

平成 14 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報告書

平成 15 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	1
調査方法と結果	3
1 . 動物実験(病理組織学的検索)	3
(1) 酢酸ビニル	3
(2) 1,2-ジクロロエタン	8
(3) 結論	11
2 . 複数媒体投与による作用メカニズムに関する研究	12
(1) 試験概要	12
(2) クロロホルム	13
(3) 1,4-ジオキササン	28
(4) 1,2-ジクロロエタン	41
(5) 結論	56
3 . 文献調査	57
(1) 調査物質	57
(2) EPA	57
(3) OECD	57
総括	59

調査概要

1 業務目的

環境汚染の原因となる化学物質の中には、水系と大気系の両者に存在するものが多くある。そのため、こうした化学物質による健康への影響については、単一経路によるものだけでなく、複数経路からの生体影響を検討する必要がある。

環境省では、平成5年度より1,4-ジオキサン、クロロホルム、平成10年度より酢酸ビニル、1,2-ジクロロエタンについて動物実験による複数媒体経路（吸入曝露と経口曝露）による影響調査を実施しているところである。これまでの事業では、クロロホルムにおいて複数媒体による効果が見られ、腎臓腫瘍の発生数増加が観察された。平成14年度は動物実験による酢酸ビニル、1,2-ジクロロエタンについての複数媒体経路による影響調査として病理検査を行うとともに、複数媒体影響のメカニズム研究および文献調査を行った。

2 調査内容

(1) 動物実験

平成13年度において、酢酸ビニル及び1,2-ジクロロエタンの複数媒体（吸入曝露及び経口曝露）曝露による長期曝露（2年間）が終了した。平成14年度は、曝露が終了した動物の病理組織学的検索を実施した。

(2) 複数媒体曝露による作用メカニズムに関する研究

複数媒体曝露による健康影響の作用メカニズムを化学物質の体内動態の面から明らかにする。すなわち、化学物質の吸入曝露中の動物から血液採取の出来る装置を用いて吸入曝露と経口曝露を同時に行い、血液や主要臓器・組織における化学物質の濃度を測定した。

(3) 文献調査

化学物質の複数媒体曝露及び複数化学物質による複合曝露による健康影響に関し、文献等の調査により情報の収集及び整理を行った。

3 調査結果

(1) 動物実験

酢酸ビニルの吸入曝露と経口（飲水）曝露を組合わせた曝露（複数媒体曝露）により、鼻腔、口腔、食道、胃及び腎臓に病変が発生した。腎臓の病変（乳頭壊死）は、複数媒体曝露により吸入と経口の両者の曝露が加算された影響が認められた。鼻腔の病変は吸入のみの曝露と複数媒体曝露、また口腔、食道及び胃の病変は経口のみの曝露と複数媒体曝露で発生し、これらの病変の発生に複数媒体曝露の影響はなかった。以上のことから、酢酸ビニルへの曝露による健康影響は、酢酸ビニルと直接接触する部位である呼吸器と消化管については、それぞれ大気または水、一方のみの曝露の影響を受けるが、体内に吸収された後の影響（腎臓）については、大気及び水の両者からの影響が加算される可能性が示された。

1,2-ジクロロエタンの吸入曝露と経口（飲水）曝露を組合わせた曝露（複数媒体曝露）により、皮下組織と腹膜に腫瘍の発生、肝臓に前腫瘍性病変が発生した。これらの病変は、吸入のみ、経口のみの曝露でも発生がみられた。腹膜の腫瘍と肝臓の前腫瘍性病変の発生は、複数媒体曝露により吸入と経口の両者の曝露が加算された影響が認められた。

