

平成 16 年度、環境省請負業務報告書

複数媒体汚染化学物質環境安全性点検評価調査業務報告書

平成 17 年 3 月

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

目 次

	頁
調査概要	1
1 . 調査目的	1
2 . 調査内容	1
3 . 調査結果	2
調査方法と結果	4
1 . 複数媒体曝露による長期試験	4
2 . 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究.....	12
総括	29
1 . 複数媒体曝露による長期試験	29
2 . 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究.....	30

調査概要

1. 調査目的

P R T R制度の導入や環境汚染の実態調査（黒本調査）により、化学物質が大気や水、土壌等に排出され、一般環境中から広範囲に検出される現状が把握されつつある。特に大気系、水系等にまたがって存在している有害化学物質については、単一の媒体からの曝露よりも人の健康により大きな影響（複数媒体影響）を与えることが懸念されている。本調査における平成 14 年度までに得られた成果によると、クロロホルムは複数媒体曝露により腫瘍の発生が顕著に増加することが確認された。平成 15 年度は、水系、大気系のいずれの環境中においても検出される化学物質のうち、*N,N*-ジメチルホルムアミドとベンゼンについて複数媒体曝露による予備的な動物実験（28 日間反復投与試験）また、これらの物質とトルエンについて血液や標的臓器における投与物質や代謝物の濃度を測定し、次年度の長期試験の対象化学物質を選定した。

これまでの結果にもとづき、平成 16 年度は、*N,N*-ジメチルホルムアミドについて長期複数媒体曝露影響に関する調査を開始するとともに、クロロホルムを用いて複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究を実施した。

2. 調査内容

（1）複数媒体曝露による長期試験

ラットに *N,N*-ジメチルホルムアミドを2年間にわたり複数媒体（吸入及び経口）曝露し、一般状態観察、体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査及び病理組織学的検査等を実施するための長期動物試験（試験計画の詳細は資料 1-1 を参照）を開始した。

本年度は、長期試験用の複数媒体曝露装置の改造、実験準備及び投与・観察（1ヶ月）を実施した。

(2) 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究

クロロホルムをラットに複数媒体曝露(吸入曝露及び経口曝露)で5日間繰り返し曝露し、血液及び組織(肝臓、腎臓、脂肪)中のクロロホルムの濃度を測定し、1日間曝露した血液及び組織中のクロロホルムの濃度と比較し、体内蓄積について検討した。

3. 調査結果

(1) 複数媒体曝露による長期試験

長期複数媒体曝露装置の吸入チャンバー9台に450匹の雄性ラットを50匹ずつ分けて収容し、*N,N*-ジメチルホルムアミド(以下DMF)を複数媒体曝露、すなわち、DMFを400ppm、200ppm及び0ppm(対照)の濃度に調製した空気の吸入(全身曝露)とDMFを1600ppm、800ppm及び0ppm(対照)の濃度に調製した飲水の経口投与(飲水の自由摂取)を組合わせた計9群構成での吸入と経口の同時投与による長期試験を開始した。

動物の死亡が、3週-6日に5群:吸入200ppm+経口1600ppm群で一例認められた。その死因は、剖検所見よりDMFの複数媒体曝露による肝臓障害の可能性が高いと思われた。

一般状態の観察では、複数媒体曝露1週目に、8群:吸入400ppm+経口1600ppm群で20/50匹、7群:吸入400ppm+経口800ppm群で16/50匹及び6群:吸入400ppm+経口0ppm群で17/50匹に立毛が認められた。しかし、3週目以降は、DMF複数媒体曝露によると思われる明らかな臨床症状は、全く認められていない。

体重の推移では、主として吸入濃度に依存した体重増加の抑制が見られた。また、5群:吸入200ppm+経口1600ppm群、4群:吸入200ppm+経口800ppm群及び3群:吸入200ppm+経口0ppm群では、経口投与濃度に依存した体重の増加抑制がみられた。

摂餌量及び摂水量の推移においても、体重の増加抑制と良く一致した低下傾向がみられた。

(2) 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究

クロロホルムをラットに複数媒体曝露(吸入曝露及び経口曝露)で5日間繰り返し曝露し、血液及び組織(肝臓、腎臓、脂肪)中のクロロホルムの濃度を測定し、1日間曝露した血液及び組織中のクロロホルムの濃度と比較した結果、クロロホルムの血液及び組織中濃度は5日間曝露と1日間曝露でほぼ同じであり、繰り返し曝露による肝臓、腎臓、脂肪における体内蓄積は認められなかった。

調査方法と結果

1 . 複数媒体曝露による長期試験

【材料及び方法】

(1) 被験物質

- ・名称 : *N,N*-ジメチルホルムアミド (*N,N*-Dimethylformamide)
- ・略称 : DMF (以下、この略称を使用)
- ・CAS No. : 68 - 12 - 2
- ・製造元 : 和光純薬工業株式会社
- ・グレード : 試薬特級
- ・ロット番号 : CEE 4042
- ・純度 : 99.5%以上
- ・保管条件 : 室温、遮光条件下で気密容器に保管

(2) 実験動物及び飼育管理

実験動物 : F344/DuCrj 雄性ラット (SPF)

飼育環境

環境	検疫期間	馴化・曝露期間	
	検疫室 (713, 714 室)	吸入試験室 (704, 712 室)	吸入チャンバー (CH-1 ~ 9)
温度	23 ± 2	22 ± 2	23 ± 2
湿度	55 ± 15 %	-	55 ± 15 %
照明	12 時間点灯(8:00 ~ 20:00) /12 時間消灯(20:00 ~ 8:00)	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	15 ~ 17 回 / 時	12 ± 1 回 / 時
ケージへの動物 収容方法	群飼 (5 匹 / ケージ)		単飼
ケージの材質	ステンレス製 ラット群飼網ケージ		ステンレス製 ラット 5 連網ケージ
ケージ寸法	W340 × D294 × H176 (mm) / 5 匹		W150 × D270 × H176 (mm) / 1 匹

飼料 : CRF-1 固型飼料 (30KGy 線照射滅菌飼料)

飲水 : 脱イオン水 (秦野市水をフィルターでろ過し、紫外線照射、脱イオンして、さらにフィルターろ過したもの。) で所定の濃度に調製した被験物質混合飲水を飲水として加圧式自動給水装置により自由摂取させた。

