ジクロロメタンのラットを用いた吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0278

CAS Ｎｏ．75‐09‐2

平成12年3月31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

ジクロロメタンのラットを用いた
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0278

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 ···· 4
　I－1－2　構造式、示性式、分子量 ···· 4
　I－1－3　物理化学的性状等 ···· 4

I－2　被験物質の使用ロット等 ···· 5

I－3　被験物質の特性・同一性、安定性
　I－3－1　特性・同一性 ···· 5
　I－3－2　安定性 ···· 5

I－4　試験動物 ···· 6

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 ···· 7
　II－1－2　投与濃度及びその設定理由 ···· 7
　II－1－3　被験物質の発生方法と濃度調整 ···· 7
　II－1－4　被験物質の濃度測定 ···· 8

II－2　動物管理
　II－2－1　各群の使用動物数 ···· 8
　II－2－2　群分け及び個体識別方法 ···· 8
　II－2－3　飼育条件 ···· 8

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 …… 9
II－3－2　体重測定 …… 9
II－3－3　摂餌量測定 …… 9
II－3－4　血液学的検査 …… 10
II－3－5　血液生化学的検査 …… 10
II－3－6　尿検査 …… 10
II－3－7　病理学的検査 …… 10

II－4　数値処理と統計学的方法
II－4－1　数値の取り扱いと表示 …… 10
II－4－2　母数の取り扱い …… 11
II－4－3　統計処理 …… 11

II－5　試資料の保管 …… 12

III　試験成績

III－1　動物の状態観察
III－1－1　生死状況 …… 13
III－1－2　一般状態 …… 13
III－1－3　体重 …… 13
III－1－4　摂餌量 …… 14

III－2　血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査
III－2－1　血液学的検査 …… 14
III－2－2　血液生化学的検査 …… 14
III－2－3　尿検査 …… 15

III－3　病理学的検査
III－3－1　剖検 …… 15
III－3－2　臓器重量 …… 15
III－3－3　病理組織学的検査 …… 15
III－3－4　死因 …… 18

Ⅳ　考察及びまとめ

Ⅳ－1　生死状況、死因、一般状態、体重、摂餌量 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

Ⅳ－2　血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

Ⅳ－3　腫瘍性病変
　Ⅳ－3－1　雄の腫瘍性病変 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19
　Ⅳ－3－2　雌の腫瘍性病変 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20

Ⅳ－4　非腫瘍性病変 ・・ 22

Ⅳ－5　他の報告との比較 ・・・ 22

Ⅴ　結論 ・・・ 24

Ⅵ　文献 ・・・ 25

TABLES

TABLE 1 EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

TABLE 2 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

TABLE 3 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

TABLE 4 INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION OF MALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

TABLE 5 INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

TABLE 6 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

TABLE 7 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

TABLE 8 SELECTED NON NEOPLASTIC LESIONS OF MALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

TABLE 9 SELECTED NON NEOPLASTIC LESIONS OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

TABLES (CONTINUED)

TABLE 10 NEOPLASTIC LESIONS INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS IN MALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

TABLE 11 NEOPLASTIC LESIONS INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS IN FEMALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

TABLE 12 CAUSE OF DEATH OF RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURES

FIGURE 1 DICHLOROMETHANE VAPOR GENERATION SYSTEM AND INHALATION SYSTEM

FIGURE 2 SURVIVAL ANIMAL RATE OF MALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE 3 SURVIVAL ANIMAL RATE OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE 4 BODY WEIGHT CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE 5 BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE 6 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE7 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

PHOTOGRAPHS

PHOTOGRAPH 1	SUBCUTIS : FIBROMA MALE, 4000ppm, ANIMAL No. 1324 (H&E)
PHOTOGRAPH 2	MAMMARY GLAND : FIBROADENOMA MALE, 4000ppm, ANIMAL No. 1333 (H&E)
PHOTOGRAPH 3	PERITONEUM : MESOTHELIOMA MALE, 4000ppm, ANIMAL No. 1307 (H&E)
PHOTOGRAPH 4	LIVER : ACIDOPHILIC CELL FOCUS FEMALE, 4000ppm, ANIMAL No. 2304 (H&E)
PHOTOGRAPH 5	LIVER : BASOPHILIC CELL FOCUS FEMALE, 4000ppm, ANIMAL No. 2304 (H&E)
PHOTOGRAPH 6	LIVER : VACUOLATED CELL FOCUS FEMALE, 4000ppm, ANIMAL No. 2309 (H&E)
PHOTOGRAPH 7	SPLEEN : FIBROSIS MALE, 4000ppm, ANIMAL No. 1322 (H&E)

APPENDIXES

APPENDIX A 1	CLINICAL OBSERVATION : SUMMARY, RAT : MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX A 2	CLINICAL OBSERVATION : SUMMARY, RAT : FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX B 1	BODY WEIGHT CHANGES : SUMMARY, RAT : MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX B 2	BODY WEIGHT CHANGES : SUMMARY, RAT : FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX C 1	FOOD CONSUMPTION CHANGES : SUMMARY, RAT : MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX C 2	FOOD CONSUMPTION CHANGES : SUMMARY, RAT : FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX D 1	HEMATOLOGY : SUMMARY, RAT : MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX D 2	HEMATOLOGY : SUMMARY, RAT : FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX E 1	BIOCHEMISTRY : SUMMARY, RAT : MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX E 2	BIOCHEMISTRY : SUMMARY, RAT : FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX F 1	URINALYSIS : SUMMARY, RAT : MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX F 2	URINALYSIS : SUMMARY, RAT : FEMALE (2-YEAR STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX G 1	GROSS FINDINGS : SUMMARY, RAT : MALE : ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX G 2	GROSS FINDINGS : SUMMARY, RAT : MALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX G 3	GROSS FINDINGS : SUMMARY, RAT : MALE : SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX G 4	GROSS FINDINGS : SUMMARY, RAT : FEMALE : ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX G 5	GROSS FINDINGS : SUMMARY, RAT : FEMALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX G 6	GROSS FINDINGS : SUMMARY, RAT : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX H 1	ORGAN WEIGHT, ABSOLUTE : SUMMARY, RAT : MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX H 2	ORGAN WEIGHT, ABSOLUTE : SUMMARY, RAT : FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX I 1	ORGAN WEIGHT, RELATIVE : SUMMARY, RAT : MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX I 2	ORGAN WEIGHT, RELATIVE : SUMMARY, RAT : FEMALE (2-YEAR STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX J 1	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS : SUMMARY, RAT : MALE : ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX J 2	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS : SUMMARY, RAT : MALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX J 3	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS : SUMMARY, RAT : MALE : SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX J 4	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS : SUMMARY, RAT : FEMALE : ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX J 5	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS : SUMMARY,RAT :FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX J 6	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS : SUMMARY, RAT : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX K 1	NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED, RAT : MALE
APPENDIX K 2	NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED, RAT : FEMALE
APPENDIX L 1	HISTOLOGICAL FINDINGS : NEOPLASTIC LESIONS : SUMMARY, RAT : MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX L 2	HISTOLOGICAL FINDINGS : NEOPLASTIC LESIONS : SUMMARY, RAT : FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX M 1	NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS, RAT : MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX M 2	NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS, RAT : FEMALE (2-YEAR STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX N 1 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR : SUMMARY, RAT : MALE : ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)

