び病理組織学的検査を行った。

追加試験は、雄マウスを用い暴露期間の前期と後期で2段階に暴露濃度を変化させる4週間試験とし、動物の生死状況を観察した。第1段階の2週間は1群10匹、3群の構成でそれぞれ 5ppm、10ppm及び 15ppmの濃度で暴露を行った。第2段階の2週間は 5ppm群と 10ppm群の10匹を5匹づつに分け、それぞれ 30ppmまたは 90ppmで、15ppmの生存例は 90ppmの濃度で暴露を行った。

ラットでは2週間試験の結果、クロロホルム暴露により 2000ppm以上の群では雌雄とも全動物が死亡し、1000ppm群と 500ppm群でも体重増加の抑制、ならびに血液学的検査、血液生化学的検査及び病理組織学的検査に投与による影響が認められた。特に腎臓の病理組織学的変化は 500ppm群でも認められ、この濃度で13週間投与試験を実施すると動物の生存が危ぶまれるものと推察した。これらのことから13週間投与試験の暴露濃度は、最高暴露濃度を雌雄とも 500ppmより低い 400ppmとし、以下 200ppm、100ppm、50 ppm、25ppm(公比 2)に設定した。

13週間試験の結果、クロロホルム暴露により 200ppm以上の群では雌雄とも体重増加の顕著な抑制、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査の値の変化、ならびに鼻腔、肝臓及び腎臓の病理組織学的変化など投与による影響が強く現れ、これらの濃度でがん原性試験を実施すると動物の生存が危ぶまれるものと推察した。100ppm群でもほぼ同様の影響はみられたが、動物の生存率に影響を与える肝臓と腎臓の病理組織学的変化の程度は軽度であり、体重増加の抑制も10%程度であった。

これらのことから、ラットのがん原性試験での暴露濃度は、最高濃度を100ppmよりやや低い 90ppmとし、以下 30ppm、10ppm(公比 3)に設定した。

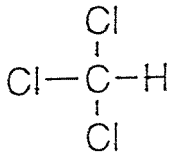
マウスでは2週間試験の結果、クロロホルム暴露により 1000ppm以上の群の雌雄と 500ppm群の雄で動物が死亡し、500ppm群の雌でも血液生化学的検査及び病理組織学的検査に投与による影響が認められた。これらの事から13週間投与試験の暴露濃度は、最高暴露濃度を雌雄とも 500ppmの1/2以下の 200ppmとし、以下 100ppm、50ppm、25ppm、12ppm(公比 2)に設定した。

13週間試験の結果、雄では最低暴露濃度の 12ppm群まで動物の死亡がみられた。これに対し、雌では全ての投与群で全例が生存し、体重への影響も軽度であり、100ppm以下の群ではがん原性試験で動物の生存率に影響を与えると考えられる肝臓の病理組織学的変化の程度も軽度であった。このように、クロロホルムの投与による影響は雄と雌の間で顕著な差がみられ、投与濃度の設定に困難な問題となった。そこで、雄の死亡状況を検討してみると、動物の死亡は全例とも暴露開始から7日以内であり、この期間生存し得た動物は13週間の暴露終了まで生存していた。このことから、あらかじめ低濃度のクロロホルムに暴露させると、動物にクロロホルムに対する耐性が生じ、その後、高濃度のクロロホルムを暴露しても動物が死亡しないことが期待された。この仮説を実証するために、雄マウスについて暴露期間の前期と後期で2段階に暴露濃度を変化させる28日間試験を実施した。第1段階の14日間は1群10匹、3群の構成でそれぞれ 5ppm、10ppm及び 15ppmの濃度で暴露を行った。この結果、5ppm群と 10ppm群は全例生存し、15ppmでは4例死亡した。第2段階の14日間は 5ppm群と 10ppm群の10匹を5匹づつに分け、それぞれ 30ppmまたは 90ppmで、15ppmの6匹は 90ppmの濃度で暴露を行った。この結果、暴露濃度を 5ppmから 30ppm及び 90ppmへ上げた群ではそれぞれ1匹、4匹が死亡したが、10ppmから 30ppm及び 90ppmに上げた群、ならびに 15ppmから 90ppmに上げた群ではすべて生存した。この追加試験から、あらかじめ低濃度で暴露することによって、より高濃度での暴露でも生存率を上げ得ることが明らかになった。

これらの結果から雌雄同濃度での暴露が可能となり、マウスのがん原性試験の暴露濃度は 5ppmから段階的に濃度を上げて、最終的に 90ppm、30ppm、5ppmで暴露するように設定した。すなわち、90ppm群は 5ppmで2週間、10ppmで2週間、30ppmで2週間あらかじめ暴露した後、90ppmの暴露とした。30ppm群は 5ppmで2週間、10ppmで2週間あらかじめ暴露した後、30ppmの暴露とした。5ppm群は全期間をとおして 5ppmで暴露とした。

クロロホルムについて　　-

＜構造式、分子量＞



$CHCl_3$

分子量　：119.39

CAS.No.　：67-66-3

＜名称と別名＞

名　　称　：クロロホルム (Chloroform)

別　　名　：Trichloromethane
Formyl Trichloride
Methane Trichloride
Methenyl Trichloride
Methyl Trichloride

＜物理化学的性状等＞

性　　状　：特有のエーテル臭を有する無色透明の液体

沸　　点　：61～62℃

凝固点　：-63.5℃

比　　重　：d_{20}^{20} 1.484

蒸気圧　：200mmHg(25℃)

溶解性　：水に微溶(溶解度 1mL/200mL 25℃)、各種有機溶剤に可溶

保存条件　：室温、遮光条件下で保存

＜用途＞

日本においては、1992年現在、クロロホルムはフッ素系冷媒やフッ素樹脂の製造、医薬品(麻酔剤、消毒剤)、溶剤(ゴム、グッタペルカ、鉱油、ロウ、アルカロイド、酢酸、メチルセルロース、ニトロセルロース)、有機合成、アニリンの検出、血液防腐用などに使用されている(文献 1,2)。

アメリカにおいては、1974年、冷媒等に使用するフルオロカーボン22の合成に用いられる他、プラスチック、医薬品、化粧品、ペニシリン、ビタミン等の抽出、精製、溶媒、粘着剤、樹脂、殺虫剤などの溶剤、染料中間体として広範に使用されている。

西ヨーロッパでは、主として冷媒の合成に用いられている(文献 3)。

＜生産量＞

日本では、1950年に商業生産が開始され、生産量は1991年に3万7千t、輸出が1千648t、輸入が2万7千797t、1992年に3万7千t、輸出が101t、輸入が2万6千638tであった(文献 1,2,3)。

アメリカでは、1922年に商業生産が開始され、1976年に133万t、スペインからの輸入が503t、8万8千tがオランダ、カナダ、ブラジル、メキシコ、アルゼンチン等へ輸出された。

西ヨーロッパでは、年間10～50万t、東ヨーロッパでは50～100万t生産され、その主な生産国はベネルックス三国、西ドイツ、フランス、英国である(文献 3)。

＜許容濃度＞

作業環境中でのクロロホルムの許容濃度は日本(日本産業衛生学会、1993,文献 4)、アメリカ(ACGIH、1991-92,文献 5)とも10ppmである。

また、ブルガリア、ポーランド、ルーマニア、西ドイツも10ppmである(文献 6)。

＜人への影響＞

ＩＡＲＣ(International Agency for Research on Cancer、1979,文献 3)によると、クロロホルムの暴露が繰り返されると人は死に至り、急性死の原因として心臓停止、遅延死の原因として肝臓、腎臓への障害があるとされている。また、クロロホルム暴露の症状として呼吸抑制、昏睡も含まれる。