(3) 群番号、群名称、動物番号及び動物数等

			吸入濃度 (ppm)		
			0	200	400
経口投与濃度 (ppm)	0	(群番号) 0 (群名称) 吸入 0+経口 0 ppm (動物番号) 1001 - 1050 (動物数) 50 匹	3 吸入 200+経口 0 ppm 1301 - 1350 50 匹	6 吸入 400+経口 0 ppm 1601 - 1650 50 匹	
	800	(群番号) 1 (群名称) 吸入 0+経口 800 ppm (動物番号) 1101 - 1150 (動物数) 50 匹	4 吸入 200+経口 800 ppm 1401 - 1450 50 匹	7 吸入 400+経口 800 ppm 1701 - 1750 50 匹	
	1600	(群番号) 2 (群名称) 吸入 0+経口 1600 ppm (動物番号) 1201 - 1250 (動物数) 50 匹	5 吸入 200+経口 1600 ppm 1501 - 1550 50 匹	8 吸入 400+経口 1600 ppm 1801 - 1850 50 匹	

(4) 曝露方法

被験物質の曝露方法は、吸入チャンバー内の動物に 1 日 6 時間の全身曝露による吸入 (経気道投与) と被験物質混合飲水の自由摂取による経口投与を組み合わせ、複数媒体曝露 (吸入及び経口投与) とした。

それぞれの投与方法は以下のとおりとした。

吸入

イ) 経路

全身曝露による経気道投与

ロ) 期間

群構成日の翌日から 5 週-7 日までの期間、週 5 日 (祝祭日を除く) 6 時間 / 日とした。

ハ) 濃度

400 ppm 及び 200 ppm の 2 段階 (公比 2.0) の濃度を設定した。

なお、吸入 0 ppm 群 (群番号 : 0,1,2) のチャンバーは新鮮空気のみを換気した。

二) 発生方法と濃度監視・調整

発生容器内の DMF を一定温度下で清浄空気のバブリングにより蒸発させる。この DMF 蒸気を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 DMF 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、DMF の吸入チャンバーへの供給量を調節した。

経口投与

イ) 経路

飲水の自由摂取による経口投与

ロ) 期間

群構成日から 5 週-7 日までの期間、7 日 / 週、24 時間 / 日の連続投与とした。

ハ) 濃度

1600 ppm 及び 800 ppm の 2 段階 (公比 2.0) の濃度を設定した。

なお、経口 0 ppm 群 (群番号 : 0,3,6) の動物には、被験物質混合飲水の調製に用いる脱イオン水 (市水 : 秦野市水道局供給水をフィルターでろ過し、紫外線照射、脱イオンして、さらにフィルターろ過したもの) のみを自由摂取させた。

二) 被験物質混合飲水の調製・投与方法

調製は、DMF を市水 : 秦野市水道局供給水をフィルターでろ過し、紫外線照射、脱イオンして、さらにフィルターろ過した水 (以下、脱イオン水) に回転混合により溶解して行った。

投与は、調製済みの被験物質混合飲水の入った加圧式給水タンクに圧縮空気導管を接続し、エアーコンプレッサーで加圧 (0.5 kg/cm²) し、一定の圧力 (許容範囲 : 0.4 ~ 0.6 kg/cm²) を加わえた後、給水配管へのステンレス導管 (内径 3 mm) と加圧式給水タンクを接続し、各ノズルから動物に自由摂取させることにより行った。

被験物質混合飲水の調製頻度は加圧式給水タンクの交換頻度に合わせ週 1 回とし、調製日は交換日の前日とした。

(5) 観察・測定・検査項目及び方法

動物の一般状態の観察

検疫及び馴化期間には、動物導入時（検疫開始日：-2週-1日）、最終検疫時（馴化開始日：-1週-1日）及び群構成時（馴化最終日：0週-0日）に、全動物について詳細な一般状態の観察、その他の日は毎日1回、全動物について生死確認を行った。

投与期間には、全動物について、毎週1回、基準日（各週-7日）に詳細な一般状態の観察、及び基準日以外の日は毎日1回、生死確認を行った。

体重測定

検疫及び馴化期間には、全動物について、動物導入時（検疫開始日：-2週-1日）、最終検疫時（馴化開始日：-1週-1日）及び群構成時（馴化最終日：0週-0日）に測定した。

投与期間には、全動物について、毎週、各週内の基準日（各週-7日）に測定した。また、死亡動物の搬出時にも行った^{注)}。

摂餌量の測定

投与期間には、全動物（個体別）について、毎週、各週内の基準日（各週-7日）に摂餌量の測定を行った。

摂餌量（1匹1日当たり）は、原則として、給餌量（残餌量測定週の前週の7日）と残餌量（残餌量測定週の7日）の差を7日間で除して算出した。

摂水量の測定

投与期間には、加圧ポンベ毎に、毎週、各週内の基準日（各週-7日）に摂水量の測定を行った。

摂水量（1匹1日当たり）は、原則として、給水時の加圧ポンベ全体重量（残水量測定週の前週の7日）と残水量測定時の加圧ポンベ全体重量（残水量測定週の7日）の差を計測週内の生存延べ匹・日数で除して算出した。

注) 3週-6日に群番号：5（吸入200ppm+経口1600ppm群）の動物番号：1504が死亡発見された。

経口からの被験物質の摂取量

摂水量（1匹1日当たり）、設定濃度（1600 ppm、800 ppm）及び摂水量測定週の動物の平均体重を用いて、体重1kg当りの1日の被験物質摂取量（g/kg/day）を算出した。

吸入濃度の測定

吸入チャンバー内のDMF濃度（ppm）は、15分毎に、ガスクロマトグラフにより測定した。

【結果】

（1）動物の生死状況

動物の生死状況を TABLE 1 に示した。

3週6日に群番号：5（吸入200ppm+経口1600ppm群）の動物番号：1504が死亡した。

一方、他の群では動物の死亡は全く認められなかった。

（2）一般状態の観察所見

一般状態の観察結果を TABLE A-1～A-9（個体別表）に示した。

群構成時（投与開始前）には、全ての動物は健康状態が良好で、一般状態に異常な所見は認められなかった。

1週（投与開始後はじめての一般状態の詳細観察）では、立毛が8群：吸入400ppm+経口1600ppm群で20/50匹、7群：吸入400ppm+経口800ppm群で16/50匹及び6群：吸入400ppm+経口0ppm群で17/50匹に認められた。この所見は2週には8群の1匹を除いて全く認められなくなった。