APPENDIX N 2 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR : SUMMARY, RAT : MALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)

APPENDIX N 3 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR : SUMMARY, RAT : MALE : SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)

APPENDIX N 4 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR : SUMMARY, RAT : FEMALE : ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)

APPENDIX N 5 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR : SUMMARY,RAT:FEMALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)

APPENDIX N 6 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR : SUMMARY, RAT : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)

APPENDIX O 1 IDENTITY OF DICHLOROMETHANE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY

APPENDIX O 2 STABILITY OF DICHLOROMETHANE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY

APPENDIX P 1 CONCENTRATION OF DICHLOROMETHANE IN THE INHALATION CHAMBER OF THE 2-YEAR INHALATION STUDY

APPENDIX P 2 ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF INHALATION CHAMBER IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX Q 1 METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY AND URINALYSIS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

APPENDIX Q 2 UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

要約

ジクロロメタ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）の試験を実施した。

試験にはF344/DuCrj(Fischer)ラットを被験物質投与群3群と対照群1群の構成で各群雌雄各50匹の合計400匹を使用した。投与はジクロロメタンを1日6時間、1週5日、104週間、動物に全身暴露することにより行った。投与濃度は、雌雄ともに1000ppm、2000ppm、4000ppmとした。また、検査項目として一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

被験物質の投与期間中、雌4000ppm群に生存率の低下を認め、この群は子宮腫瘍による死亡が他の群に比較して多かった。体重は、4000ppm群の雌雄に軽い増加抑制を認めた。外部腫瘤の累積発生数は雄に投与濃度に応じた増加を認めた。内部腫瘤は、雌4000ppm群に多く触知され、その発生時期は、他の群よりも早かった。血液学的には雌の2000ppmと4000ppm群に赤血球数とヘマトクリット値の増加が示され、ジクロロメタンの投与で報告されている一酸化炭素ヘモグロビンの増加との関係が示唆された。

病理組織学的検査では雄に皮下組織の線維腫、乳腺の線維腺腫、腹膜の中皮腫の発生増加、雌に乳腺の線維腺腫の発生増加を認めた。また、非腫瘍性病変としては、雄は4000ppm群で脾臓の線維化の発生増加、鼻腔の嗅上皮の呼吸上皮化生と眼球角膜の鉱質沈着の発生減少、雌では全投与群で肝臓の好塩基性小増殖巣、2000ppm以上の群で好酸性小増殖巣と空胞性小増殖巣の増加を認めた。

以上のように、ジクロロメタンの投与により雄ラットでは皮下の線維腫と乳腺の線維腺腫及び腹膜の中皮腫の発生増加が認められ、雌ラットでは乳腺の線維腺腫の発生増加が認められた。これらの結果は、ジクロロメタンの雌雄のラットに対するがん原性を示唆する証拠（some evidence）と考えられた。

ジクロロメタンのがん原性試験における主な腫瘍発生（雄）

		投与濃度（ppm）	Control	1000	2000	4000	ペトー	コクランアミテージ
		検査動物数	50	50	50	50	検定	検定
良性腫瘍	皮下組織	線維腫	1	4	7*	12**	↑↑	↑↑
		脂肪腫	0	0	4	1		
	乳腺	線維腺腫	1	2	3	8*	↑↑	↑↑
		腺腫	1	0	0	0		
	肝臓	肝細胞腺腫	0	0	1	1		
	下垂体	腺腫	18	7**	10	12		
	甲状腺	C－細胞腺腫	9	5	7	4		
		濾胞状腺腫	0	4	0	1		
	膵臓	島細胞腺腫	6	2	4	3		
	副腎	褐色細胞腫	8	13	14	9		
	精巣	間細胞腫	45	49	48	46		
	包皮腺	腺腫	0	2	4	1		
	皮膚	角化棘細胞腫	2	4	1	2		
悪性腫瘍	皮下組織	線維肉腫	0	0	1	0		
	乳腺	腺癌	1	0	0	0		
	腹膜	中皮腫	3	1	0	7	↑	↑
	肝臓	肝細胞癌	1	0	1	2		
	脾臓	単核球性白血病	3	3	8	4		
	甲状腺	濾胞状腺癌	2	2	0	4		
	皮下組織	（線維腫/線維肉腫）	1	4	8*	12**	↑↑	↑↑
	乳腺	（線維腺腫/腺腫）	2	2	3	8*	↑↑	↑
		（線維腺腫/腺腫/腺癌）	3	2	3	8	↑↑	↑
	肝臓	（肝細胞腺腫/肝細胞癌）	1	0	2	3	↑	
	下垂体	（腺腫/腺癌）	19	7**	10*	12		

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。
＊：p≦0.05で有意　＊＊：p≦0.01で有意　（フィッシャー検定）
↑：p≦0.05で有意増加　↑↑：p≦0.01で有意増加　（ペトー、コクランアミテージ検定）

ジクロロメタンのがん原性試験における主な腫瘍発生（雌）

		投与濃度（ppm）	Control	1000	2000	4000	ﾍﾟﾄｰ	ｺｸﾗﾝｱﾐﾃｰｼﾞ
		検　査　動　物　数	50	50	50	50	検定	検定
良性腫瘍	乳腺	線維腺腫	7	7	9	14	↑↑	↑
		腺腫	0	2	1	0		
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	8	11	6	9	↑	
		平滑筋腫	0	0	0	1		
	肝臓	肝細胞腺腫	2	0	0	3		
	下垂体	腺腫	18	28*	24	19		
	甲状腺	Ｃ－細胞腺腫	5	3	7	6		
	副腎	褐色細胞腫	4	2	4	2		
悪性腫瘍	乳腺	腺癌	0	2	0	1		
	子宮	平滑筋肉腫	0	0	0	1		
		子宮内膜間質性肉腫	0	0	0	2		
	脾臓	単核球性白血病	2	4	8*	7	↑	
	乳腺	(線維腺腫/腺腫)	7	8	10	14	↑↑	
		(線維腺腫/腺腫/腺癌)	7	9	10	14	↑↑	
	子宮	(平滑筋肉腫/子宮内膜間質性肉腫)	0	0	0	3		↑↑
	下垂体	(腺腫/腺癌)	19	29*	24	19		

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。
＊：p≦0.05で有意　　＊＊：p≦0.01で有意　　(ﾌｨｯｼｬｰ検定)
↑：p≦0.05で有意増加　↑↑：p≦0.01で有意増加　(ﾍﾟﾄｰ、ｺｸﾗﾝｱﾐﾃｰｼﾞ検定)