産業中毒便覧(1981,文献 7)によると、クロロホルムの反復暴露による障害例はまれであるが、10～200ppmの作業場で1～4年勤務する作業者68名中の25%に肝臓の腫大が、5～6%に中毒性肝炎が認められ、また 77～237ppmの暴露を受けている作業者10名は、倦怠感、消化器障害、精神鈍麻を訴えたが(検診を受けた8名には肝障害は認めず)、22～71ppm暴露では、その程度は相対的に軽いという報告が記述されている。

化学物質の危険・有害便覧(1991,文献 8)によると、人への影響としてクロロホルムは強い麻酔性があり、また肝臓、腎尿細管、心臓などに細胞毒として作用する。高濃度の蒸気を吸入すると、興奮状態、反射機能の喪失、感覚麻痺、意識喪失、呼吸停止が起こり死亡する。低濃度、蒸気の繰り返し暴露による慢性中毒症状としては、胃腸、肝臓、腎臓障害がある。

濃度と作用の例示(文献 8)

濃度 (ppm)	人への作用
30 100	臭気が感知できる。しかし、すぐに臭覚が麻痺する 不快感や不安感が起こる。
1000	5～10分間の暴露でめまい、吐き気をもよおし、頭痛、疲労が残る。
4000～5000	脈拍が早くなる。嘔吐、思考混乱などが起こる。
14000～16000	麻酔性を発揮する危険濃度。

なお、同便覧に、災害事例として以下の例が示されている。

(1) クロロホルムを溶剤として使用する作業に長期従事していた者が、胃腸障害、肝障害を起こした。

(2) クロロホルムの混合物を処理した釜に作業員がガスマスクを使用せずに入ったため、めまいと頭痛を起こした。

＜動物試験＞

動物試験による報告を次項の示す。

試験の種類	動物種（系統）	投与期間	投与経路	内　容	文献番号
単回投与	ラット	1回	吸入	LC_{50}=75gm/m^3/30m	(文献 9)
	マウス	1回	吸入	LCL_0=28gm/m^3	
	モルモット	1回	吸入	LCL_0=20000ppm/2h	
	ウサギ	1回	吸入	TCL_0=59gm/m^3	
	猫	1回	吸入	LCL_0=35000gm/m^3	
	哺乳類	1回	吸入	LCL_0=25000ppm/5m	
	人	1回	吸入	LCL_0=25000ppm/5m	
反復投与	ラット Osborne-Mendel	5回/週、 78週間	強制経口 投与 担体: コーン油	雌雄: 0,90,180mg/kg ・肝臓:雌は胆管癌を誘発、雌雄で結節性過形成と肝細胞癌を合わせた発生を増加 ・腎臓:雄は腎細胞癌を誘発 ・甲状腺:雌は甲状腺腺腫の発生を増加	(文献 10)
	Osborne-Mendel	104週間	飲水 担体:水	雄: 0,200,400,900mg/L ・腎臓:腎臓腫瘍（癌、腺腫）の発生増加	(文献 11)
	マウス B6C3F$_1$	5回/週、 78週間	強制経口 投与 担体: コーン油	雄: 0,138,277mg/kg 雌: 0,238,477mg/kg ・肝臓:雌雄とも肝細胞癌を誘発	(文献 10)
	B6C3F$_1$	104週間	飲水 担体:水	雌: 0,200,400,900,1800mg/L ・各臓器に投与群で有意な腫瘍発の増加なし	(文献 11)
	ICI	6回/週、 96週間	強制経口 投与 担体: 基剤	雌雄: 0,17,60mg/kg/d ・腎臓:雄で60mg/kg/dで腎臓腫瘍(Hypernephroma,Adenoma)を誘発 雌の各群に腎臓腫瘍の発生はなかった	(文献 12)
	ICI,CBA,C57BL, CF/1	ICI:97と104週間 CBA,C57BL: 104週間 CF/1:93週間	強制経口 投与 担体: 基剤	雄: 0,60mg/L ・腎臓:ICI miceに60mg/L投与した群で腎臓腫瘍の発生:5例(内、3例が悪性腫瘍)、対照群では良性腎腫瘍1例、CBA、C57BL、CF/1 mice に腎臓腫瘍の発生はなかった	

Ⅰ　試験材料

Ⅰ－1　被験物質の使用ロット等

使用ロット番号

2週間試験：TLK0986
13週間試験：TLK0986
製造元：和光純薬工業株式会社
純度：99.0%以上

Ⅰ－2　被験物質の同一性・安定性

Ⅰ－2－1　同一性

被験物質として使用するクロロホルムを各ロット毎にマススペクトル、赤外吸収スペクトルを測定し、文献値と比較することにより、同一であることを確認した。なお、それらの結果について、2週間試験は Appendix A 8-1 、13週間試験は Appendix B 11-1 に示した。

Ⅰ－2－2　安定性

被験物質として使用するクロロホルムを各ロット毎に使用開始前時及びその使用終了時に、赤外吸収スペクトル測定とガスクロマトグラフィー分析を実施し、安定であることを確認した。なお、それらの結果について、2週間試験は Appendix A 8-2 、13週間試験は Appendix B 11-2 に示した。

Ⅰ－3　試験動物

動物は2週間試験、13週間試験ともに日本チャールス・リバー(株)のF344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)及びCrj:BDF$_1$マウス(SPF)の雌雄を使用した。

2週間試験では、ラット、マウスとも雌雄各72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60匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:112～127g、雌:94～105g/マウス雄:21.2～24.0g、雌:17.0～19.6g)を選別し、試験に供した。

13週間試験では、ラット、マウスとも雌雄各72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60匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:119～132g、雌:96～109g/マウス雄:22.0～25.4g、雌:17.4～20.0g)を選別し、試験に供した。

なお、F344/DuCrj(Fischer)ラット及びCrj:BDF_1マウスを選択した理由は、当該動物をがん原性試験において使用することが決定していたことによる。

Ⅱ　試験方法

Ⅱ－1　投与

Ⅱ－1－1　投与経路、投与方法及び投与期間

2週間試験、13週間試験において、投与経路は全身暴露による経気道投与とした。投与は吸入チャンバー内の試験動物にクロロホルムの設定濃度のガスを送り込み、全身暴露する事により行った。

各試験における投与期間及び暴露回数は以下の通りである。

2週間試験　・・・・6時間/日，5日/週，10回/2週間
13週間試験・・・・6時間/日，5日/週
ラット：61回/13週間
マウス：61回/13週間
(祝祭日を除く)

Ⅱ－1－2　投与濃度

2週間試験

2週間試験では、ラット、マウスとも高用量を 8000ppmに設定し、それ以下 4000ppm、2000ppm、1000ppm、500ppm(公比2)とした。

13週間試験

13週間試験では、ラットで高用量を 400ppmに設定し、それ以下 200ppm、100ppm、50ppm、25ppm(公比2)とした。

マウスでは、高用量を 200ppmに設定し、それ以下 100ppm、50ppm、25ppm、12ppm(公比2)と設定した。

Ⅱ－1－3　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 に示す通り、クロロホルム（液体）の入った発生容器①を循環水式恒温槽②で加熱しながら、清浄空気③をバブラー④を用いてバブリングして蒸発させたクロロホルム蒸気を、一定温度に冷却⑤し、さらに加熱⑥することにより安定した濃度でラインミキサー⑦に供給した。次にそれぞれの吸入チャンバー内のクロロホルム濃度をガスクロマトグラフ⑧により監視しながら設定値になるように蒸気の供給量⑨を調整した。