3週以降は全ての群で一般状態に異常はみられなかった。

なお、死亡動物（動物番号：1504）には、死亡発見時に尿による外陰部周囲の汚染がみられただけで、投与開始以降死亡発見まで異常所見は認められなかった。

(3) 体重

体重測定の結果を FIGURE 1 (群別の体重推移)、TABLE 2 (総括表) 及び TABLE B-1 ~ B-9 (個体別表) に示した。

群構成時の体重は各群ともに 124 ± 7 g になり、良く揃っていた。

1 週 (投与開始後はいじめでの測定) には、主として吸入濃度に依存した体重増加の抑制が見られた。すなわち、各群の体重を対照群である吸入 0 ppm+経口 0 ppm 群 (以下、0 群) の体重に対する百分率でみると、吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群 (以下、8 群) が 88%、吸入 400 ppm+経口 800 ppm 群 (以下、7 群) が 89%、吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群 (以下、6 群) が 90%、吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 群 (以下、5 群) が 89%、吸入 200 ppm+経口 800 ppm 群 (以下、4 群) が 94%、吸入 200 ppm+経口 0 ppm 群 (以下、3 群) が 97%、吸入 0 ppm+経口 1600 ppm 群 (以下、2 群) が 95% 及び吸入 0 ppm+経口 800 ppm 群 (以下、1 群) が 100% であった。この体重増加の抑制は、複数媒体曝露を重ねることによりさらに顕著となり、5 週では、0 群 : 100 % に対して、8 群 : 79 %、7 群 : 80 %、6 群 : 84 %、5 群 : 88 %、4 群 : 94 %、3 群 : 98 %、2 群 : 96 % 及び 1 群 : 102% であった。吸入 200 ppm の 5、4 及び 3 群では、経口投与濃度に依存した増加抑制の加算が明確であった。

なお、死亡動物 (動物番号 : 1504) の体重推移は、0 週 0 日 : 116g、1 週 7 日 : 123g、2 週 7 日 : 153g、3 週 6 日 (死亡発見時) : 156g であった。

(4) 摂餌量

摂餌量測定の結果を FIGURE 2 (群別の摂餌量推移)、TABLE 3 (総括表) 及び TABLE C-1 ~ C-9 (個体別表) に示した。

1 週目 (曝露開始後はいじめでの測定) から、主として吸入濃度に依存した摂餌量の低下が見られ、各群の摂餌量は、0 群 : 100 % に対して、8 群 : 80 %、7 群 : 80 %、6 群 : 83 %、5 群 : 83 %、4 群 : 89 %、3 群 : 94 %、2 群 : 93 % 及び 1 群 : 99 % であった。それ以降 5 週目まで同様に、主として吸入濃度に依存した摂餌量の低下がみられ、5 週目の各群の摂餌量は、0 群 : 100 %

に対して、8群：91%、7群：96%、6群：108%、5群：93%、4群：101%、3群：103%、2群：97%及び1群：101%であった。

なお、3週6日（2005年3月15日）に死亡が発見された動物（動物番号：1504）の摂餌量推移は、1週7日：11.4g、2週7日：13.3g及び3週6日（死亡発見時）：11.1gであった。

（5）摂水量

摂水量測定の結果を FIGURE 3（群別の摂水量推移）、TABLE 4 に示した。

1週目（曝露開始後はじめての測定）から、複数媒体曝露濃度に依存した摂水量の低下が見られ、各群の摂水量は、0群：100%に対して、8群：74%、7群：77%、6群：79%、5群：72%、4群：79%、3群：83%、2群：77%及び1群：88%であった。それ以降5週目まで同様に、複数媒体曝露濃度に依存した摂水量の低下が見られ、各群の摂水量は、0群：100%に対して、8群：61%、7群：58%、6群：63%、5群：62%、4群：79%、3群：84%、2群：71%及び1群：88%であった。

（6）経口投与した被験物質の摂取量

経口投与した被験物質の摂取量を TABLE 5 に示した。

（7）吸入した被験物質の曝露濃度

吸入チャンバー内の被験物質の曝露濃度の測定結果を TABLE 6（総括表）及び TABLE D-1～D-6 に示した。

設定濃度は、チャンバー番号：CH-3、CH-4、CH-5 を 200ppm、チャンバー番号：CH-6、CH-7、CH-8 を 400ppm として吸入チャンバー内の DMF を調製・曝露した。

これまでの濃度監視結果より、吸入チャンバー内の DMF 濃度は、ほぼ設定濃度どおりであった。

(8) 死亡動物 (動物番号 : 1504) の剖検所見

死亡発見直後に動物を解剖し、肉眼的観察を行ったところ、肝臓の小葉像明瞭及び胸腺の赤色班の所見がみられた。

【まとめ】

長期複数媒体曝露装置の吸入チャンバー9 台に 450 匹の雄性ラットを 50 匹ずつ分けて収容し、*N,N*-ジメチルホルムアミド (以下 DMF) を複数媒体曝露、すなわち、DMF を 400 ppm 、 200 ppm 及び 0 ppm (対照) の濃度に調製した空気の吸入 (全身曝露) と DMF を 1600 ppm 、 800 ppm 及び 0 ppm (対照) の濃度に調製した飲水の経口投与 (飲水の自由摂取) を組合わせた計 9 群構成での吸入と経口の同時投与による長期試験を開始した。

動物の死亡が、3 週-6 日に 5 群 : 吸入 200 ppm + 経口 1600 ppm 群で一例認められた。その死因は、剖検所見より DMF の複数媒体曝露による肝臓障害の可能性が高いと思われた。

一般状態の観察では、複数媒体曝露 1 週目に、8 群 : 吸入 400 ppm+ 経口 1600 ppm 群で 20 /50 匹、7 群 : 吸入 400 ppm+ 経口 800 ppm 群で 16/50 匹及び 6 群 : 吸入 400 ppm+ 経口 0 ppm 群で 17/50 匹に立毛が認められた。しかし、3 週目以降は、DMF 複数媒体曝露によると思われる明らかな臨床症状は、全く認められていない。