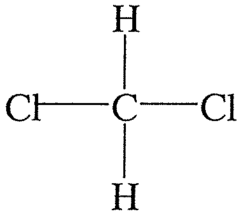
Ⅰ　試験材料

Ⅰ－1　被験物質の性状等

Ⅰ－1－1　名称等

名　　　称：ジクロロメタン（Dichloromethane）
別　　　名：二塩化メチレン
塩化メチレン
メチレンクロライド
メチレンジクロライド
CAS No.：75-09-2

Ⅰ－1－2　構造式、示性式、分子量



CH_2Cl_2（分子量：84.93）

Ⅰ－1－3　物理化学的性状等

性　　状　：揮発性の無色透明な液体
沸　　点　：39.95℃
凝 固 点　：-96.8℃
比　　重　：1.3255（20℃）
蒸 気 圧　：440mmHg（25℃）
溶 解 性　：水に微溶、エタノール、エーテルに易溶
保存条件　：室温、遮光条件下で気密容器に保存

I－2　被験物質の使用ロット等

使用ロット番号：

APR 5260	(1994年10月 20日	～1995年 1月 9日)
KCH 4634	(1995年 1月 9日	～1995年 4月 3日)
ESR 7256	(1995年 4月 4日	～1995年 6月 28日)
ESM 2924	(1995年 6月 28日	～1995年 9月 22日)
ESJ 4826	(1995年 9月 22日	～1995年12月 25日)
ESF 6669	(1995年12月 25日	～1996年 4月 1日)
DLP 1873	(1996年 4月 1日	～1996年 6月 27日)
DLL 3810	(1996年 6月 28日	～1996年 9月 26日)
DLH 5609	(1996年 9月 27日	～1996年10月 16日)

製　造　元：和光純薬工業株式会社

グレード：試薬特級

純　　度：99.9%以上

I－3　被験物質の特性・同一性、安定性

I－3－1　特性・同一性

被験物質の同一性の確認は各ロット毎の被験物質のマススペクトル及び赤外吸収スペクトルを測定し、ジクロロメタンの文献値と比較することにより行った。

その結果、マススペクトルでは文献値（文献 1）と同じ分子イオン及びフラグメントピークが認められ、また赤外吸収スペクトルでも文献値（文献 2）と同じ波数にピークが認められたことからジクロロメタンであることを確認した。

測定結果については、APPENDIX O1 に示した。

I－3－2　安定性

被験物質の安定性は使用開始前及び使用終了後に、赤外吸収スペクトル及びガスクロマトグラムを測定し、それぞれのデータを比較することにより行った。

その結果、測定結果に差はみられず、投与期間中のジクロロメタンは安定であった。

測定結果については、APPENDIX O2 に示した。

Ⅰ－4　試験動物

動物は日本チャールス・リバー（株）（神奈川県厚木市下古沢 795 番地）から購入した F344/DuCrj ラット（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 248 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 200 匹（群構成時体重範囲、雄:109～125g、雌:91～102g）を選別して試験に供した。

II 試験方法

試験計画、材料及び方法等の概要を TABLE 1 に示した。

II－1 投与

II－1－1 投与経路、投与方法及び投与期間

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。吸入チャンバー内に設定濃度に調整したジクロロメタンを含む新鮮空気を送り込み、6 時間/日、5 日間/週、104 週間（祝祭日を除く）、試験動物に全身暴露した。投与期間中の暴露回数は 490 回であった。なお、対照群には新鮮空気のみを送気した。

II－1－2 投与濃度及びその設定理由

投与濃度は雌雄とも 1000ppm、2000ppm、4000ppm（公比 2.0）とした。

投与濃度は 13 週間投与試験の結果に基づき設定した。すなわち、13 週間試験（文献 3）は、6 週齢の F344/DuCrj（Fischer）ラット 120 匹を 5 投与群と 1 対照群（各群雌雄各 10 匹）に分け、ジクロロメタン投与群の濃度を 500ppm、1000ppm、2000ppm、4000ppm、8000ppm とし、各群 1 日 6 時間、1 週 5 日間、13 週間、全身暴露して行った。

その結果、全動物に死亡はみられなかったが、8000ppm 群では雌雄ともに体重の増加抑制（最終体重は雄：対照群の 71%、雌：対照群の 88%）、雌に肝重量の増加を認めたほか、病理組織学的検査で雄の腎臓に好酸体の発生率の減少を認めた。4000ppm 群では雌雄とも体重に軽度の増加抑制（最終体重は雄：対照群の 93%、雌：対照群の 92%）を認めたが、摂餌量、臓器重量、尿検査、剖検、及び病理組織学的検査では対照群と顕著な差を認めなかった。2000ppm 以下の群では雌雄とも体重、摂餌量、臓器重量、尿検査、剖検及び病理組織学的検査で対照群と顕著な差を認めなかった。

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を FIGURE 1 に示した。まず、発生容器内のジクロロメタンを循環式恒温層で加熱（30℃）しながら、清浄空気のバブリングにより蒸発させた。次に、このジクロロメタン蒸気を循環式恒温槽で一定温度（18℃）に冷却、再加熱（30℃）し、新鮮空気と混合して一定濃度に調整した後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバーのラインミキサーに供給した。最終的には、吸入チャンバー内のジクロロメタン濃度をガスクロマトグラフにより測定・監視しながら、吸入チャンバーへの供給流量を調節することにより、チャンバー内濃度を設定濃度に調整した。

II－1－4　被験物質の濃度測定

吸入チャンバー内のジクロロメタン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。

測定結果については、APPENDIX P1に示した。

各投与群における被験物質濃度の測定結果（平均値±標準偏差）は、1000ppm 群:999.9±6.5ppm、2000ppm 群:2003.2±9.0ppm、4000ppm 群:3988.5±25.7ppm であった。

II－2　動物管理

II－2－1　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、各群雌雄各50匹の動物を用いた。

群 名 称	雄使用動物数（動物番号）	雌使用動物数（動物番号）
対照群	50匹　(1001～1050)	50匹　(2001～2050)
1,000 ppm	50匹　(1101～1150)	50匹　(2101～2150)
2,000 ppm	50匹　(1201～1250)	50匹　(2201～2250)
4,000 ppm	50匹　(1301～1350)	50匹　(2301～2350)

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、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を合計した値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 4）。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫及び馴化期間においては色素塗布により、投与期間においては耳パンチにより識別した。なお、全飼育期間を通してケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した部屋に収容し、室扉には試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

II－2－3　飼育条件

動物は、検疫室（517、518室）で1週間の検疫飼育を行った後、馴化及び投与期間中は512室に設置した吸入チャンバー内で飼育した。試験に使用した検疫室、吸入チャンバー室