Ⅱ－1－4　被験物質の濃度測定

各試験における吸入チャンバー内のクロロホルム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。

2週間試験は、Appendix A 9-1 、13週間試験は、Appendix B 12-1 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、2週間試験、13週間試験における結果(平均値±標準偏差)を記述すると、2週間試験のラットでは 8000ppm群:7993.1±0.0ppm、4000ppm群:3997.4±2.9ppm、2000ppm群:1999.0±3.6ppm、1000ppm群:999.5±1.5ppm、500ppm群:499.4±1.1ppmであり、マウスでは 8000ppm群:8018.8±0.0ppm、4000ppm群:4006.6±4.2ppm、2000ppm群:1995.5±1.8ppm、1000ppm群:976.2±75.8ppm、500ppm群:489.1±32.1ppmであった。また、13週間試験のラットでは400ppm群:399.0±1.7ppm、200ppm群:199.4±1.0ppm、100ppm群:99.6±0.4ppm、50ppm群:49.9±0.3ppm、25ppm群:24.9±0.1ppmであり、マウスでは200ppm群:200.2±0.5ppm、100ppm群:100.2±0.3ppm、50ppm群:50.1±0.1ppm、25ppm群:25.0±0.1ppm、12ppm群:12.0±0.1ppmであった。

Ⅱ－2　動物管理

Ⅱ－2－1　群分け及び個体識別方法

供試動物の各投与群への割り当ては、動物を体重の重い順より各群に1匹づつ割り当て、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 13)。

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、ケージにも検疫、馴化個体番号を付けた。投与期間においては耳パンチにより識別し、またケージにも個体識別番号を付けた。

なお、他の試験との区別は、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することにより行った。

Ⅱ－2－2　飼育条件

動物は、2週間試験、13週間試験とも馴化期間及び投与期間中は吸入チャンバー内で飼育した。各試験で使用した吸入チャンバー内の環境条件をTable 1 に示した。その計測結果を2週間試験は Appendix B 9-2 に、13週間試験は Appendix B 12-2 に示した。各試験とも設定条件の範囲内であった。また、2週間試験、及び13週間試験における馴化期間、観察飼育期間の動物飼育は、温度 22～26℃、湿度 45～70%(但し、各試験とも検疫期間の動物飼育は、温度 24±2℃、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/時の環境の飼育室で行った。

各試験の検疫期間中は1ケージ当り1匹の単飼(ステンレス製2連型網ケージ、ラット：170W×294D×176H mm、マウス：112W×212D×120H mm)、馴化期間中は1ケージ当り1匹の単飼(ステンレス製6連型網ケージ、ラット：125W×216D×176H mm、マウス：95W×116D×120H mm)、投与期間中は1ケージ当り1匹の単飼(ステンレス製5連網ケージ、ラット：150W×216D×176H mm、マウス：100W×116D×120H mm)の条件下で飼育した。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)を飼育全期間を通して固型飼料給餌器により自由摂取させた。また、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、紫外線滅菌し、自動給水により自由摂取させた。なお、2週間試験のクロロホルム暴露中は給餌、給水をしなかった。

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

各試験とも、毎日1回以上、動物の一般状態の観察を行った。

Ⅱ－3－2　体重測定

2週間試験では、0日(投与開始直前)、1日(1週1日)、7日(1週7日)、及び14日(2週7日)、13週間試験では週1回、体重を測定した。

Ⅱ－3－3　摂餌量測定

各試験とも、週1回、摂餌量を測定した。

Ⅱ－3－4　血液学的検査

各試験とも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採血したEDTA-2K加血液を用いて血液学的検査を行った。

なお、13週間試験の検査対象動物は解剖日前日より(18時間以上)絶食させた。

検査項目は Table 1 、検査方法は Appendix C 1 に示した。

Ⅱ－3－5　血液生化学的検査

各試験とも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採血したヘパリンリチウム加血液を遠心分離して得られた血漿を用いて血液生化学的検査を行った。なお、13週間試験の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 C 1 に示した。

Ⅱ－３－６　尿検査

13週間試験の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。

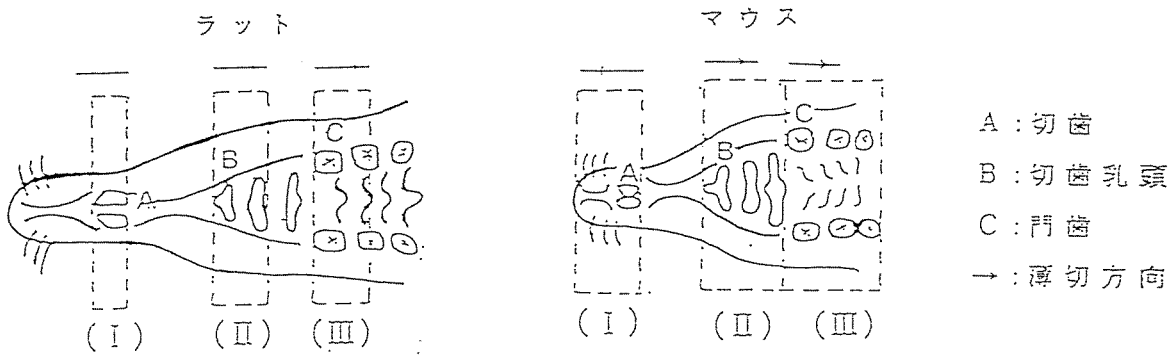
検査項目は Table 1 、検査方法は Appendix C 1 に示した。

Ⅱ－３－７　病理学的検査

各試験とも解剖時に全動物について肉眼的に観察を行った。2週間試験では雌雄各群の 2例の動物の臓器を、13週間試験では全動物の臓器を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のみられた臓器を、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。

臓器重量は13週間試験の定期解剖時まで生存した動物について Table 1 に示した臓器の湿重量を測定した。

切出し位置



Ⅱ－4　数値処理と統計学的方法　-

Ⅱ－4－1　数値の取扱いと表示

各数値データは計測機器の精度に合わせて表示した。

体重についてはgを単位とし、ラットでは小数点以下第1位を四捨五入して整数値で、マウスでは小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

摂餌量についてはgを単位とし、1週間(7日)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7で除し、1日当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 C 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－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った。

Ⅱ－4－2　母数の取扱いと表示

各種統計検定における群内動物数(母数)は総括表に示した。

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、欠測となったデータについては「－」で表示し、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、欠測となったデータについては「－」で表示し、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に行い、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。

Ⅱ－4－3　統計方法

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。

なお、病理組織学的検査のうち13週試験では非腫瘍性病変について、死亡/瀕死例、定期解剖例に分け、所見のみられなかった動物をグレード0としてχ^2検定を行った。また、尿検査についてもχ^2検定を行った。なおχ^2検定は対照群と各投与群間との検定である。

各群雌雄毎に検査数が2以下の項目については検定より除外した。

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日本バイオアッセイ研究センターの標準操作手順書にしたがって、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2週間試験　(試験番号:0089)

Ⅲ－1－1　動物の状態観察

(1) 生死状況

雌雄とも 2000ppm以上の群では1週4日目までに全例が死亡した。1000ppm以下の群では雌雄ともに死亡を認めなかった。

(2) 一般状態

一般状態の観察結果を Appendix A 1-1,2 に示した。

死亡例(2000ppm以下の群)では、雌雄ともに 2000ppm群で不整呼吸、深呼吸が観察され、4000ppm群では、これらの所見に加え、自発運動量減少、失調性歩行などの症状が主に観察された。生存例(1000ppm以下の群)では、雌雄ともに投与期間の後半に流涙、流涎が観察されたが、その他には特記すべき所見は観察されなかった。

(3) 体重

体重の推移を Table 2,3 及び Appendix A 2-1,2 に示した。

最終計測日(2週7日)まで生存した動物の体重値は、対照群に対して雄で1000ppm群:79%、500ppm群:85%、雌で 1000ppm群:80%、500ppm群:84%であり、雌雄とも体重の有意な低値が認められた。

(4) 摂餌量

摂餌量(1日1匹当り)を Table 4,5 及び Appendix A 3-1,2 に示した。

2000ppm以上の群は、雌雄とも投与期間途中で全数死亡したために摂餌量は測定できなかったが、500ppm、1000ppm群では雌雄ともに投与1週目には一旦摂餌量が対照群に比べて低下したが、最終計測日には回復した。これらの摂餌量は対照群と比較して、雄では 1000ppm群:77～92%、500ppm群:84～94%、雌では 1000ppm群:75～96%、500ppm群:86～96%であった。