以上のことから、1,2-ジクロロエタンへの曝露による発がん性を含む健康影響は、大気及び水の両者からの影響が加算される可能性が示された。

(2) 複数媒体投与による作用メカニズムに関する研究

クロロホルムでは、複数媒体投与により腫瘍の顕著な増加があった腎臓の濃度は単独吸入曝露と単独強制経口投与の相加的な量に比べ、複数媒体投与により約2倍の組織中濃度の増加がみられた。1,2-ジクロロエタンについては、腹膜脂肪中の濃度に関して、複数媒体投与による効果はみられなかった。1,4-ジオキサンについては、各組織において単独吸入曝露に比べ、複数媒体投与が組織中濃度は著しく高かったものの、腫瘍発生への影響については複数媒体投与による効果はみられなかった。

(3) 文献調査

化学物質の複数媒体曝露及び複数化学物質による複合曝露による健康影響に関し、文献等の調査により情報の収集及び整理を行った。

調査対象物質は「化学物質排出把握管理促進法施行令(政令)」で「第一種指定化学物質」として指定された354物質とした。

また、複合曝露影響の調査の実際について書かれた、混合物に焦点を当てた、2つの総説文書を抄訳、検討した。

Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures (US EPA 2000)

Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures (OECD 2001)

調査方法と結果

1. 動物実験(病理組織検索)

(1) 酢酸ビニル

試験概要

化学物質の複数媒体暴露による影響を明らかにする目的で、酢酸ビニルの吸入暴露と経口（飲水）暴露を組合わせた暴露（複数媒体暴露）による2年間の長期毒性試験を実施した。すなわち、動物はラットを用い、暴露群の構成は吸入暴露（高用量、中用量、低用量）と経口（飲水）暴露を合わせた群を3群設け、比較のための群として吸入暴露のみの群を3群（高用量、中用量、低用量）、飲水暴露のみの群1群及び暴露を行っていない対照群1群を設けた。平成14年度は2年間の暴露が終了した動物の病理組織検査を実施した。

試験方法

		酢酸ビニルの複数媒体曝露による長期毒性試験																					
動物種、系統性	ラット、F344 (Fischer)																						
暴露経路	吸入 - 経口																						
暴露期間	104 週間																						
群構成	1 対照群、吸入 3 暴露群、経口(飲水) 1 暴露群、吸入 + 経口 3 暴露群 合計 8 群																						
暴露濃度	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2" rowspan="2"></th> <th colspan="2">経 口</th> </tr> <tr> <th>対照群(0 群) 0ppm</th> <th>1 群 10000ppm</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">吸 入</td> <td>対照群 (0 群) 0ppm</td> <td>50 匹</td> <td>50 匹</td> </tr> <tr> <td>1 群 125ppm</td> <td>50 匹</td> <td>50 匹</td> </tr> <tr> <td>2 群 250ppm</td> <td>50 匹</td> <td>50 匹</td> </tr> <tr> <td>3 群 500ppm</td> <td>50 匹</td> <td>50 匹</td> </tr> </tbody> </table>						経 口		対照群(0 群) 0ppm	1 群 10000ppm	吸 入	対照群 (0 群) 0ppm	50 匹	50 匹	1 群 125ppm	50 匹	50 匹	2 群 250ppm	50 匹	50 匹	3 群 500ppm	50 匹	50 匹
							経 口																
					対照群(0 群) 0ppm	1 群 10000ppm																	
吸 入					対照群 (0 群) 0ppm	50 匹	50 匹																
					1 群 125ppm	50 匹	50 匹																
	2 群 250ppm	50 匹	50 匹																				
	3 群 500ppm	50 匹	50 匹																				
動物数																							
検査項目	一般状態、体重、摂餌量、摂水量、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量、病理組織学的検査																						

病理組織学的検査

全動物について下記の器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡にて病理組織学的検査を行った。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、咽頭、器官、肺、骨髓(大腿骨)、リンパ節(腋、腹壁等)、胸腺、脾臓、心臓、口腔(上顎、下顎)、舌、唾液腺、食道、胃、小腸(十二指腸を含む)、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、乳腺、脳、脊髄、末梢神経(座骨神経)、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨、その他、肉眼的に変化のみられた器官、組織