及び吸入チャンバー内の環境条件を Table 1 に示した。

投与期間の吸入チャンバー内の飼育環境は、温度 23±2℃、湿度 55±15%、暴露中換気回数 6±0.5 回/時、飼育中換気回数 12±1 回/時、圧力 0～－15mmAq に、吸入チャンバーが設置されている飼育室の飼育環境は温度 23±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/時に設定した。その結果、吸入チャンバー内環境はすべて設定条件の範囲内であった。また、投与期間中の吸入チャンバー内環境の計測結果については、APPENDIX P2 に示した。

検疫期間中は 1 ケージ当り 5 匹の群飼（ステンレス製網ケージ 340W×294D×176H 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 125W×216D×176H 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 150W×216D×176H 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㈱千葉工場（千葉県千葉市美浜区新港 8-2）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、飲水は飼育全期間を通して、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、自動給水により自由摂取させた。

なお、飼料の、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 番 1 号）の分析データを使用ロットごとに入手し、飲料水については（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 3 ヶ月毎に分析を委託し、それぞれ試験計画書に規定した許容基準と比較して異常のないことを確認した。

II－3　観察・検査項目及び方法

II－3－1　動物の一般状態の観察

投与期間中は生死及び瀕死の確認を毎日 1 回以上行い、全動物の一般状態の観察を週 1 回行った。

II－3－2　体重測定

投与開始後 14 週までは週 1 回（第 1 週は投与開始日と最終日の合計 2 回測定）、それ以降は 4 週に 1 回、体重を測定した。

なお、動物の死亡発見時及び切迫屠殺時にも体重を測定した。

II－3－3　摂餌量測定

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回給餌量及び残餌量を測定し（104 週にも測定）、その値から摂餌量を算出した。

II－3－4　血液学的検査

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EDTA-2K入り採血管に採血した血液を用いて血液学的検査を行った。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 Q1に示した。

II－3－5　血液生化学的検査

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血液生化学的検査を行った。なお、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 Q1に示した。

II－3－6　尿検査

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 Q1に示した。

II－3－7　病理学的検査

（1）剖検

全動物について剖検を行った。

（2）臓器重量

定期解剖時まで生存した動物についてTABLE 1に示した臓器の実重量を測定した。また、実重量の体重比、すなわち定期解剖時の体重に対する百分率を算出した。

（3）病理組織学的検査

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組織を、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。

II－4　数値処理と統計学的方法

II－4－1　数値の取り扱いと表示

チャンバー内被験物質濃度についてはppmを単位として、小数点以下第4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を単位として、小数点以下第1位まで計測し、小数点以下第1位を四

捨五入して整数で表示した。

摂餌量についてはｇを単位として、計測期間を通しての摂餌量を小数点以下第 1 位まで計測し、この値を計測期間の日数で除し、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。

臓器実重量についてはｇを単位として、小数点以下第 3 位まで計測して表示した。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 Q2 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、それから欠測となったデータを除いて母数とした。

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を除いて母数とした。

尿検査は、投与最終週まで生存した動物を対象に行い、検査ができた動物数を母数とした。

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。ただし、腫瘍性病変については臓器別に、検査不能臓器数を除いたものを母数とした。

II－4－3　統計処理

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 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。

腫瘍性病変については、各臓器腫瘍ごとに、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto 検

定（文献 5）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また、Peto 検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス（注）を用いて、死亡率法（コンテックス 3,4 を付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテックス 0,1,2 を付与された腫瘍についての検定）、死亡率法＋有病率法（コンテックス 0～4 の総計で検定）を行った。

χ^2検定と Fisher 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。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

0：定期解剖例にみつかった腫瘍

1：死亡／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍

2：多分 1 だと思うが、確かでない腫瘍

3：多分 4 だと思うが、確かでない腫瘍

4：死亡／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関わっていた腫瘍

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、被験物質、その他本試験に係る資料は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 5 年間とする。

III　試験成績

III－1　動物の状態観察

III－1－1　生死状況

生死状況をTABLE 2,3及びFIGURE 2,3に示した。

雌4000ppm群の生存率は他の雌の群に比較して低値であった。

各群の104週における生存動物数(生存率)は、雄では対照群32/50例(64%)、1000ppm群43/50例(86%)、2000ppm群38/50例(76%)、4000ppm群28/50例(56%)、雌では対照群45/50例(90%)、1000ppm群40/50例(80%)、2000ppm群43/50例(86%)、4000ppm群30/50例(60%)であった。

III－1－2　一般状態

一般状態の観察結果をAPPENDIX A1,A2に、外部腫瘤及び内部腫瘤の発生動物数をTABLE 4,5に示した。

一般状態の観察からは被験物質の投与による特徴的な所見は死亡/瀕死動物及び生存動物のいずれにも認められなかった。

外部腫瘤の累積発生例数は雄:対照群10/50例、1000ppm群18/50例、2000ppm群18/50例、4000ppm群24/50例、雌：対照群11/50例、1000ppm群7/50例、2000ppm群9/50例、4000ppm群12/50例であり、雄投与群での発生が多くみられた。内部腫瘤の累積発生数は雄：対照群2/50例、1000ppm群1/50例、2000ppm群3/50例、4000ppm群5/50例、雌：対照群0/50例、1000ppm群2/50例、2000ppm群2/50例、4000ppm群9/50例であり、雌4000ppm群に内部腫瘤が多く触知された。また雌に内部腫瘤が触知され始めた時期は1000ppm群92-104週、2000ppm群79-91週、4000ppm群49-52週であり、雌4000ppm群に内部腫瘤の早期発生が認められた。

III－1－3　体重

体重の推移をTABLE 2,3、FIGURE 4,5及びAPPENDIX B1,B2に示した。

4000ppm群の雄は試験2週から78週まで対照群の93%から97%範囲で推移し、雌は全期間を通じて対照群の92%から97%の範囲で推移した。この期間の体重値は雌雄とも対照群と比較して有意に低く、雄で3%から7%、雌で3%から8%の体重増加抑制が認められた。最終計測値（試験104週）は対照群に対して、雄：1000ppm群106%、2000ppm群101%、4000ppm群101%、雌：1000ppm群99%、2000ppm群100%、4000ppm群93%であった。

III－1－4　摂餌量

摂餌量の推移をTABLE 6,7、FIGURE 6,7 及びAPPENDIX C1,C2に示した。

雄では各投与群において投与期間前半の摂餌量が低値を示す傾向が認められ、4000ppm群では1～26、38、42、58週で対照群の90%から97%、2000ppm群では1～5、9、11～18、38、54週で93%から97%、1000ppm群では12、13、26、38週で96%から98%であった。一方、投与期間終盤（78週以降）の摂餌量では高値を示す傾向が認められ、4000ppm群では86、90、98、102、104週で対照群の108%から113%、2000ppm群では86週で110%であった。

雌では4000ppmと2000ppm群で投与期間前半の摂餌量が低値を示す傾向が認められ、4000ppm群では1～10、12、14週で対照群の90～95%、2000ppm群では6～9、12、22、54週で93～96%であった。一方、投与期間後半の摂餌量では対照群とほとんど差がみられなかった。