Ⅲ－1－2　血液学的検査、血液生化学的検査

(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 A 4-1,2 に示した。

定期解剖時まで生存していた 1000ppm、500ppm群においては、雌雄ともに、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の有意な増加、MCV及び血小板数の有意な減少が認められ、さらに雌ではMCHの有意な減少も認められた。また、雄の 1000ppm群で分葉核好中球比の有意な増

加及びリンパ球比の有意な減少、雌の 1000ppm群で白血球数の有意な減少が認められた。

（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 A 5-1,2 に示した。

定期解剖時まで生存していた 1000ppm、500ppm群においては、雌雄ともに、アルブミンの有意な増加、ＧＯＴ及びＧＰＴ活性の有意な上昇、グルコース及びカリウムの有意な減少が認められ、さらに雄ではクレアチニンの有意な増加、雌では総ビリルビン及び無機リンの有意な増加、総コレステロールの有意な減少がそれぞれ認められた。また、雄の 1000ppm群で総ビリルビン、クロールの有意な増加、雌の 1000ppm群でナトリウムの有意な減少が認められた。

その他、雄の 500ppm群で総コレステロール、尿素窒素の増加、雌の 500ppm群で総蛋白、クレアチニンの増加がみられた。

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 A 6-1～3 に示した。

死亡動物では雌雄とも肺の赤色化を全例に認め、胸腺の赤色化も多数例に認められ、また、腎臓の出血が雌雄とも 4000ppm、2000ppm群で観察された。

定期解剖動物では雌雄とも対照群と比較して投与群に特徴的あるいは顕著な発生率の増加を示す所見はなかった。

（２）病理組織学的検査

病理組織学的検査をの結果を Appendix A 7-1～4 に示し、死亡例と生存例に分けて各臓器にみられた変化を記述する。

（２）－１　死亡例

＜腎臓＞

雄では出血(4000ppm群)、腎乳頭の鉱質沈着(2000ppm群)及び鬱血(各群)を認めた。雌では近位尿細管に軽度の壊死と空胞変性(4000ppm群と 2000ppm群)と鬱血(各群)を認めた。

＜肝臓＞

雌雄とも鬱血(各群)を認めた。雄では中等度ないし軽度の小葉中心性変性(8000ppm群)も認めた。

＜鼻腔＞

呼吸上皮と嗅上皮に傷害を認めた。

嗅上皮には雌雄とも変性、壊死、萎縮、剥離及び配列不整を認め、さらに、雌では嗅上皮の直下に位置する固有層に浮腫(2000ppm群)を認めた。これらの変化の程度は、変性、剥離及び萎縮では重度から中等度の例が多く、比較的強い傷害であった。

呼吸上皮には雌雄とも重度から軽度な変性(各群)、軽度な糜爛(雄 4000ppm群、雌 4000ppm群、2000ppm群)を認めた。

＜肺＞

雌雄とも鬱血(各群)、中等度ないし軽度の炎症(4000ppm群、2000ppm群)を認めた。さらに、雌では肺胞細胞の増生(2000ppm群)も認めた。

＜胸腺＞

雌雄とも出血(雄 各群、雌 8000ppm群、2000ppm群)、雌では核崩壊(各群)を認めた。

＜死因＞

死亡動物に共通した死因となりえる病理組織所見を認めなかった。

（２）－２　生存例

＜鼻腔＞

主に嗅上皮とその直下に位置する固有層に傷害を認めた。雄では 500ppm群まで嗅上皮の萎縮と固有層の浮腫、1000ppm群に嗅上 皮の配列不整と剥離を認めた。雌では 500ppm群まで嗅上皮の配列不整、剥離及び萎縮、ならびに固有層の浮腫を認めた。

呼吸上皮については変性を雌 1000ppm群の1例だけに認めた。

＜腎臓＞

近位尿細管の空胞変性を雌雄とも 500ppm群まで認めた。その程度は雄では重度から軽度、雌では中等度から軽度であった。

＜肝臓＞

小葉中心性の軽度な空胞変性を雄では 500ppm群まで、雌では 1000ppm群に認めた。

Ⅲ－2　ラットを用いた13週間試験-（試験番号：００９７）

Ⅲ－２－１　動物の状態観察

（１）生死状況

動物の死亡はみられなかった。

（２）一般状態

一般状態の観察結果を Appendix B 1-1,2 に示した。

雌雄の各群とも投与期間中に特記すべき所見は認められなかった。

（３）体重

体重の推移を Table 6,7、Figure 2,3 及び Appendix B 2-1,2 に示した。

雌雄とも全投与群において、投与期間初期から投与濃度に応じた体重増加の抑制が認められ、最終計測日の体重値は、対照群に対して、雄で 400ppm群：69%、200ppm群：80%、100ppm群：89%、50ppm群：92%、25ppm群：95%、雌で 400ppm群：77%、200ppm群：87%、100ppm群：91%、50ppm群：87%、25ppm群：95%であった。最終計測日の体重値は、対照群に対して雄で 1000ppm群：79%、500ppm群：85%、雌で 1000ppm群：80%、500ppm群：84%であり、雌雄とも体重の有意な低値が認められた。

（４）摂餌量

摂餌量（1日1匹当り）を Table 8,9、Figure 4,5 及び Appendix B 3-1,2 に示した。

雌雄とも投与期間初期に摂餌量は一時的に低下するものの、投与期間後半には対照群に比較して、すべての投与群で増加傾向を示した。投与終了時の摂餌量は、対照群と比較して、雄では 400ppm群：144%、200ppm群：128%、100ppm群：106%、50ppm群：110%、25ppm群：103%、雌では 400ppm群：134%、200ppm群：139%、100ppm群：120%、50ppm群：109%、25ppm群：109%であった。

Ⅲ－２－２　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 B 4-1,2 に示した。

雄では、100ppm以上の群で血小板数の有意な増加が認められた。

雌では、200ppm以上の群でＭＣＶの有意な減少及び血小板数の有意な増加、400ppm群でＭＣＨＣの有意な減少が認められた。また、ＭＣＨは200ppm以上の群で減少、50ppm群で増加という相反する結果を示した。

その他、雄の 100ppm、50ppm群でＭＣＶの増加、200ppm、100ppm、50ppm群でＭＣＨの増加がみられた。

（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 B 5-1,2 に示した。

雄では、全投与群でトリグリセライドの有意な減少、50ppm以上の群でグルコースの有意な減少、100ppm以上の群でアルブミン、Ａ/Ｇ比及び総コレステロールの有意な増加、200ppm以上の群で無機リンの有意な増加がそれぞれ認められた。また、200ppm、100ppm群で総蛋白の有意な増加、400ppm群でＡＬＰ、ＬＡＰ及びγ－ＧＴＰ活性の有意な上昇とクロールの有意な減少が認められた。

雌では、200ppm以上の群でグルコース、リン脂質及びクロールの有意な減少、ＡＬＰ、ＬＡＰ及びγ－ＧＴＰ活性の有意な上昇が認められた。

その他、雄の 200ppm群でカルシウムの増加、雌では、50ppm、25ppm群でアルブミンの減少、50ppmで総コレステロールの増加、200ppm群で総蛋白の増加がそれぞれみられた。

（３）尿検査

投与期間最終週に行った尿検査の結果を Appendix B 6-1,2 に示した。

雄では、50ppm以上の群で潜血の陽性例の増加、200ppm以上の群でグルコースの陽性例の増加及び増加傾向、400ppm、50ppm群でケトン体の陽性例の増加、400ppm群で蛋白の陽性度の増加が認められた。