体重の推移では、主として吸入濃度に依存した体重増加の抑制が見られた。また、5 群 : 吸入 200 ppm+ 経口 1600 ppm 群、4 群 : 吸入 200 ppm+ 経口 800 ppm 群及び 3 群 : 吸入 200 ppm+ 経口 0 ppm 群では、経口投与濃度に依存した体重の増加抑制がみられた。

摂餌量及び摂水量の推移においても、体重の増加抑制と良く一致した低下傾向がみられた。

2. 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究

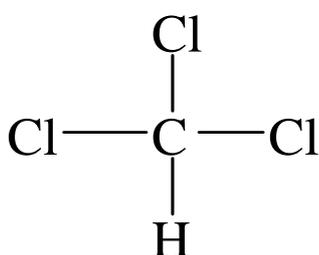
本年度は、腫瘍の発生が顕著に増加することが確認された複数媒体曝露による長期試験での曝露形態に合わせた、すなわち5日間繰り返し曝露し、血液及び組織（肝臓、腎臓、脂肪）中のクロロホルム未変化体の濃度を測定し、単回曝露した測定結果と比較することにより、複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究を行った。

【試験方法】

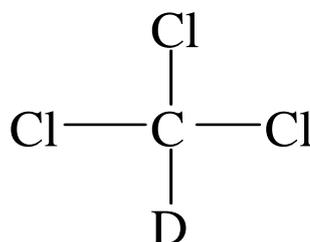
(1) 被験物質

吸入曝露に用いた被験物質は（株）和光純薬工業製のクロロホルム（純度99%）を使用した。

経口曝露に用いた被験物質は Cambridge Isotope Laboratories, Inc.製のクロロホルム-d（純度98%以上）を使用した。



吸入曝露
クロロホルム



経口曝露
クロロホルム-d

(2) 曝露方法

吸入曝露

被験物質の曝露はラットに吸入曝露装置（（株）柴田科学製）により吸入曝露を行った。吸入曝露装置の構図を FIGURE 1 及び吸入曝露中のラットの曝露状態を PHOTOGRAPH 1 に示した。被験物質供給装置（（株）柴田科学製）の発生器内のクロロホルムを一定温度下で空気のバブリングにより蒸発させ、空気と混合して、吸入曝露装置内に送気し、ラットに吸入曝露による経気道曝

露を行った。曝露期間は1日間曝露(1日/最長6時間)及び5日間曝露(4日間/6時間、5日目/最長6時間)し、曝露濃度は100ppmの曝露濃度を設定した。曝露中の吸入曝露装置内空気を曝露開始5、60、180、360分で採気し、被験物質濃度をガスクロマトグラフ(ヒューレットパッカード社HP5890A)により測定した。

ガスクロマトグラフの分析条件として、カラムはDB-WAX(0.53mmφ×5m)、キャリアーガスはヘリウム、検出器はFIDを用い、カラム温度は50、注入口温度は200、検出器温度は200、試料注入量は1mLとした。

経口曝露

被験物質の曝露はラットに経口曝露を行った。

曝露用量は55mg/kg・BWとした。動物に与える曝露量はクロロホルム-dを5.5mg/mLになるように水に溶解しラットに体重1kg当たり10mLを強制経口投与した。

複数媒体曝露

上記の吸入曝露と経口曝露を同条件下において、同時に曝露した。

(3) 使用動物

F344/DuCrjのSPF雄(12週齢)ラット(日本チャールス・リバー厚木飼育センター)を使用した。

(4) 群の構成及び各群の使用動物数

群の構成は1日間曝露群と5日間曝露群に分け、それらの動物を血液中濃度測定群と組織中濃度測定群の4群に分けた。更に血液中濃度測定群と組織中濃度測定群は対照群と単独吸入曝露群、単独経口曝露群及び複数媒体曝露群の4群の合計16群に分けた。(表参照)

	群名称	血液中濃度測定群	組織中濃度測定群
1 日 間 曝 露 群	対照群	B-C-1day	T-C-1day
	使用動物数	3匹	3匹
	単独吸入曝露群	B-I-1day	T-I-1day
	使用動物数	3匹	9匹
	単独経口曝露群	B-G-1day	T-G-1day
	使用動物数	3匹	9匹
	複数媒体曝露群	B-G+I-1day	T-G+I-1day
	使用動物数	3匹	9匹

	群名称	血液中濃度測定群	組織中濃度測定群
5 日 間 曝 露 群	対照群	B-C-5day	T-C-5day
	使用動物数	3匹	3匹
	単独吸入曝露群	B-I-5day	T-I-5day
	使用動物数	3匹	9匹
	単独経口曝露群	B-G-5day	T-G-5day
	使用動物数	3匹	9匹
	複数媒体曝露群	B-G+I-5day	T-G+I-5day
	使用動物数	3匹	9匹