III－2　血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

III－2－1　血液学的検査

血液学的検査の結果をAPPENDIX D1,D2に示した。

雄では、2000ppmと4000ppm群にMCVとMCHの増加を認めた。

雌では、2000ppmと4000ppm群に赤血球数とヘマトクリット値の増加を認めた。

このほか、雄の2000ppm群の血小板数に統計学的に有意な差を認めたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

III－2－2　血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果をAPPENDIX E1,E2に示した。

雄では、全投与群に総コレステロール、トリグリセライド及びリン脂質の減少、並びにGOTの増加を、2000ppm以上の群にカリウムと塩素の増加を認めた。

雌では、全投与群にグルコースとトリグリセライドの減少を、4000ppm群にカリウムと無機リンの増加を認めた。

このほか、雄では2000ppm群のA/G比、1000ppmと2000ppm群のGPT、1000ppm群のLDH、雌では全投与群のCPK、1000ppmと2000ppm群のGOT、GPT及びLDH、2000ppm群の総コレステロールに統計学的に有意な差を認めたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ－2－3　尿検査

尿検査の結果を APPENDIX F1,F2 に示した。

雌雄ともに対照群と各投与群の間に有意な差を認めなかった。

Ⅲ－3　病理学的検査

Ⅲ－3－1　剖検

解剖時に認められた剖検所見を APPENDIX G1～G6 に示した。

雄では、皮下の腫瘤を対照群 5/50 例、1000ppm 群 12/50 例、2000ppm 群 17/50 例、4000ppm 群 20/50 例に認め、投与濃度に対応した増加が示された。また、腹膜の結節を対照群 2/50 例、1000ppm 群 1/50 例、4000ppm 群 7/50 例に認めた。腎臓の表面が顆粒状を呈する所見を対照群 41/50 例、1000ppm 群 38/50 例、2000ppm 群 32/50 例、4000ppm 群 31/50 例に認め、投与濃度に対応した減少が示された。

雌では皮下の腫瘤を対照群 10/50 例、1000ppm 群 12/50 例、2000ppm 群 10/50 例、4000ppm 群 15/50 例に認めた。子宮における結節や腫瘤の発生は対照群 3/50 例、1000ppm 群 4/50 例、2000ppm 群 4/50 例、4000ppm 群 9/50 例であった。このほか、腹水の貯留を 4000ppm 群のみ 4/50 例に認めた。

Ⅲ－3－2　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 H1,H2、I1,I2 に示した。

雌は肝臓の実重量と体重比の高値を全投与群で、脾臓の実重量と体重比の高値を 4000ppm 群に認めた。また、心臓は体重比の高値を 4000ppm 群で、実重量の高値を全投与群で認めたが、実重量の変化は投与濃度と対応した変化ではなかった。

このほか雄 1000ppm 群の肺、肝臓及び脳の体重比に統計学的な有意差を認めたが投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ－3－3　病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果を APPENDIX J1～J6 に、その中の主な非腫瘍性病変を TABLE 8,9 に抜粋して示した。腫瘍性病変の結果は、APPENDIX K1,K2 に担腫瘍動物数と腫瘍数、APPENDIX L1,L2 に腫瘍の種類別の発生数、APPENDIX M1,M2 に統計解析（Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定）、APPENDIX N1～N6 に転移性病変を示し、主な腫瘍性病変を TABLE 10,11 に抜粋した。

－雄の主な病変－

腫瘍性病変

＜皮下組織＞

線維腫が対照群の 1/50 例、1000ppm 群の 4/50 例、2000ppm 群の 7/50 例、4000ppm 群の 12/50 例に発生し、Peto 検定（有病率法、死亡率法＋有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が、Fisher 検定で 2000ppm 以上の群に対照群と比較して有意な増加が示された。

なお、皮下の線維腫の発生部位は肉眼所見の記録から全て乳腺の分布領域と一致していたが、組織学的に乳腺に発生した証拠がないことから皮下腫瘍として扱った。

＜乳腺＞

線維腺腫が対照群の 1/50 例、1000ppm 群の 2/50 例、2000ppm 群の 3/50 例、4000ppm 群の 8/50 例に発生し、Peto 検定（有病率法、死亡率法＋有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示され、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。なお、対照群には腺腫と腺癌が 1 例ずつ発生していて、これら対照群にみられた腺腫と腺癌の発生に線維腺腫の発生を合わせても Peto 検定（有病率法、死亡率法＋有病率法)と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示された。

＜肝臓＞

肝細胞腺腫が 2000ppm と 4000ppm 群に 1/50 例ずつ発生、肝細胞癌が対照群の 1/50 例、2000ppm 群の 1/50 例、4000ppm 群の 2/50 例に発生した。肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生はそれぞれ単独では有意な差は示されなかったが、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生では Peto 検定（有病率法）で有意な増加傾向が示された。

＜腹膜＞

中皮腫が対照群の 3/50 例、1000ppm 群の 1/50 例、4000ppm 群の 7/50 例に発生し、2000ppm 群には発生がなく、Peto 検定（死亡率法＋有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示された。

その他、下垂体の腺腫の発生では 1000ppm 群に、腺腫と腺癌を複合した発生では 1000ppm 群と 2000ppm 群にそれぞれ Fisher 検定で有意な減少が示されたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

非腫瘍性病変

＜鼻腔＞

嗅上皮の呼吸上皮化生が 4000ppm 群で有意な減少となった。

＜脾臓＞

線維化が 4000ppm 群で有意な増加となった。

＜眼球＞

角膜の鉱質沈着が 4000ppm 群で有意な減少となった。

その他、鼻腔の鉱質沈着、嗅上皮の好酸性変化、異物性鼻炎及び嗅上皮の萎縮、肺の間質性肺炎、脾臓の鬱血、心臓の心筋線維症、肝臓の小葉周辺性の脂肪化、好酸性小増殖巣、好塩基性小増殖巣、空胞性小増殖巣、肝海綿状変化、脂肪化及び胆管増生、腎臓の慢性腎症、尿細管の好塩基性変化及びヘモジデリン沈着、下垂体の過形成、副腎髄質の過形成ならびに精巣の萎縮の発生は投与群と対照群の間で有意な変化が示されたが投与濃度に対応したものではなかった。

－雌の主な病変－

腫瘍性病変

＜乳腺＞

線維腺腫が対照群の 7/50 例、1000ppm 群の 7/50 例、2000ppm 群の 9/50 例、4000ppm 群の 14/50 例に発生し、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示された。このほかに、腺腫が 1000ppm 群に 2/50 例と 2000ppm 群に 1/50 例、腺癌が 1000ppm 群に 2/50 例と 4000ppm 群に 1/50 例発生した。

＜子宮＞

子宮内膜間質性ポリープの発生は対照群の 8/50 例、1000ppm 群の 11/50 例、2000ppm 群の 6/50 例、4000ppm 群の 9/50 例にみられ、Peto 検定（死亡率法）で有意な増加傾向が示された。