雌では、50ppm以上の群でｐＨの低下及び低下傾向、200ppm以上の群で潜血の陽性例の増加、400ppm群でグルコースの陽性例の増加が認められた。

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 B 7-1,2 に示した。

雌雄とも 200ppm以上の群の多数例に腎臓の淡色化を認めた。

（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 B 8-1,2（実重量）、B 9-1,2（体重比）に示した。

実重量では対照群に比較して、雄においては、全投与群で胸腺に低値、200ppm以上の群で心臓、脾臓と肝臓に低値、400ppm群で精巣、肺と脳に低値を認めた。雌においては、50ppm以上の群で胸腺に低値、100ppm以上の群で腎臓に高値、400ppm、200ppm、50ppm群で脾臓に低値、200ppm以上の群で肝臓に高値と脳に低値、400ppm群で副腎、卵巣と心臓に低値をそれぞれ認めた。

体重比では対照群と比較して、雄では、全投与群で精巣と脳に高値、50

ppm以上の群で腎臓と肝臓に高値、100ppm以上の群で脾臓に高値、200ppm以上の群、50ppm群で肺に高値、400ppm、50ppm群で心臓に高値、200ppm以上の群で副腎に高値をそれぞれ認めた。雌では、50ppm以上の群で副腎、心臓、肺、腎臓に高値、100ppm以上の群で肝臓に高値、200ppm以上の群、50ppm群で脳に高値をそれぞれ認めた。

（３）病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を Appendix B 10-1,2 に示した。

＜腎臓＞

近位尿細管の空胞変性を雄の 200ppm以上の群と雌の 100ppm以上の群で認めた。雄の発生数は 400ppm群の4/10例、200ppm群の3/10例であり、その程度はいずれの例も軽度であった。雌の発生数は 400ppm群の5/10例、200ppm群の6/10例、100ppm群の2/10例であり、その程度は 200ppm以上で軽度～重度、100ppm群で軽度であった。

＜肝臓＞

小葉中心性の虚脱を雄の 200ppm以上の群と雌の 100ppm以上の群で、セロイド沈着を雄の 400ppm群と雌の 200ppm以上の群で認めた。

小葉中心性の虚脱は、この部位の肝細胞の脱落であり、雄の発生数は 200ppm以上の群の全例であり、その程度は 400ppm群で軽度～中等度、200ppm群で軽度であった。雌の発生数は 200ppm以上の群の各9/10例、100ppm群の8/10例であり、その程度は 200ppm以上の群で軽度～中等度、100ppm群で軽度であった。

セロイド沈着は、壊死した肝細胞が類洞の貪食細胞に取り込まれ、貪食された肝細胞が脂質に変化して淡黄色を呈するセロイドになった所見である。発生数は雄の 400ppm群の全例、雌の 400ppm群の全例と 200ppm群の8/10例であり、その程度は雌雄とも全例が軽度であった。

その他、小葉中心性の軽度な空胞変性が雌雄の 200ppm群の少数例で認めた。

＜鼻腔＞

嗅上皮の萎縮と篩骨甲介の鉱質沈着を雌雄の全ての投与群で、嗅上皮の壊死を雄の 200ppm以上の群と雌の 400ppm群で認めた。

嗅上皮の萎縮は、雄の 50ppm以上の群のほぼ全例、25ppm群の7/10例に、雌の 25ppm以上の群の全例に認めた。その程度は雌雄とも 400ppm群で軽度～中等度、その他の群は軽度であった。

鉱質沈着は、主として嗅上皮が表面を覆っている篩骨甲介の粘膜固有層に認めた。発生数は雌雄の全ての投与群とも全例であった。その程度は多くの例が軽度～中等度の変化であった。

嗅上皮の壊死は萎縮に至る前段階の変化である。雄の発生数は 400ppm群の全例、200ppm群の8/10例であり、雌の発生数は 400ppm群の1/10例であった。その程度はいずれの例も軽度であった。

Ⅲ－3　マウスを用いた2週間試験 -(試験番号：００９０)

Ⅲ－３－１　動物の状態観察

（１）生死状況

動物の死亡は、雄の全投与群と雌の 1000ppm以上の群に認められ、これらの死亡例は、すべて1週7日目までにみられた。生存例数は、雄では1000ppm群、500ppm群ともに1例、雌では 1000ppm群で1例、500ppm群で10例と性差を示した。

（２）一般状態

一般状態の観察結果を Appendix A 1-3,4 に示した。

雌雄とも全投与群の死亡動物において、自発運動量減少、円背位、失調性歩行、立毛、尿による外陰部汚染、不整呼吸、深呼吸、体温低下の症状が観察された。さらに、最高用量群を除いた投与群で呼吸緩徐も観察された。また、雄の 4000ppm、2000ppm、1000ppm、500ppm群で、音反射減少、触反射消失が観察された。投与最終日まで生存した動物に関しては、特記すべき所見は観察されなかった。

（３）体重

体重の推移を Table 10,11 及び Appendix A 2-3,4 に示した。

雌雄とも投与期間初日から、多数が死亡し、生存例が少なく、対照群との比較に耐え得る結果は得られなかった。しかし、生存例については、一旦体重増加の抑制がみられたのち、投与期間終期に回復の傾向を示した。

（４）摂餌量

摂餌量(1日1匹当り)を Table 12,13 及び Appendix A 3-3,4 に示した。

雌雄とも投与期間初日から、多数が死亡し、生存例が少なく、対照群との比較に耐え得る結果は得られなかった。しかし、雌の 500ppm群は、投与期間後期に回復の傾向を示した。

Ⅲ－３－２　血液学的検査、血液生化学的検査

（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 A 4-3,4 に示した。

雌雄ともに、投与群は定期解剖日まで生存した動物が少なく、対照群との比較に耐え得る結果は得られなかった。

（２）血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix A 5-3,4 に示した。

雌雄ともに、投与群は定期解剖日まで生存した動物が少なく、対照群との比較に耐え得る結果は得られなかったが、雌の 500ppm群では、ＧＯＴ、ＧＰＴ及びＬＤＨ活性の上昇傾向が認められた。

Ⅲ－３－３　病理学的検査

（１）剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix A 6-4～7 に示した。

死亡動物では雄雌とも肺の赤色化と肝臓の淡色化を全群の多くの例に認めた。

定期解剖動物では雌の 500ppm群に肝臓の淡色化が認められた。

（２）病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を Appendix A 7-5～8 に示し、死亡例と生存例に分けて各臓器にみられた変化を記述する。

（２）－１　死亡例

＜腎臓＞

雄では近位尿細管の変性や壊死などの重篤な腎臓障害を示す所見を全例に認めた。これに対して、雌では雄にみられた腎臓障害の所見は得られなかった。また、雌雄とも全例に鬱血がみられ、雄には出血を伴う例も1例みられた。

＜肝臓＞

小葉中心性の壊死、空胞変性あるいは腫脹などの肝実質の傷害を雌雄とも認めた。これらの変化は、雄では 2000ppm群～500ppm群に観察され、その程度は軽度ないし中等度であり、雌では 4000ppm群～1000ppm群に観察され、その程度は雄より強かった。その他、雄 500ppm群を除き、雌雄の各群に鬱血や出血を認めた。

＜鼻腔＞

嗅上皮と呼吸上皮に傷害を認めた。

嗅上皮には雌雄の各群とも変性、壊死、萎縮及び剥離を認め、その程度は比較的強かった。

呼吸上皮には変性とエオジン好性変化を認め、変性は 2000ppm群と 4000ppm群の雌雄に、エオジン好性変化は雌だけに認めた。

＜喉頭、気管＞

雌雄とも 2000ppm群と 4000ppm群で喉頭と気管の上皮に変性を認めた。

＜肺＞

気道の終末部である細気管支上皮の変性、肺胞の肺胞細胞の増生、炎症及び鬱血を認めた。すなわち、細気管支上皮の変性は雌雄とも 2000ppm群と 4000ppm群に、肺胞細胞の増生は雌の 1000ppm群と 2000ppm群に、炎症は雄の 500ppm群と 1000ppm群及び雌の 4000ppm群～1000ppm群に、また鬱血は雌雄の全群に認めた。