結果

口腔、食道、前胃、鼻腔及び腎臓に酢酸ビニルの暴露と考えられる変化が認められた。

1) 口腔

腫瘍については扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌の発生がみられた。また、腫瘍以外の病変については基底細胞過形成と扁平上皮過形成の発生増加が認められた。

扁平上皮乳頭腫は、吸入単独曝露群では各曝露濃度とも発生がみられなかったのに対し、経口単独曝露群に1匹、複数媒体曝露群では吸入125+経口10000ppm群に1匹、吸入250+経口10000ppm群と吸入500+経口10000ppm群に各2匹の発生があった。

扁平上皮癌は、吸入単独曝露群では吸入500+経口0ppmに1匹、経口単独曝露群に2匹、複数媒体曝露群では吸入125+経口10000ppm群に5匹、吸入250+経口10000ppm群に2匹、吸入500+経口10000ppm群に4匹の発生があった。

基底細胞過形成は、吸入単独曝露群では各曝露濃度とも発生がみられなかったのに対し、経口単独曝露群に10匹、複数媒体曝露群では吸入125+経口10000ppm群に10匹、吸入250+経口10000ppm群と吸入500+経口10000ppm群に各12匹の発生があった。

扁平上皮過形成は、対照群の1匹、吸入単独曝露群では吸入250+経口0ppmに5匹、吸入500+経口0ppmに1匹、経口単独曝露群に1匹、複数媒体曝露群では吸入125+経口10000ppm群と吸入250+経口10000ppm群に各1匹、吸入500+経口10000ppm群に2匹の発生があった。また、異形成を有する扁平上皮過形成は、吸入単独曝露群では吸入250+経口0ppmに3匹、吸入500+経口0ppmに8匹、経口単独曝露群に11匹、複数媒体曝露群では吸入125+経口10000ppm群に13匹、吸入250+経口10000ppm群に各11匹、吸入500+経口10000ppm群に14匹の発生があった。

以上のように、口腔の腫瘍及び腫瘍以外の病変の発生は主に経口単独曝露群と複数媒体曝露群にみられたが、複数媒体曝露群と経口単独曝露群の間に明らかな発生の差が認められず、複数媒体曝露による影響はみられなかった。

2) 食道

基底細胞過形成と扁平上皮過形成の発生増加が認められた。

基底細胞過形成は、吸入単独曝露群では各曝露濃度とも発生がみられなかった。これに対し、経口単独曝露群では35匹、複数媒体曝露群では吸入125+経口10000ppm群に32匹、吸入250+経口10000ppm群に34匹、吸入500+経口10000ppm群に30匹の発生があった。

扁平上皮過形成も、吸入単独曝露群では各曝露濃度とも発生がみられなかったのに

対し、経口単独曝露群では3匹、複数媒体曝露群では吸入125 + 経口10000ppm群と吸入250 + 経口10000ppm群に各3匹、吸入500 + 経口10000ppm群に1匹の発生があった。

なお、腫瘍については、扁平上皮乳頭腫が複数媒体曝露群の吸入250 + 経口10000ppm群と吸入500 + 経口10000ppm群に各1匹、基底細胞上皮腫が吸入125 + 経口10000ppm群の1匹、また扁平上皮癌が経口単独曝露群に1匹、複数媒体曝露群では吸入125 + 経口10000ppm群に1匹の発生があった。

以上のように、食道の病変も主に経口単独曝露群と複数媒体曝露群に発生がみられたが、複数媒体曝露群と経口単独曝露群の間に明らかな発生の差が認められず、複数媒体曝露による影響はみられなかった。