* 群名称は B：血液中濃度測定群、T：組織中濃度測定群、

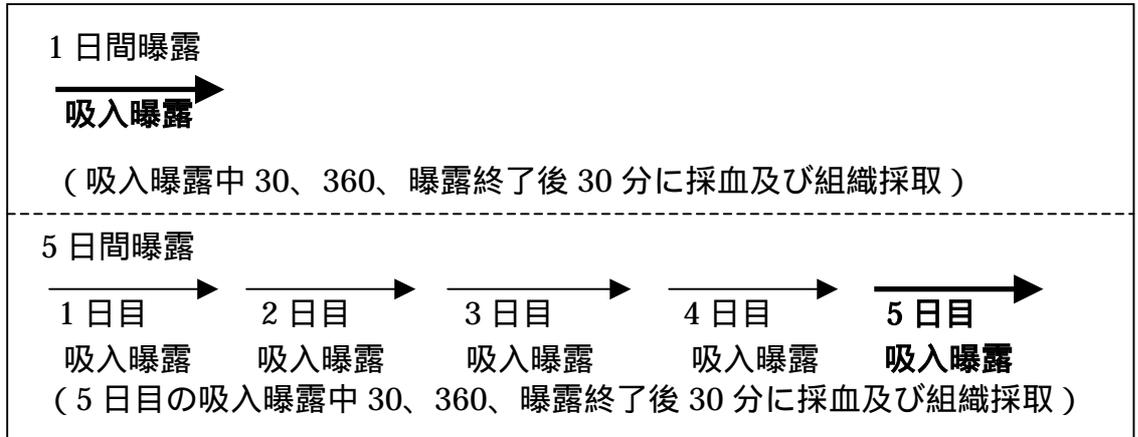
C：対照群、I：単独吸入曝露群、G：単独経口曝露群、

G+I：複数媒体曝露群、

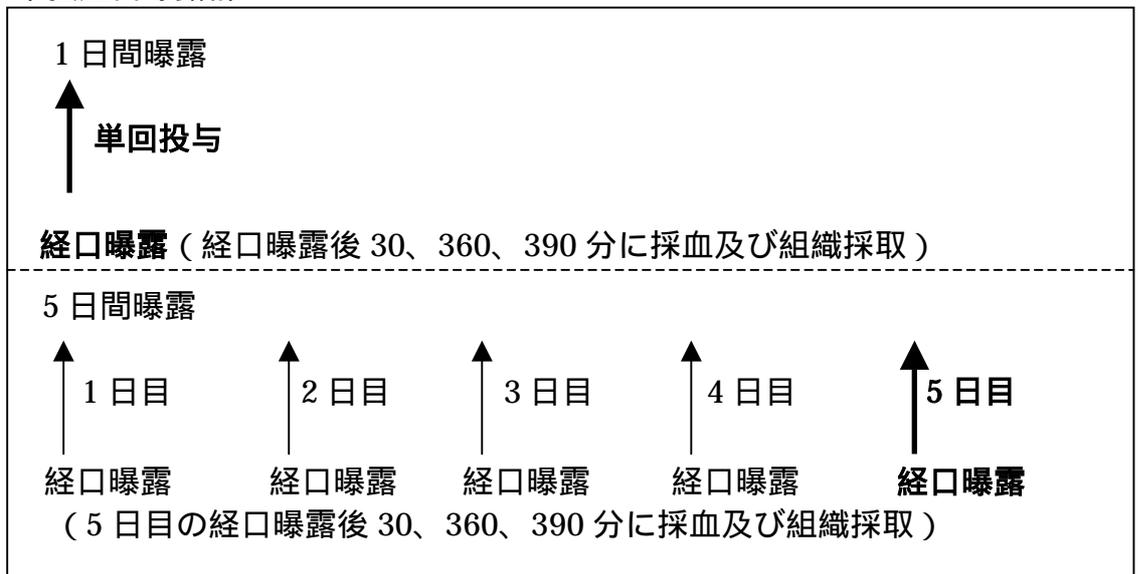
1day：1日間曝露群、5day：5日間曝露群

また、以下に、投与期間の一覧を示した。

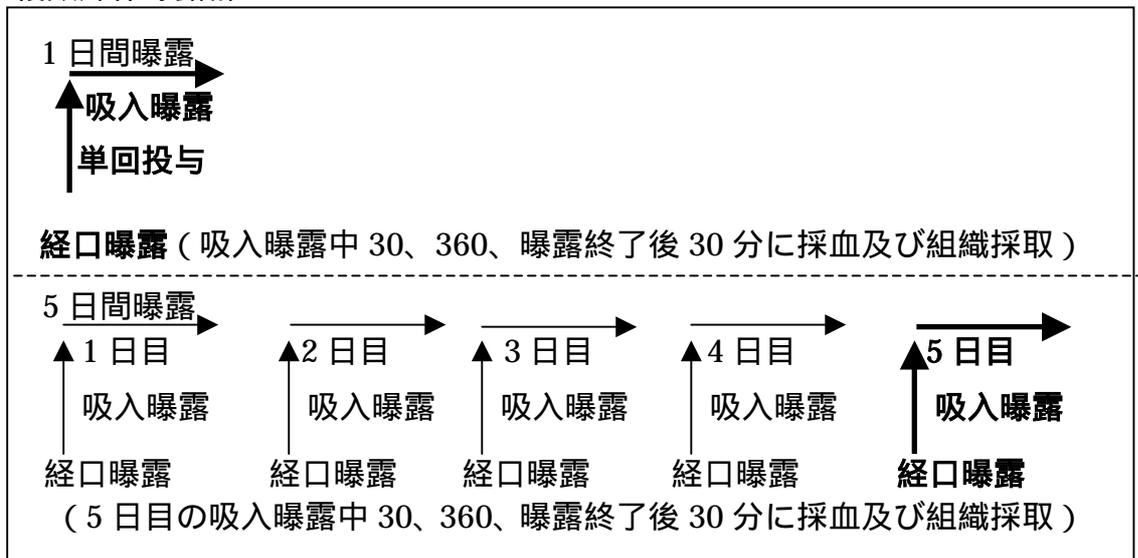
単独吸入曝露群



単独経口曝露群



複数媒体曝露群



(5) クロロホルム及びクロロホルム-d の血液及び組織中濃度測定

血液の採取

イ) 採血法

血液は動物の尾静脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した。

ロ) 採血時間

[1日間曝露群]

() 対照群

B-C-1day 群は動物導入日に採血した。

() 単独吸入曝露群

B-I-1day 群は吸入曝露中 30、360、吸入曝露終了後 30 分に採血した。

→
1 日

吸入曝露

() 単独経口曝露群

B-G-1day 群は経口曝露後 30、360、390 分に採血した。

↑
1 日

経口曝露

() 複数媒体曝露群

B-G+I-1day 群は吸入曝露中 30、360、吸入曝露終了後 30 分（経口曝露後 30、360、390 分）に採血した。

→
1 日

吸入曝露

経口曝露

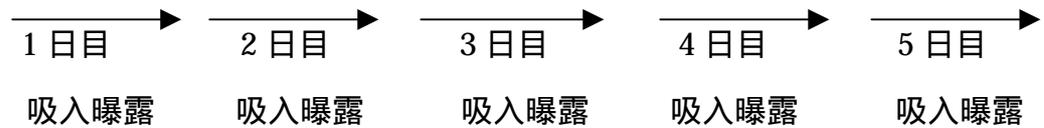
[5日間曝露群]

() 対照群

B-C-5day 群は4日間飼育し、5日目の動物から採血した。

() 単独吸入曝露群

B-I-5day 群は6時間曝露を4日間した後、5日目の吸入曝露中30、360、吸入曝露終了後30分に採血した。



() 単独経口曝露群

B-G-5day 群は強制経口投与を4日間した後、5日目の経口曝露後30、360、390分に採血した。



() 複数媒体曝露群

B-G+I-5day 群は複数媒体曝露を4日間した後、5日目の吸入曝露中30、360、吸入曝露終了後30分(経口曝露後30、360、390分)に採血した。



組織の採取

イ) 採取法

組織は動物をエ - テル麻酔下で解剖し、肝臓、腎臓、脂肪を採取した。

ロ) 採取時間

[1 日間曝露群]