その他、胸腺、脾臓及びリンパ節に核崩壊や萎縮、精巣に精原細胞の壊死、心臓に出血を認めた。

（２）－２　生存例

＜腎臓＞

雄では 1000ppmと 500ppm群に近位尿細管の壊死と好塩基性変化を認めた。これに対して、雌にみられた所見は鬱血(1000ppm群)だけであった。

＜肝臓＞

雄では軽度な小葉中心性の腫脹と空胞変性を 1000ppmと 500ppm群に認めた。これに対し、雌では中等度の小葉中心性の壊死と軽度な空胞変性を 1000ppmと 500ppm群に認めた。

＜鼻腔＞

雄では嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生を、雌では嗅上皮の変性、壊死、萎縮、剥離、配列不整及び呼吸上皮化生を 1000ppmと 500ppm群に認めた。

＜肺＞

肺胞細胞の増生を雌の 1000ppm群で認めた。

その他、胸腺の核崩壊や萎縮、前胃の潰瘍、精巣の精原細胞の壊死、及び筋肉や脂肪組織の壊死を認めた。

Ⅲ－4　マウスを用いた13週間試験－（試験番号：００９８）

Ⅲ－４－１　動物の状態観察

（１）生死状況

動物の死亡は、雄の全投与群に認められたが、雌では1例も認められなかった。雄の死亡例は、すべて1週7日目までにみられた。生存例数は、雄の100ppm群で2例、25ppm群で1例、12ppm群で8例であり、これに対して、雌では、全例生存し、著しい性差を示した。

（２）一般状態

一般状態の観察結果を Appendix B 1-3,4 に示した。

全投与群において特記すべき所見は認められなかった。

（３）体重

体重の推移を Table 14,15、Figure 6,7 及び Appendix B 2-3,4 に示した。

雄では投与期間初期より死亡動物が目だち、対照群との比較に耐え得る結果は得られなかったが、生存例では、投与期間を通じて体重増加の抑制が認められ、動物の体重値は対照群に対して投与期間を通じて 89～98%であった。雌では、投与期間初期には体重増加の抑制が認められたものの、6週7日以降は回復し、増加傾向を示した。

（４）摂餌量

摂餌量(1日1匹当り)を Table 16,17、Figure 8,9 及び Appendix B 3-3,4 に示した。

雄では投与期間初期より死亡動物がめだち、対照群との比較に耐え得る結果は得られなかった。雄の生存例及び雌で、対照群と比較して顕著に低値を示した群は認められなかった。

Ⅲ－４－２　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 B 4-3,4 に示した。

雄の投与群は、定期解剖日まで生存した動物が少なく、対照群との比較に耐え得る結果は得られなかった。

雌では、50ppm以上の群で血小板数の有意な増加、200ppm群でＭＣＶの有意な増加が認められた。その他、200ppm、50ppm群でＭＣＨの増加、100ppm群でヘモグロビン濃度の増加がみられた。

（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 B 5-3,4 に示した。

雄の投与群は、定期解剖日まで生存した動物が少なく、対照群との比較に耐え得る結果は得られなかった。

雌では、50ppm以上の群で尿素窒素の有意な増加、100ppm以上の群で総蛋白とアルブミンの有意な増加、200ppm群でＧＯＴ、ＧＰＴ及びＡＬＰ活性の有意な上昇がそれぞれ認められた。その他、100ppm、50ppm群でトリグリセライドの減少、50ppm、25ppm群でグルコースの増加がみられた。

（３）尿検査

投与期間最終週に行った尿検査の結果を Appendix B 6-3,4 に示した。

雄では、12ppm群で蛋白の陽性度の増加が認められた。それ以外の投与群は生存例が少なく、対照群との比較に耐え得る結果は得られなかった。

雌では、投与群に特徴的、あるいは対照群と比較して高い発生を示した所見は認められなかった。

Ⅲ－４－３　病理学的検査

（１）剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix B 7-3～5 に示した。

雄にのみ瀕死／死亡動物がみられ、全投与群で肺の赤色化、肝臓の淡色化が多数認められた他、100ppm以上の群で腺胃の赤色班、50ppm群で腺胃の赤色液貯留、200ppm群で脾臓の黒色班、25ppm群で腎臓の淡色化が1～2例認められた。

生存動物では、雌の対照群を含めた全群に脾臓の黒色班、200ppm群で肝臓の白色化が認められた他、100ppm以上の群で子宮の内腔拡張、25ppm群で肝臓の白色班、12ppm群で卵巣の嚢胞がそれぞれ1例認められた。雄では投与群に特徴的、あるいは対照群と比較して高い発生を示した所見は観察されなかった。

（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 B 8-3,4（実重量）、B 9-3,4(体重比）に示した。

雌では実重量で対照群に比較して 100ppm以上の卵巣に低値、200ppm群で腎臓、脾臓、肝臓に高値がそれぞれ認められた。体重比では対照群に比較して 100ppm以上の群で卵巣に低値、200ppm、50ppm群で腎臓に高値、200ppm群で肝臓に高値と脳に低値がそれぞれ認められた。雄は生存例が少なく、実重量、体重比とも対照群との比較に耐え得る結果は得られなかった。

（３）病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を Appendix B 10-3～5 に示した。

（３）－１　死亡例

多くの死亡動物に、腎臓の近位尿細管の壊死と変性、鼻腔の嗅上皮の変性、肺の鬱血、出血及び炎症、リンパ節と胸腺の核崩壊、脾臓の萎縮、精巣の精原細胞の壊死を認めた。また、200ppm群の死亡動物では肝臓に小葉中心性の肝細胞の腫脹を認めた。動物の主たる死因は腎臓障害と考えた。

（３）－２　生存例

＜腎臓＞

雄では、近位尿細管の壊死と好塩基性変化を最低濃度である 12ppm群まで認めた。近位尿細管の壊死は各投与群とも多くの例に認めたが、その程度はいずれの例も軽度であった。尿細管の好塩基性変化は変性や壊死に伴う修復所見であり、各投与群とも全例に認めた。なお、一般に、この系統の雄マウスで対照群に認める近位尿細管の空胞化は、本試験でも対照群に認めたが投与群では認めなかった。

＜鼻腔＞

雄では、骨化生を最低濃度である 12ppmまで認めた。骨化生の主な発生部位は、鼻腔後半の鼻中隔腹側の粘膜固有層内であった。その程度はいずれの例も軽度であったが、各投与群ともに多くの例に認めた。なお、100ppm群の1/2例に呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化を認めた。その他、投与群の少数例に肺の鬱血と出血、精巣の精原細胞の壊死を認めた。

雌では、骨化生及び呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化を最低濃度の12ppm群まで認めた。これらの所見は病変の程度が軽度であり、各投与群とも多くの例に認めた。なお、骨化生の発生部位は雄と同様であった。

＜肝臓＞

雌では、肝細胞の細胞異型を 100ppm以上の群、小葉中心性の壊死を200ppm群で認めた。細胞異型は 100ppm以上の群の全例に認め、その程度はいずれの例も軽度であった。小葉中心性の壊死は 200ppm群の全例に認め、その程度は軽度～中等度であった。なお、200ppm群の少数例に小葉中心性の空胞変性を認めた。

その他、雌では投与群の少数例に肺の血栓を認めた。

Ⅳ　考察及びまとめ　　－

－ラット－

＜2週間試験＞（００８９）

F344ラットに2週間（6時間/日、5日/週）にわたりクロロホルムを 8000ppm、4000ppm、2000ppm、1000ppm及び500ppmの濃度で暴露した。