3) 前胃

基底細胞過形成と扁平上皮過形成の発生増加が認められた。

基底細胞過形成は、対照群と比較して吸入単独曝露群では発生増加がみられなかったが、経口単独曝露群と複数媒体曝露群に発生増加がみられた。その発生匹数は経口単独曝露群が 24 匹に対し、複数媒体曝露群では吸入 125 + 経口 10000ppm 群と吸入 250 + 経口 10000ppm 群に各 26 匹、吸入 500 + 経口 10000ppm 群に 28 匹に発生がみられた。

扁平上皮過形成も、経口単独曝露群と複数媒体曝露群に発生増加がみられ、その発生匹数は経口単独曝露群が 9 匹に対し、複数媒体曝露群では吸入 125 + 経口 10000ppm 群の 9 匹、吸入 250 + 経口 10000ppm 群の 8 匹、吸入 500 + 経口 10000ppm 群の 4 匹に発生がみられた。

なお、腫瘍については、扁平上皮癌の発生が対照群と吸入 125 + 経口 10000ppm 群の各 1 匹にみられただけであった。

以上のように、前胃の病変の発生も主に経口単独曝露群と複数媒体曝露群にみられたが、複数媒体曝露群と経口単独曝露群の間に明らかな発生の差が認められず、複数媒体曝露による影響はみられなかった。

4) 鼻腔

鼻腔の嗅上皮に萎縮、扁平上皮化生、空胞変性及びエオジン好性変化の発生増加が認められた。また、鼻腺には過形成の増加がみられた。

嗅上皮の萎縮は、吸入単独曝露群では吸入 500 + 経口 0ppm 群に 42 匹、複数媒体曝露群では吸入 500 + 経口 10000ppm 群に 40 匹の発生があった。これに対し、経口単独曝露群では発生がみられなかった。

扁平上皮化生は、吸入単独曝露群では吸入 500 + 経口 0ppm 群に 48 匹、複数媒体曝露群では吸入 500 + 経口 10000ppm 群に 49 匹の発生があった。これに対し、経口単独曝露群では発生がみられなかった。

空胞変性は、吸入単独曝露群では吸入 500 + 経口 0ppm 群に 13 匹、複数媒体曝露群では吸入 500 + 経口 10000ppm 群に 17 匹の発生がみられた。これに対し、経口単独曝露群では発生がみられなかった。

エオジン好性変化は、吸入単独曝露群の吸入 500 + 経口 0ppm 群と複数媒体曝露群の吸入 500 + 経口 10000ppm 群に病変の程度の増強がみられた。しかし、吸入 500 + 経口 0ppm 群と吸入 500 + 経口 10000ppm 群の間には病変の程度の差が認められなかった。

鼻腺の過形成は、吸入単独曝露群では吸入 250 + 経口 0ppm 群の 2 匹と吸入 500 + 経口 0ppm 群の 44 匹、複数媒体曝露群では吸入 250 + 経口 10000ppm 群の 1 匹と吸入 500 + 経口 10000ppm 群の 40 匹に発生がみられた。これに対し、経口単独曝露群では発生がみられなかった。

なお、腫瘍については、腺腫が吸入単独曝露群の吸入 500 + 経口 0ppm 群の 1 匹にみられただけであった。

以上のように、鼻腔の病変は吸入単独曝露群と複数媒体曝露群にみられたが、複数媒体曝露群と吸入単独曝露群の間に発生の差が認められず、複数媒体曝露による影響はみられなかった。

5) 腎臓

乳頭壊死の発生増加が認められた。

乳頭壊死は、対照群と吸入単独曝露群には発生がみられなかった。これに対し、経口単独曝露群では18匹、複数媒体曝露群では吸入125 + 経口10000ppm群に19匹、吸入250 + 経口10000ppm群に16匹、吸入500 + 経口10000ppm群に28匹の発生があった。また、乳頭壊死の程度を、病変の範囲が腎臓の乳頭部の先端から1/3以内であるものを軽度、腎臓の乳頭部の先端から1/3から2/3になるものを中等度として分類すると、経口単独曝露群及び複数媒体曝露群の吸入125 + 経口10000ppm群と吸入250 + 経口10000ppm群ではほとんどの動物が軽度であった。これに対し、吸入500 + 経口10000ppm群では8匹が中等度の病変であり、複数媒体曝露による影響を示唆する増強がみられた。