() 対照群

T-C-1day 群は動物導入日に採取した。

() 単独吸入曝露群

T-I-1day 群は吸入曝露中 30、360、吸入曝露終了後 30 分に採取した。

1 日 →

吸入曝露

() 単独経口曝露群

T-G-1day 群は経口曝露後 30、360、390 分に採取した。

↑ 1 日

経口曝露

() 複数媒体曝露群

T-G+I-1day 群は吸入曝露中 30、360、吸入曝露終了後 30 分 (経口曝露後 30、360、390 分) に採取した。

↑ 1 日
↑ 吸入曝露

経口曝露

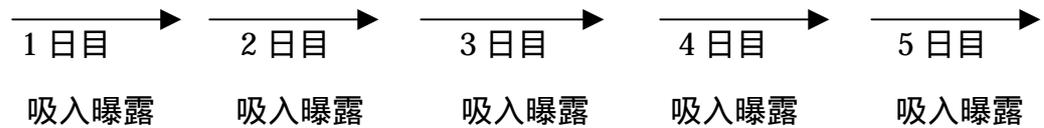
[5日間曝露群]

() 対照群

T-C-5day 群は4日間飼育し、5日目の動物から採取した。

() 単独吸入曝露群

T-I-5day 群は6時間曝露を4日間した後、5日目の吸入曝露中30、360、吸入曝露終了後30分に採取した。



() 単独経口曝露群

T-G-5day 群は強制経口投与を4日間した後、5日目の経口曝露後30、360、390分に採取した。



() 複数媒体曝露群

T-G+I-5day 群は複数媒体曝露を4日間した後、5日目の吸入曝露中30、360、吸入曝露終了後30分（経口曝露後30、360、390分）に採取した。



前処理

1 日間曝露、5 日間曝露した動物から採血・採取した血液及び組織は直ちに蒸留水の入ったヘッドスペース用のバイアルビンに一定量を入れ、密栓して分析用試料とした。

分析

イ) 使用機器

ヘッドスペース (ヒューレットパッカード社 HP7694) -GC/MS ((株) 日立製作所 M-80B)

ロ) 分析条件

ヘッドスペースの分析条件として、オープン温度は 60 、ループ温度は 80 、バイアル加温時間は 10min (血液)、30min (組織) とした。

GC/MS の分析条件として、カラムは DB-Wax (0.53mmφ × 15m)、キャリアーガスはヘリウムを用い、カラム温度は 40 、流量は 10mL/min、注入口温度は 200 、イオン化法は EI、イオン化電圧は 70eV、イオン源温度は 200 、インターフェイス温度は 200 、コレクタ - スリットは 150 μ m とした。なお、血液及び組織中濃度の定量はクロロホルムのフラグメントイオンを示す 82.946m/z、クロロホルム-d のフラグメントイオンを示す 83.953m/z のそれぞれのピークによる SIM 法により実施した。

【結果】

(1) 生死状況

全動物とも、曝露の影響による死亡はみられなかった。

(2) 体重

各群における曝露最終日における動物の体重の平均値と標準偏差を TABLE 1 に示した。

(3) 吸入曝露装置内の被験物質濃度

吸入曝露装置内の被験物質濃度は $100 \pm 1.31\text{ppm}$ であり、設定濃度 (100ppm) にきわめて近い値でラットに曝露されたことを確認した。

(4) クロロホルム及びクロロホルム-d の血液中濃度測定結果

各群におけるクロロホルム及びクロロホルム-d の血液中濃度測定結果を FIGURE 2-1 ~ 2-8 及び TABLE 2-1 ~ 2-6 に示した。なお、クロロホルム及びクロロホルム-d を曝露していない対照群 (1 日間曝露群及び 5 日間曝露群) のラットの血液中ではクロロホルム及びクロロホルム-d は認められなかった。

複数媒体曝露群

[1 日間曝露群] (FIGURE 2-1 及び TABLE 2-1)

< 吸入曝露由来 >

吸入曝露開始 30 分からラットの血液中にクロロホルムが認められ、吸入曝露開始 30 分と 360 分の濃度はほぼ同じであり、吸入曝露終了後 30 分で血液中のクロロホルムの濃度は減衰した。

< 経口曝露由来 >

経口曝露後 30 分からラットの血液中にクロロホルム-d が認められ、経口曝露後 30 分は最も高く、以後、360 分と 390 分で減衰したが、経口曝露後 390 分においても血液中にクロロホルム-d が僅かながら存在した。

[5日間曝露群] (FIGURE 2-2 及び TABLE 2-2)

< 吸入曝露由来 >

血液中のクロロホルムの濃度とその推移は複数媒体曝露群の1日間曝露群とほぼ同じであり、各採血時間における5日間曝露群の濃度に対する1日間曝露群の濃度の比率は1.0~1.1であった。

< 経口曝露由来 >

血液中のクロロホルム-dの濃度とその推移は複数媒体曝露群の1日間曝露群とほぼ同じであり、各採血時間における1日間曝露群の濃度に対する5日間曝露群の濃度の比率は1.0であった。

[加算値の比較] (FIGURE 2-3、2-4)

各採血時間における複数媒体曝露群(吸入曝露由来+経口曝露由来)の5日間曝露群の加算値に対する複数媒体曝露群(吸入曝露由来+経口曝露由来)の1日間曝露群の加算値の比率は1.0~1.1であった。

単独吸入曝露群

[1日間曝露群] (FIGURE 2-5 及び TABLE 2-3)

吸入曝露開始 30分からラットの血液中にクロロホルムが認められ、吸入曝露開始 30分と360分の濃度はほぼ同じであり、吸入曝露終了後30分で血液中のクロロホルムの濃度は減衰した。

[5日間曝露群] (FIGURE 2-6 及び TABLE 2-4)

血液中のクロロホルムの濃度とその推移は単独吸入曝露群の1日間曝露群とほぼ同じであり、各採血時間における1日間曝露群の濃度に対する5日間曝露群の濃度の比率は1.0~1.1であった。

単独経口曝露群

[1日間曝露群] (FIGURE 2-7 及び TABLE 2-5)