その結果、2000ppm以上の群では雌雄とも全動物が死亡し、腎臓に近位尿細管の変性/壊死性、鼻腔に嗅上皮の変性/壊死性、粘膜固有層の浮腫及び呼吸上皮の変性、ならびに肺に炎症や肺胞細胞の増生を認めた。動物の一般状態の観察で麻酔作用による症状を認めたことから、直接の死因はクロロホルム吸引による麻酔死の可能性が高いと考える。

1000ppm群では全動物が生存したが、雌雄とも体重増加の抑制が全投与期間にわたり認められ、投与終了時における体重は対照群に対して雄で79%、雌で80%であった。血液学的検査では雌雄とも赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の増加ならびにＭＣＶと血小板数の減少、雄にのみ分葉核好中球比の増加とリンパ球比の減少、雌にのみＭＣＨと白血球数の減少を認めた。血液生化学的検査では雌雄ともアルブミン、ＧＯＴ及びＧＰＴ活性の増加ならびにグルコースとカリウムの減少、雄にのみクレアチニン、総ビリルビン及びクロールの増加、雌にのみ総ビリルビンと無機リンの増加ならびに総コレステロールとナトリウムの減少を認めた。病理組織学的検査では雌雄とも腎臓に近位尿細管の変性/壊死、鼻腔に嗅上皮の変性/壊死性、粘膜固有層の浮腫及び呼吸上皮の変性、肝臓に小葉中心性の空胞変性を認めた。

500ppm群では雌雄とも体重増加の抑制が全投与期間にわたり認められ、投与終了時における体重は対照群に対して雄で85%、雌で84%であった。血液学的検査では雌雄とも赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の増加ならびにＭＣＶと血小板数の減少、雌にのみＭＣＨの減少を認めた。血液生化学的検査では雌雄ともアルブミン、ＧＯＴ及びＧの増加ならびにグルコースとカリウムの減少、雄にのみクレアチニンの増加、雌にのみ総ビリルビンと無機リンの増加ならびに総コレステロールの減少を認めた。病理組織学的検査では雌雄とも腎臓に近位尿細管の変性/壊死、鼻腔に嗅上皮の変性/壊死性、粘膜固有層の浮腫及び呼吸上皮の変性、雄にのみ肝臓に小葉中心性の空胞変性を認めた。

以上のように、クロロホルム暴露により 2000ppm以上の群では雌雄とも全動物が死亡し、1000ppm群と 500ppm群でも体重増加の抑制、ならびに血液学的検査、血液生化学的検査及び病理組織学的検査に投与による影響が

認められた。特に腎臓の病理組織学的変化は 500ppm群でも認められ、この濃度で13週間投与試験を実施すると動物の生存が危ぶまれるものと推察した。これらのことから13週間投与試験の暴露濃度は、最高暴露濃度を雌雄とも 500ppmより低い 400ppmとし、以下 200ppm、100ppm、50ppm、25ppm(公比 2)に設定した。

＜13週間試験＞(００９７)

2週間試験の結果に基づき、F344ラットに13週間(6時間/日、5日/週)にわたりクロロホルムを 400ppm、200ppm、100ppm、50ppm、25ppmの濃度で暴露した。

その結果、雌雄の全投与群とも動物の死亡を認めなかった。400ppm群では雌雄とも体重増加の抑制が全投与期間にわたり認められ、投与終了時における体重は対照群に対して雄で69%、雌で77%であった。血液学的検査では、雌雄に血小板数の増加、雌にのみＭＣＶ、ＭＣＨ及びＭＣＨＣの減少を認めた。血液生化学的検査では、雌雄ともグルコースとクロールの減少ならびにＡＬＰ、ＬＡＰ及びγ－ＧＴＰ活性の増加、雄にのみトリグリセライドの減少ならびにアルブミン、Ａ/Ｇ比、総コレステロール及び無機リンの増加、雌にのみリン脂質の減少を認めた。尿検査では雌雄とも潜血とグルコースの陽性例の増加、雄にのみ蛋白の陽性度の増加、雌にのみｐＨの低下を認め、これらの変化は腎臓障害を示唆した。病理組織学的検査では雌雄とも鼻腔に嗅上皮の壊死と萎縮及び篩骨甲介への鉱質沈着、肝臓に虚脱(肝細胞の脱落)とセロイド沈着、腎臓に近位尿細管の空胞変性を認めた。

200ppm群では、投与終了時における体重は対照群に対して雄で80%、雌で87%であった。血液学的検査では雌雄とも血小板数の増加、雌にのみＭＣＶとＭＣＨの減少を認めた。血液生化学的検査では雌雄ともグルコースの減少、、雄にのみトリグリセライドの減少ならびにアルブミン、Ａ/Ｇ比、総コレステロール及び無機リンの増加、雌にのみリン脂質とクロールの減少ならびにＡＬＰ、ＬＡＰ及びγ－ＧＴＰ活性の増加を認めた。尿検査では雌雄とも潜血の陽性例の増加、雄にのみグルコースの陽性例の増加、雌にのみｐＨの低下を認めた。病理組織学的検査では雌雄とも鼻腔に嗅上皮の萎縮と篩骨甲介への鉱質沈着、肝臓に虚脱及び腎臓に近位尿細管の空胞変性、雄にのみ鼻腔に嗅上皮の壊死、雌にのみ肝臓にセロイド沈着を認めた。

100ppm群では雌雄とも体重増加の抑制が全投与期間にわたり認められ、投与終了時における体重は対照群に対して雄で89%、雌で91%であった。血液学的検査では雄に血小板数の増加を認めた。血液生化学的検査では雄にトリグリセライドとグルコースの減少ならびにアルブミン、Ａ/Ｇ比及び総

コレステロールの増加を認めた。尿検査では雄に潜血の陽性例の増加、雌にｐＨの低下を認めた。病理組織学的検査では雌雄とも鼻腔に嗅上皮の萎縮と篩骨甲介への鉱質沈着を認めた。肝臓の虚脱と腎臓の近位尿細管の空胞変性を雌で認めたが、その程度は軽度であった。。

50ppm群では雌雄とも体重増加の抑制が全投与期間にわたり認められ、投与終了時における体重は対照群に対して雄で92%、雌で87%であった。血液生化学的検査では雄にトリグリセライドとグルコースの減少を認めた。尿検査では雄に潜血の陽性例の増加、雌にｐＨの低下を認めた。病理組織学的検査では雌雄とも鼻腔に嗅上皮の萎縮と篩骨甲介への鉱質沈着を認めた。

25ppm群では雌雄とも体重増加の抑制が全投与期間にわたり認められ、投与終了時における体重は対照群に対して雄で95%、雌で95%であった。血液生化学的検査では雄にトリグリセライドの減少を認めた。病理組織学的検査では雌雄とも鼻腔に嗅上皮の萎縮と篩骨甲介への鉱質沈着を認めた。

以上のように、クロロホルム暴露により 200ppm以上の群では雌雄とも体重増加の顕著な抑制、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査の値の変化、ならびに鼻腔、肝臓及び腎臓の病理組織学的変化など投与による影響が強く現れ、これらの濃度でがん原性試験を実施すると動物の生存が危ぶまれるものと推察した。100ppm群でもほぼ同様の影響はみられたが、動物の生存率に影響を与える肝臓と腎臓の病理組織学的変化の程度は軽度であり、体重増加の抑制も10%程度であった。これらの事から、がん原性試験での暴露濃度は、最高濃度を 100ppmよりやや低い 90ppmとし、以下 30ppm、10ppm(公比 3)に設定した。

－マウス－　　－

＜2週間試験＞（００９０）

BDF_1マウスに2週間（6時間／日、5日／週）にわたりクロロホルムを 8000ppm、4000ppm、2000ppm、1000ppm及び 500ppmの濃度で暴露した。