4000ppm 群では子宮内膜間質性肉腫が 2/50 例、平滑筋肉腫が 1/50 例に発生した。これらの腫瘍発生はそれぞれ単独では有意な変化として示されなかったが、子宮内膜間質性肉腫に組織形態学的に類似する平滑筋肉腫を合わせた発生では Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示された。このほか平滑筋腫の発生を 4000ppm 群に 1/50 例認めた。

＜脾臓＞

単核球性白血病が対照群の 2/50 例、1000ppm 群の 4/50 例、2000ppm 群の 8/50 例、4000ppm 群の 7/50 例に発生し、Peto 検定（死亡率法、死亡率法＋有病率法）で有意な増加傾向が示され、Fisher 検定で 2000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。

その他、下垂体の腺腫及び腺腫と腺癌を複合した発生では 1000ppm 群に Fisher 検定で

有意な増加が示されたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

非腫瘍性病変

＜肝臓＞

好塩基性小増殖巣が全投与群で、好酸性小増殖巣と空胞性小増殖巣が 2000ppm 以上の群で有意な増加となった。

＜腎臓＞

慢性腎症が全投与群で有意な減少となった。

その他、鼻腔の嗅上皮の好酸性変化、呼吸上皮の好酸性変化及び甲介骨の肥厚、肺の間質性肺炎、肝臓の小葉周辺性の脂肪化、腎尿細管の好塩基性変化及び下垂体の血管拡張、子宮の嚢胞状内膜過形成、ハーダー腺の変性ならびに鼻涙管の炎症に投与群と対照群の間で有意な差が示されたが投与濃度に対応した変化ではなかった。

III－３－4　死因

病理学的にみた死亡/瀕死例の死因を TABLE 12 に示した。

雄の死亡/瀕死例では投与群に特徴的な死因はなかった。

雌の死亡/瀕死例では他の群よりも低生存率となった 4000ppm 群（死亡/瀕死 20 例）の死因は白血病 4/50 例、下垂体腫瘍 4/50 例、甲状腺腫瘍 1/50 例、卵巣腫瘍 1/50 例、子宮腫瘍 6/50 例、腎臓病変 2/50 例、その他 4/50 例で子宮腫瘍が死因となった例が他の群に比較して多かった。死因となった子宮腫瘍の種類は子宮内膜間質性ポリープ、子宮内膜肉腫及び平滑筋肉腫であった。2000ppm 以下の群で子宮腫瘍が死因となった例は 1000ppm 群の 1/50 例だけであった。

Ⅳ　考察及びまとめ

Ⅳ－1　生死状況、死因、一般状態、体重、摂餌量

最終計測週（104 週）での生存率は、雄では対照群 64%、1000ppm 群 86%、2000ppm 群 76%、4000ppm 群 56%、雌では対照群 90%、1000ppm 群 80%、2000ppm 群 86%、4000ppm 群 60%であった。雌 4000ppm 群での生存率の低下は当該群で子宮腫瘍を死因とした例が多くみられたことが要因と考えられた。

4000ppm 群の体重は、雄では 78 週までは対照群の 93%から 97%、雌は全期間を通じて対照群の 92%から 97%の範囲で推移し軽度の抑制が示されたが、一般状態の観察では被験物質投与によると思われる所見は見られなかった。

外部腫瘤の累積発生例数では雄投与群にほぼ投与濃度に応じた増加が見られた。雄の外部腫瘤の累積発生例数の増加は病理組織学的検査で観察された皮下組織と乳腺の良性腫瘍の増加に対応するものであった。

内部腫瘤の累積発生数では雌 4000ppm 群に内部腫瘤が多く触知された。雌で触知された内部腫瘤の多くは、病理組織学的検査の結果から子宮と脾臓に発生した腫瘍性病変に相当するものと考えられた。

Ⅳ－2　血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査

血液学的検査では雌の 2000ppm と 4000ppm 群では赤血球数とヘマトクリット値が対照群よりも高値であり、赤血球系の軽度な造血亢進が示唆された。この変化はジクロロメタンの投与で報告されている血中の一酸化炭素ヘモグロビンの増加によるもの（文献 6、8）と考えられた。雄では被験物質投与による赤血球系の造血亢進は、はっきりと示されなかった。

なお、病理組織学的検査では雌雄とも投与群に骨髄での造血亢進や脾臓での髄外造血亢進の増加は認められなかった。

Ⅳ－3　腫瘍性病変

Ⅳ－3－1　雄の腫瘍性病変

＜皮下組織＞

皮下組織の線維腫が対照群で 2%(1/50 例)、1000ppm 群で 8%(4/50 例)、2000ppm 群で 14% (7/50 例)、4000ppm 群で 24%(12/50 例)に発生し、Peto 検定（有病率法、死亡率法＋有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が、Fisher 検定で 2000ppm 以上の群に対照群と比較して有意な増加が示された。4000ppm 群での皮下組織の線維腫の発生は当センターでのヒストリカルコントロールデータ（平均 7.4%、範囲 2-14%）の範囲を超

えていた。したがって、この皮下組織の線維腫の発生増加はジクロロメタン投与による影響と考えられた。

＜乳腺＞

乳腺の線維腺腫が対照群で 2%(1/50 例)、1000ppm 群で 4%(2/50 例)、2000ppm 群で 6%(3/50 例)、4000ppm 群で 16%(8/50 例)に発生し、Peto 検定（有病率法、死亡率法＋有病率法)と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加がそれぞれ示された。4000ppm 群での乳腺の線維腺腫の発生は当センターでのヒストリカルコントロールデータ（平均 2%、範囲 0-6%）の範囲を超えていた。したがって、この乳腺の線維腺腫の発生増加はジクロロメタン投与による影響と考えられた。

＜肝臓＞

肝細胞腺腫が 2000ppm と 4000ppm 群で 2%(1/50 例)ずつ発生、肝細胞癌が対照群で 2%(1/50 例)、2000ppm 群で 2%(1/50 例)、4000ppm 群で 4%(2/50 例)発生した。肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生は単独ではそれぞれ統計学的に有意な変化として示されなかったが、4000ppm 群での肝細胞癌の発生は当センターでのヒストリカルコントロールデータ（平均 0.3%、範囲 0-2%）の範囲を超えていた。また、肝細胞癌の発生に肝細胞腺腫の発生を合わせると Peto 検定（有病率法）で有意な増加傾向が示された。これらの結果は被験物質の投与と肝臓腫瘍（肝細胞癌 / 肝細胞腺腫）の発生との関連を示唆するものの、肝臓腫瘍の発生例数が少なく肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生増加がジクロロメタン投与の明らかな影響であるとは言えなかった。

なお、肝細胞腺腫の当センターでのヒストリカルコントロールデータは平均 2%、範囲 0-6%となっている。

＜腹膜＞

中皮腫が対照群で 6%(3/50 例)、1000ppm 群で 2%(1/50 例)、4000ppm 群で 14%(7/50 例)に発生し、Peto 検定（死亡率法＋有病率法)と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示された。4000ppm 群での腹膜中皮腫の発生は当センターでのヒストリカルコントロールデータ（平均 2.3%、範囲 0-8%）の範囲を超えていた。したがって、この腹膜の中皮種の発生増加はジクロロメタン投与による影響と考えられた。