経口曝露後 30 分からラットの血液中にクロロホルム-d が認められ、経口曝露後 30 分は最も高く、以後、360 分と 390 分で減衰したが、経口曝露後 390 分においても血液中にクロロホルム-d が僅かながら存在した。

[5日間曝露群] (FIGURE 2-8 及び TABLE 2-6)

血液中のクロロホルム-d の濃度とその推移は単独経口曝露群の 1 日間曝露群とほぼ同じであり、各採血時間における 1 日間曝露群の濃度に対する 5 日間曝露群の濃度の比率は 0.9 ~ 1.0 であった。

血液中濃度のまとめ

吸入曝露に関しては複数媒体曝露群の吸入曝露由来の 5 日間曝露群、複数媒体曝露群の吸入曝露由来の 1 日間曝露群、単独吸入曝露群の 5 日間曝露群及び単独吸入曝露群の 1 日間曝露群における血液中濃度の経時的変化はほぼ同じ推移であった。

経口曝露に関しては複数媒体曝露群の経口曝露由来の 5 日間曝露群、複数媒体曝露群の経口曝露由来の 1 日間曝露群、単独経口曝露群の 5 日間曝露群及び単独経口曝露群の 1 日間曝露群における血液中濃度の経時的変化はほぼ同じ推移であった。

従って、蓄積に関しては血液中濃度の 5 日間曝露群と 1 日間曝露群を比較して、ほとんど同じ濃度とその推移であることから、蓄積性は認められなかった。

(5) クロロホルム及びクロロホルム-d の組織中濃度測定結果

各群におけるクロロホルム及びクロロホルム-d の組織中濃度測定結果を FIGURE 3-1 ~ 3-10 及び TABLE 3-1 ~ 3-8 に示した。なお、クロロホルム及びクロロホルム-d を曝露していない対照群 (1 日間曝露群及び 5 日間曝露群) のラットの組織中ではクロロホルム及びクロロホルム-d は認められなかった。

複数媒体曝露群

[1 日間曝露群] (FIGURE 3-1 及び TABLE 3-1)

< 吸入曝露由来 >

イ) 経時的変化

吸入曝露開始 30 分からラットの各組織 (肝臓、腎臓、脂肪) 中にクロロホルムが認められ、肝臓、腎臓の濃度は吸入曝露開始 30 分と 360 分でほぼ同じであり、吸入曝露終了後 30 分で肝臓、腎臓中のクロロホルムの濃度は減衰した。脂肪の濃度は曝露時間に伴って濃度が増加し、吸入曝露終了後 30 分で脂肪中のクロロホルムの濃度は減衰した。

ロ) 組織分布

各組織 (脳、肝臓、脂肪) 中の濃度では脂肪が他の組織に比べ高い濃度で分布した。また、各採取時間とも脂肪における含有量が他の組織に比べ、多かった。このことに関してはクロロホルムの脂溶性が高いため、脂肪への分布が多いと考えられた。

[5 日間曝露群] (FIGURE 3-2 及び TABLE 3-2)

< 吸入曝露由来 >

イ) 経時的変化

各組織中のクロロホルムの濃度とその推移は複数媒体曝露群の吸入曝露由来の 1 日間曝露群とほぼ同じであり、各採取時間における 1 日間曝露群の濃度に対する 5 日間曝露群の濃度の比率は肝臓：0.8～1.2、腎臓：0.8～1.1、脂肪：1.1～1.2 であった。

ロ) 組織分布

各組織中のクロロホルムの分布は複数媒体曝露群の吸入曝露由来の 1 日間曝露群とほぼ同じであった。

[1 日間曝露群] (FIGURE 3-3 及び TABLE 3-3)

< 経口曝露由来 >

イ) 経時的変化

経口曝露後 30 分からラットの各組織（肝臓、腎臓、脂肪）中にクロロホルム-d が認められ、経口曝露後 30 分で各組織は最も高く、以後、360 分と 390 分で減衰したが、経口曝露後 390 分においても各組織中にクロロホルム-d が存在した。

ロ) 組織分布

各組織（脳、肝臓、脂肪）中の濃度では脂肪が他の組織に比べ高い濃度で分布した。また、各採取時間とも脂肪における含有量が他の組織に比べ、多かった。このことに関してはクロロホルム-d の脂溶性が高いため、脂肪への分布が多いと考えられた。

[5日間曝露群] (FIGURE 3-4 及び TABLE 3-4)

<経口曝露由来>

イ) 経時的変化

各組織中のクロロホルムの濃度とその推移は複数媒体曝露群の経口曝露由来の1日間曝露群とほぼ同じであり、各採取時間における1日間曝露群の濃度に対する5日間曝露群の濃度の比率は肝臓：0.8～1.1、腎臓：1.1～1.2、脂肪：0.9～1.1であった。

ロ) 組織分布

各組織中のクロロホルムの分布は複数媒体曝露群の経口曝露由来の1日間曝露群とほぼ同じであった。

[加算値の比較] (FIGURE 3-5、3-6)

各採取時間における複数媒体曝露群(吸入曝露由来+経口曝露由来)の5日間曝露群の加算値に対する複数媒体曝露群(吸入曝露由来+経口曝露由来)の1日間曝露群の加算値の比率は肝臓：1.0、腎臓：1.0～1.1、脂肪：1.1～1.2であった。

単独吸入曝露群

[1日間曝露群] (FIGURE 3-7 及び TABLE 3-5)

イ) 経時的変化

吸入曝露開始30分からラットの各組織(肝臓、腎臓、脂肪)中にクロロホルムが認められ、肝臓、腎臓の濃度は吸入曝露開始30分と360分でほぼ同じであり、吸入曝露終了後30分で肝臓、腎臓中のクロロホルムの濃度は減衰した。脂肪の濃度は曝露時間に伴って濃度が増加し、吸入曝露終了後30分で脂肪中のクロロホルムの濃度は減衰した。

ロ) 組織分布

各組織（脳、肝臓、脂肪）中の濃度では脂肪が他の組織に比べ高い濃度で分布した。また、各採取時間とも脂肪における含有量が他の組織に比べ、多かった。

[5 日間曝露群] (FIGURE 3-8 及び TABLE 3-6)

イ) 経時的変化

各組織中のクロロホルムの濃度とその推移は単独吸入曝露群の 1 日間曝露群とほぼ同じであり、各採取時間における 1 日間曝露群の濃度に対する 5 日間曝露群の濃度の比率は肝臓：1.0～1.1、腎臓：0.9～1.0、脂肪：0.9～1.1 であった。