その結果、1000ppm以上の群では雌雄とも、500ppm群では雄にのみ動物の死亡がみられた。死亡時期は全例とも暴露開始から7日以内であった。死亡例の病理組織学的検査では雌雄とも肝臓に小葉中心性の壊死、空胞変性及び壊死、鼻腔に嗅上皮の変性、壊死、萎縮及び剥離ならびに呼吸上皮の変性とエオジン好性変化を認めた。また、雄にのみ腎臓に近位尿細管の変性と壊死を認めた。1000ppm以上の群の死因は動物の一般症状で麻酔作用によると思われる症状（失調性歩行、不整呼吸、深呼吸、呼吸緩徐、音反射減少及び触反射消失）を認めたことからクロロホルムによる麻酔死の可能性が強く、500ppm群の雄の死因は麻酔作用に加えて腎臓障害が関与していると考えた。

500ppm群の雌は血液生化学的検査でＧＯＴ、ＧＰＴ及びＬＤＨ活性の明らかな増加を認めた。病理組織学的検査でも肝臓に小葉中心性の壊死と空胞変性、鼻腔に嗅上皮の変性、壊死、萎縮、剥離、配列不整及び呼吸上皮化生を認めた。

以上のように、クロロホルム暴露により 1000ppm以上の群の雌雄と 500ppm群の雄で動物が死亡し、500ppm群の雌でも血液生化学的検査及び病理組織学的検査に投与による影響が認められた。これらの事から13週間投与試験の暴露濃度は、最高暴露濃度を雌雄とも 500ppmの1/2以下の 200ppmとし、以下 100ppm、50ppm、25ppm、12ppm（公比 2）に設定した。

＜13週間試験＞（００９８）

2週間試験の結果に基づき、BDF_1マウスに13週間（6時間／日、5日／週）にわたりクロロホルムを 200ppm、100ppm、50ppm、25ppm、12ppmの濃度で暴露した。その結果、クロロホルムの毒性の発現に顕著な性差がみられたため、雄と雌の結果を分けて記載する。

雄では最低暴露濃度である 12ppm群まで動物の死亡がみられた。雄の死亡時期は全例とも暴露開始から7日以内であった。死亡例の病理組織学的検査では腎臓、鼻腔及び肝臓などに変化が認められ、主な死因は腎臓障害と考えられた。生存例は体重増加の抑制が全投与期間にわたり認められたが、対照群に対する投与群の体重の範囲は89%～98%であった。また、病理組織学的検査でも腎臓や鼻腔などに投与による影響を認めたが、その程度は軽

度であった。

雌では全投与群とも全例が投与終了時まで生存し、体重も投与初期に抑制傾向を示したものの試験中期から回復した。200ppm群は血液学検査でＭＣＶと血小板数の増加、血液生化学的検査値で尿素窒素、総蛋白、アルブミン、ＧＯＴ、ＧＰＴ及びＡＬＰ活性の増加、また、病理組織学的で鼻腔に骨化生および呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化、肝臓に異型肝細胞出現及び小葉中心性の壊死と空胞変性を認めた。100ppm群では血液学検査で血小板数の増加、血液生化学的検査値で尿素窒素、総蛋白及びアルブミンの増加を認めた。病理組織学的では鼻腔に骨化生および呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化、肝臓に異型肝細胞出現を認めたが、その程度は軽度であった。50ppm群では血液学検査で血小板数の増加、血液生化学的検査値で尿素窒素の増加、病理組織学的で鼻腔に軽度な骨化生および呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化を認めた。25ppm群と 12ppm群は病理組織学的で鼻腔に軽度な骨化生および呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化を認めた。

以上のように、雄では最低暴露濃度の 12ppm群まで動物の死亡がみられた。これに対し、雌では全ての投与群で全例が生存し、体重への影響も軽度であり、100ppm以下の群ではがん原性試験で動物の生存率に影響を与えると考えられる肝臓の病理組織学的変化の程度も軽度であった。

クロロホルムの投与による影響は雄と雌の間で顕著な差がみられ、投与濃度の設定に困難な問題となった。そこで、雄の死亡状況を検討してみると、動物の死亡は全例とも暴露開始から7日以内であり、この期間生存し得た動物は13週間の暴露終了まで生存していた。このことから、あらかじめ低濃度のクロロホルムに暴露させると、動物にクロロホルムに対する耐性が生じ、その後、高濃度のクロロホルムを暴露しても動物が死亡しないことが期待された。この仮説を実証するために、雄マウスについて暴露期間の前期と後期で2段階に暴露濃度を変化させる28日間試験(Appendix D)を実施した。第1段階の14日間は1群10匹、3群の構成でそれぞれ 5ppm、10ppm及び 15ppmの濃度で暴露を行った。この結果、5ppm群と 10ppm群は全例生存し、15ppmでは4例死亡した。第2段階の14日間は 5ppm群と 10ppm群の10匹を5匹づつに分け、それぞれ 30ppmまたは 90ppmで、15ppmの6匹は 90ppmの濃度で暴露を行った。この結果、暴露濃度を 5ppmから 30ppm及び 90ppmへ上げた群ではそれぞれ1匹、4匹が死亡したが、10ppmから 30ppm及び 90ppmに上げた群、ならびに 15ppmから 90ppmに上げた群ではすべて生存した。この追加試験から、あらかじめ低濃度で暴露することによって、より高濃度での暴露でも生存率を上げ得ることが明らかになった。

これらの結果から、がん原性試験の暴露濃度は 5ppmから段階的に濃度を上げて、最終的に 90ppm、30ppm、5ppmで暴露するように設定した。すなわち、90ppm群は 5ppmで2週間、10ppmで2週間、30ppmで2週間あらかじめ暴露した後、90ppmの暴露とした。30ppm群は 5ppmで2週間、10ppmで2週間あらかじめ暴露した後、30ppmの暴露とした。5ppm群は 全期間をとおして 5ppmで暴露とした。

V 文献

1. 化学工業日報社(1993)
12093の化学商品
pp.395-396,化学工業日報社,東京.

2. 化学工業日報社(1994)
12394の化学商品
pp.403,化学工業日報社,東京.

3. International Agency for Research on Cancer(1979)
Some Halogenated Hydrocarbons,IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol.20,pp.401-427.
International Agency for Research on Cancer,Lyon.

4. 日本産業衛生学会(1993)
許容濃度の勧告(1993)
産業医学,35,323-343.

5. American Conference of Governmental Industrial Hygienists.(1991)
ACGIH化学物質と物理因子のTLV 化学物質のBEI(1991～1992年度用)
日測協資料 No30,pp28,日本作業環境測定協会.

6. American Conference of Governmental Industrial Hygienists.(1986)
Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices(1986)
vol.5,pp.130-131.

7. 後藤 稠、池田正之、原 一郎編(1981)
産業中毒便覧(増補版)
pp.576-577,医科薬出版社,東京.

8. 中央労働災害防止協会(1991)
化学物質の危険・有害便覧
pp288-289,中央労働災害防止協会,東京.

9. Sweet,D.V(ed)(1987)
Registry of Toxic Effects of Chemical Substance(1985-1986)
Vol.3,pp.1548.
NIOSH,U,S.Dept.Health and Human Services,Washington,D.C.

10. National Cancer Institute(1976)
Report on Carcinogenesis Bioassay of Chloroform.
PB-264 018.
National Technical Information Service.

11. Jorgenson,T.A.,Meierhenry,E.F.,Rushbrook,C.J.,Bull,R.J. and Robinson,M.(1985)
Carcinogenicity of Chloroform in Drinking Water to Male Osborne-Mendel Rats and Female B6C3F1 Mice.
Fundamental and Applied Toxicology.,5,760-769.

12. Roe,F.J.C.,Palmer,A.K. and Worden,A.N.(1979)
Safety Evaluation of Toothpaste Containing Chloroform
1.Long-Term Studies in Mice.
Journal of Environmental Pathology and Toxicology.,2,799-819.

13. 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.