Ⅳ－3－2　雌の腫瘍性病変

＜乳腺＞

乳腺の線維腺腫が対照群で 14%(7/50 例)、1000ppm 群で 14%(7/50 例)、2000ppm 群で 18%(9/50 例)、4000ppm 群で 28%(14/50 例)に発生し、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示された。4000ppm 群での乳腺の線維腺腫の

発生は当センターでのヒストリカルコントロールデータ（平均 9.2%、範囲 0-20%）を超えていた。したがって、乳腺の線維腺腫の発生増加はジクロロメタンの投与による影響と考えられた。

＜子宮＞

子宮内膜間質性ポリープの発生が対照群で 16%(8/50 例)、1000ppm 群で 22%(11/50 例)、2000ppm 群で 12%(6/50)、4000ppm 群で 18%(9/50 例)であり、Peto 検定（死亡率法）で有意な増加が示されたが、病理組織学的に確認された子宮内膜間質性ポリープの発生は各投与群とも当センターのヒストリカルコントロールデータ（平均 14.6%、範囲 2-28%）の範囲内であった。このほか、4000ppm 群に悪性腫瘍である子宮内膜間質性肉腫 4%(2/50 例)と平滑筋肉腫 2%(1/50 例)の発生も見られた。この両腫瘍の発生はいずれも統計学的に有意な変化ではなかったが、4000ppm 群での子宮内膜間質性肉腫の発生は当センターでのヒストリカルコントロールデータ（平均 0.4%、範囲 0-2%）の範囲を超えており、また、子宮内膜間質性肉腫に組織形態学的に類似する平滑筋肉腫を合わせた発生では Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示された。しかし、ジクロロメタン投与と子宮内膜間質性肉腫や平滑筋肉腫の発生増加との関連については、それぞれの発生が少数例にとどまっていたことから明らかとは言えなかった。

雌 4000ppm 群は生存率が他の群よりも低かった。この群は、一般状態の観察で子宮腫瘍と考えられる内部腫瘤が早期に触知され始め、病理組織学的にも子宮腫瘍が死因とされた例が他の群より多かった。これらのことから、この群の生存率が低くなった要因として子宮腫瘍の発生が考えられた。

＜脾臓＞

単核球性白血病が対照群で 4%(2/50 例)、1000ppm 群で 8%(4/50 例)、2000ppm 群で 16%(8/50 例)、4000ppm 群で 14%(7/50 例)に発生し、Peto 検定（死亡率法、死亡率法＋有病率法)で有意な増加傾向が、Fisher 検定で 2000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。しかし、各投与群での単核球性白血病の発生は当センターのヒストリカルコントロールデータ（平均 14.6%、範囲 8-26%）の範囲内であることから単核球性白血病が被験物質の投与によって増加したとは言えなかった。

以上のように、ジクロロメタンの投与により雄ラットでは皮下の線維腫と乳腺の線維腺腫及び腹膜の中皮腫の発生増加が認められ、雌ラットでは乳腺の線維腺腫の発生増加が認められた。これらの結果はジクロロメタンの雌雄のラットに対するがん原性を示唆する証拠（some evidence）と考えられた。

Ⅳ－4　非腫瘍性病変

雄では 4000ppm 群に脾臓の線維化の発生増加、また、鼻腔の嗅上皮の呼吸上皮化生と眼球角膜の鉱質沈着の発生減少が認められた。雌では全ての投与群に肝臓の好塩基性小増殖巣の発生増加と慢性腎症の発生減少、2000ppm 以上の群に好酸性小増殖巣と空胞性小増殖巣の発生増加が認められ、これらの変化はジクロロメタン投与との関連が示唆された。

Ⅳ－5　他の報告との比較

ラットを用いた長期毒性・発がん性試験の主な報告は、経気道投与によるものとして Burek J.D. *et al.*,1984(文献 6)、Nitschke K.D. *et al.*,1988(文献 8)、米国 NTP,1986(文献 7)の報告、経口投与によるものとしては Serota.D.G.*et al.*,1986(文献 9) の報告があげられる。経気道投与による試験の結果では、いずれの報告でも雌雄とも乳腺の良性腫瘍の発生増加が認められ、当センターの試験結果と一致していた。 また、当センターの試験では明らかにジクロロメタンの影響と考えらる中皮腫の発生もみられた。中皮腫の発生については、NTP の試験でも統計学的に有意な増加がみられたが、試験を実施した施設のヒストリカルコントロールデータとの比較から NTP ではジクロロメタンの影響としては取り上げられなかった。以下に各報告の概要を示した。

経気道投与による試験

Burek J.D. *et al.*はジクロロメタンを 500ppm、1500ppm、3500ppm の濃度で 6 時間/日、5 日/週、2 年間、Sprague-Dawley(SD)ラットの雌雄に吸入させた。その結果、雄は 1500ppm と 3500ppm 群で、雌は暴露濃度に相関して乳腺の良性腫瘍の総発生個数が増加した。乳腺の悪性腫瘍については発生率、個体当たり発生個数ともに投与による増加はなかった。この結果について、SD ラットの乳腺にみられた良性腫瘍の発生増加は、SD ラットが乳腺腫瘍の好発系という背景にジクロロメタンの高濃度暴露が加ったものと考察した。この他、雄の頚部で唾液腺の部位に肉腫が発生し、雄 3500ppm 群では統計学的に有意となったが、この肉腫の発生にはウイルスの関与が背景として存在することが強く疑われている。また、ジクロロメタン投与群に一酸化炭素ヘモグロビンの増加を認めたが投与濃度に対応した変化でなかったと報告している。

Nitschke *et al.*は Burek *et al.*の研究よりも低濃度域での暴露の影響を調査し、ジクロロメタンを 50ppm、200ppm、500ppm の濃度で 6 時間/日、5 日/週、2 年間、SD ラットの雌雄に吸入させた。その結果、全投与群で血中一酸化炭素ヘモグロビンのレベルの増加が暴露濃度に応じて認められ、病理組織学的に雌 500ppm 群で乳腺の良性腫瘍が発生した個体当

たりの腫瘍発生個数の増加（自然発生腫瘍の発生個数の増加）と多核肝細胞の出現率の増加を、雌雄の 500ppm 群に肝細胞の脂肪化の出現率の増加を報告している。また、彼等はジクロロメタン 500ppm を試験期間 2 年のうち前半の 1 年間だけに暴露した群と、後半の 1 年間だけに暴露した群も併せて設置した。その結果、乳腺の良性腫瘍が発生した個体当たりの腫瘍発生個数と多核肝細胞の出現率についてみると、ジクロロメタン 500ppm を前半の 1 年間だけに暴露した群の結果と 2 年間暴露した群の結果が類似し、ジクロロメタン 500ppm を後半の 1 年間だけ暴露した群の結果と対照群の結果が類似していた。彼等は、前半の 1 年間だけに暴露した群と、後半の 1 年間だけに暴露した群で乳腺の良性腫瘍が発生した個体当たりの腫瘍発生個数と多核肝細胞の出現率に違いが生じた原因は主としてジクロロメタンの暴露を受けてからラットに変化が現れるまでの潜伏期にあると考えた。この報告で Nitschke *et al.*はジクロロメタン長期暴露の SD ラットに対する No-adverse-effect level を 200ppm と判断した。