ロ) 組織分布

各組織中のクロロホルムの分布は単独吸入曝露群の 1 日間曝露群とほぼ同じであった。

単独経口曝露群

[1 日間曝露群] (FIGURE 3-9 及び TABLE 3-7)

イ) 経時的変化

経口曝露後 30 分からラットの各組織（肝臓、腎臓、脂肪）中にクロロホルム-d が認められ、経口曝露後 30 分で各組織は最も高く、以後、360 分と 390 分で減衰したが、経口曝露後 390 分においても各組織中にクロロホルム-d が存在した。

ロ) 組織分布

各組織（脳、肝臓、脂肪）中の濃度では脂肪が他の組織に比べ高い濃度で分布した。また、各採取時間とも脂肪における含有量が他の組織に比べ、多かった。

[5日間曝露群] (FIGURE 3-10 及び TABLE 3-8)

イ) 経時的変化

各組織中のクロロホルムの濃度とその推移は単独経口曝露群の1日間曝露群とほぼ同じであり、各採取時間における1日間曝露群の濃度に対する5日間曝露群の濃度の比率は肝臓：0.9～1.1、腎臓：1.0～1.1、脂肪：0.9～1.1であった。

ロ) 組織分布

各組織中のクロロホルムの分布は単独経口曝露群の1日間曝露群とほぼ同じであった。

組織中濃度のまとめ

イ) 5日間曝露群と1日間曝露群の比較

吸入曝露に関しては複数媒体曝露群の吸入曝露由来の5日間曝露群、複数媒体曝露群の吸入曝露由来の1日間曝露群、単独吸入曝露群の5日間曝露群及び単独吸入曝露群の1日間曝露群における各組織中濃度の経時的変化はほぼ同じ推移であった。

経口曝露に関しては複数媒体曝露群の経口曝露由来の5日間曝露群及び複数媒体曝露群の経口曝露由来の1日間曝露群における各組織中濃度の経時的変化はほぼ同じ推移であった。単独経口曝露群の5日間曝露群と単独経口曝露群の1日間曝露群における各組織中濃度の経時的変化はほぼ同じ推移であった。

従って、体内蓄積に関しては各組織中濃度の5日間曝露群と1日間曝露群を比較して、ほとんど同じ濃度とその推移であることから、体内蓄積性は認められなかった。

口) 複数媒体曝露群(吸入曝露由来と経口曝露由来)単独曝露群(吸入曝露と経口曝露)の比較(FIGURE 3-1~3-10及びTABLE 3-1~3-8)

吸入曝露に関しては複数媒体曝露群の吸入曝露由来と単独吸入曝露群における各組織中濃度の経時的変化はほぼ同じ推移であった。

経口曝露に関しては複数媒体曝露群の経口曝露由来における経口曝露後30分での各組織中濃度が単独経口曝露群に比べ、約2倍程度高かった。

従って、複数媒体効果に関しては複数媒体曝露群の経口曝露由来における経口曝露後30分で単独経口曝露群に比べ、複数媒体効果が認められた。

(6) 全体のまとめ

クロロホルムをラットに複数媒体曝露(吸入曝露及び経口曝露)で5日間繰り返し曝露し、血液及び組織(肝臓、腎臓、脂肪)中のクロロホルムの濃度を測定し、1日間曝露した血液及び組織中のクロロホルムの濃度と比較した結果、クロロホルムの血液及び組織中濃度は5日間曝露と1日間曝露でほぼ同じであり、繰り返し曝露による肝臓、腎臓、脂肪における体内蓄積は認められなかった。

以上の結果から、クロロホルムの未変化体の腎臓への複数媒体影響は、少なくとも5日間曝露による生体内蓄積によるものではなく、代謝過程など他のメカニズムが関係するものと思われた。

・ 総括

1. 複数媒体曝露による長期試験

長期複数媒体曝露装置の吸入チャンバー9台に450匹の雄性ラットを50匹ずつ分けて収容し、*N,N*-ジメチルホルムアミド(以下DMF)を複数媒体曝露、すなわち、DMFを400ppm、200ppmおよび0ppm(対照)の濃度に調製した空気の吸入(全身曝露)とDMFを1600ppm、800ppmおよび0ppm(対照)の濃度に調製した飲水の経口投与(飲水の自由摂取)を組合わせた計9群構成での吸入と経口の同時投与による長期試験を開始した。

動物の死亡が、3週-6日に5群:吸入200ppm+経口1600ppm群で一例認め

られた。その死因は、剖検所見より DMF の複数媒体曝露による肝臓障害の可能性が高いと思われた。

一般状態の観察では、複数媒体曝露 1 週目に、8 群：吸入 400 ppm+ 経口 1600 ppm 群で 20 /50 匹、7 群：吸入 400 ppm+ 経口 800 ppm 群で 16/50 匹および 6 群：吸入 400 ppm+ 経口 0 ppm 群で 17/50 匹に立毛が認められた。しかし、3 週目以降は、DMF 複数媒体曝露によると思われる明らかな臨床症状は、全く認められていない。

体重の推移では、主として吸入濃度に依存した体重増加の抑制が見られた。また、5 群：吸入 200 ppm+ 経口 1600 ppm 群、4 群：吸入 200 ppm+ 経口 800 ppm 群および 3 群：吸入 200 ppm+ 経口 0 ppm 群では、経口投与濃度に依存した体重の増加抑制がみられた。

摂餌量および摂水量の推移も体重の増加抑制に良く反映した低下傾向がみられた。

2 . 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究

クロロホルムをラットに複数媒体曝露（吸入曝露及び経口曝露）で 5 日間繰り返し曝露し、血液及び組織（肝臓、腎臓、脂肪）中のクロロホルムの濃度を測定し、1 日間曝露した血液及び組織中のクロロホルムの濃度と比較した結果、クロロホルムの血液及び組織中濃度は 5 日間曝露と 1 日間曝露でほぼ同じであり、繰り返し曝露による肝臓、腎臓、脂肪における体内蓄積は認められなかった。

以上の結果から、クロロホルムの未変化体の腎臓への複数媒体影響は、少なくとも 5 日間曝露による生体内蓄積によるものではなく、代謝過程など他のメカニズムが関係するものと思われた。