NTP はジクロロメタンを 1000ppm、2000ppm、4000ppm の濃度で 6 時間/日、5 日/週、2 年間、F344 ラットの雌雄に吸入させた。その結果、乳腺の良性腫瘍（線維腺腫の発生、または腺腫と線維腺腫を合わせた発生）が雌雄とも有意な増加傾向、雄 4000ppm 群と雌の全投与群での発生は対照群と比較して有意な増加となった。また、雄は乳腺の分布領域に発生した皮下腫瘍の発生（線維腫の発生、または線維腫と線維肉腫を合わせた発生）でも有意な増加傾向となった。このほか、雄では精索から発生した中皮腫が対照群 0/50 例、1000ppm 群 1/50 例、2000ppm 群 4/50 例及び 4000ppm 群 4/50 例発生した。中皮腫の 4000ppm 群での発生は対照群と比較して有意な増加となり、傾向検定でも有意な増加傾向となった。この中皮腫の発生増加については、NTP が試験の実施を委託した施設での中皮腫のヒストリカルコントロールデータ（吸入試験）が 4%（4/100 例）であったことから、対照群での中皮腫の発生が少なかったとしてジクロロメタン投与の影響とはしなかった。

経口投与による試験

Serota.D.G.*et al.*はジクロロメタン 5 mg/kg bw/day、50 mg/kg bw/day、125 mg/kg bw/day、250 mg/kg bw/day を飲み水に混じて 104 週間、F344 ラットの雌雄に経口投与した。また、ジクロロメタン 250 mg/kg bw/day を 78 週間投与後 26 週間休薬させた群（250 mg/kg bw/day 投与－休薬群）も併せて設置した。その結果、病理組織学的に変化がみとめられたのは肝臓だけであり、肝臓にみられた変化として非腫瘍性病変では変異肝細胞巣、脂肪変性（オイルレッド O 染色陽性）が、腫瘍性病変では腫瘍性結節（現在の腫瘍分類では肝細胞腺腫に相当）と肝細胞癌が報告されている。非腫瘍性病変では、変異肝細胞巣は雌雄とも統計学的に増加傾向を示し、5 mg/kg bw/day 投与群以外の全ての投与群で非投与群と比較して有意な増加となった。脂肪変性も 5 mg/kg bw/day 投与群以外の全ての投与群で非

投与群と比較して有意な増加となった。250 mg/kg bw/day 104 週間投与群と 250 mg/kg bw/day 投与－休薬群で比較すると変異肝細胞巣は同程度にみとめられたが、脂肪変性の程度は休薬群の方が軽くなっていた。腫瘍性病変では、雌の肝臓で腫瘍性結節の発生と腫瘍性結節と肝細胞癌を合わせた発生が統計学的に有意な増加傾向となった。しかし、この試験ではジクロロメタン 50 mg/kg bw/day 投与群と 250 mg/kg bw/day 投与群の肝腫瘍発生率が試験施設のヒストリカルコントロールデータ（平均 8%、範囲 0-16%）に近い値であり、この試験での対照群での肝腫瘍発生がヒストリカルコントロールデータに比べて少なかったことから雌投与群での肝腫瘍の発生増加を否定した。

なお、雄にはジクロロメタン 104 週間の投与で肝腫瘍の発生増加はみられず、雌雄とも肝臓以外の組織には有意な腫瘍の発生増加はなかった。この報告で、ジクロロメタンには投与に関連した発がん性は認められず、Serota,D.G .*et al.*は毒性学的、病理組織学的に非腫瘍性病変についての Non-observable-effect level は雌雄とも 5 mg/kg/day という結論がだされた。

V　結論

F344/DuCrj(Fischer)ラットを用いてジクロロメタンの 2 年間（104 週間）にわたる吸入によるがん原性試験をおこなった結果より以下の結論を得た。

雄ラットにジクロロメタンの投与による皮下の線維腫、乳腺の線維腺腫及び腹膜の中皮腫、の発生増加が認められ、これらの結果は雄ラットに対するジクロロメタンのがん原性を示唆する証拠（some evidence）と考えられた。

雌ラットには乳腺の線維腺腫の発生増加が認められ、この結果はジクロロメタンの雌ラットに対するのがん原性を示唆する証拠（some evidence）と考えられた。

非腫瘍性病変としては、雄は 4000ppm 群で脾臓に線維化の増加及び鼻腔嗅上皮に呼吸上皮化生と眼球角膜の鉱質沈着の減少、雌の肝臓に全投与群で好塩基性小増殖巣の増加、2000ppm 以上の群で好酸性小増殖巣と空胞性小増殖巣の増加を認めた。

このほか、血液学的検査で雌の 2000ppm 以上の群に赤血球数とヘマトクリット値の増加が認められ、ジクロロメタンの投与で報告されている一酸化炭素ヘモグロビンの増加との関連が示唆された。

Ⅵ 文献

1. Heller, S. R. and Milne, G.W.A. (1978)
EPA/NIH Mass Spectral Data Base Vol.1,pp53.
U.S.Government Printing Office, Washington.

2. 和光純薬工業からの提供資料 (1987)

3. 日本バイオアッセイ研究センター (2000)
ジクロロメタンのラットを用いた吸入による 13 週間毒性試験報告書

4. 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.

5. Peto,R.,Pike,M.C.,Day,N.E.,Gary,R.G.,Lee,P.N.,Parish,S.,Peto,J.,Richrds,S.and Wahrendorf,J.(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,
IARC monographs,suppl.2,pp.311-426,International Agency for Reserch on Cancer,Lyon.

6. Burek J.D., Nitschke K.D., Bell T.J.,et al.(1984)
Methylene chloride:a two-year inhalation toxicity and oncogenicity study in rats and hamsters.
Fundam. Appl. Toxicol.，4，30-47

7. NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (1986)
Toxicology and carcinogenesis studies of dichloromethane.
Technical report series No.306
U.S. Department of Health and Human Services.

8. Nitschke K.D.,Burek J.D., and Bell T.J.,et al.(1988)
Methylene Chloride:a two-year inhalation toxicity and oncogenicity study in rats.
Fundam. Appl. Toxicol., 11, 48-59

9. Serota D.G.,Thakur A.K.,and Ulland B.M..(1986)
A two-year drinking-water study of dichloromethane in rodents. I .Rats
Fd Chem. Toxic. , 24, 951-958