なお、慢性腎症の程度は吸入単独曝露群、経口単独曝露群及び複数媒体曝露群に程度の減弱がみられた。

まとめ

酢酸ビニルの吸入曝露と経口（飲水）曝露を組合わせた曝露（複数媒体曝露）による2年間の長期毒性試験を実施し、下記の結果を得た。

- ・酢酸ビニルの曝露により、鼻腔、口腔、食道、胃及び腎臓に病変が発生した。
- ・腎臓の病変（乳頭壊死）は、複数媒体曝露により吸入と経口の両者の曝露が加算された影響が認められた。
- ・鼻腔の病変は吸入のみの曝露と複数媒体曝露、また口腔、食道及び胃の病変は経口のみの曝露と複数媒体曝露で発生し、これらの病変の発生に複数媒体曝露の影響はなかった。

(2) 1,2-ジクロロエタン

試験概要

化学物質の複数媒体暴露による影響を明らかにする目的で、1,2-ジクロロエタンの吸入暴露と経口（飲水）暴露を組合わせた暴露（複数媒体暴露）による2年間の長期毒性試験を実施した。すなわち、動物はラットを用い、暴露群の構成は吸入暴露（高用量、中用量、低用量）と経口（飲水）暴露を合わせた群を3群設け、比較のための群として吸入暴露のみの群を3群（高用量、中用量、低用量）、飲水暴露のみの群1群及び暴露を行っていない対照群1群を設けた。平成14年度は病理組織検査を実施した。

試験方法

		1,2-ジクロロエタンの複数媒体曝露による長期毒性試験		
動物種、系統性	ラット、F344 (Fischer)			
暴露経路	雄			
暴露期間	吸入 - 経口			
群構成	104週間			
暴露濃度	1対照群、吸入3暴露群、経口(飲水)1暴露群、吸入+経口3暴露群			
動物数	合計8群			
		経口		
		対照群(0群) 0ppm	1群 1000ppm	
	吸入	対照群(0群) 0ppm	50匹	50匹
		1群 10ppm	50匹	50匹
		2群 40ppm	50匹	50匹
		3群 160ppm	50匹	50匹
検査項目	一般状態、体重、摂餌量、摂水量、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量、病理組織学的検査			

病理組織学的検査

全動物について下記の器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡にて病理組織学的検査を行った。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、咽頭、器官、肺、骨髄(大腿骨)、リンパ節(腋コウ、腹壁等)、胸腺、脾臓、心臓、口腔(上顎、下顎)、舌、唾液腺、食道、胃、小腸(十二指腸を含む)、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巢、精巢上体、精囊、前立腺、乳腺、脳、脊髄、末梢神経(座骨神経)、眼球、ハーダー腺、

筋肉、骨、その他、肉眼的に変化のみられた器官、組織

結果

腹膜、皮下組織及び肝臓に 1,2-ジクロロエタンの暴露と考えられる変化が認められた。

1) 腹膜

中皮腫の発生増加がみられた。

中皮腫の発生は、対照群が 2 匹であったのに対し、吸入単独曝露群では吸入 10 + 経口 0ppm 群に 2 匹、吸入 40 + 経口 0ppm 群に 3 匹、吸入 160 + 経口 0ppm 群に 9 匹、経口単独曝露群では 6 匹に発生がみられ、吸入 160 + 経口 0ppm 群と経口単独曝露群は対照群と比較して発生が増加していた。複数媒体曝露群では吸入 10 + 経口 1000ppm 群と吸入 40 + 経口 1000ppm 群に各 5 匹、吸入 160 + 経口 1000ppm 群に 18 匹の発生があった。吸入 10 + 経口 1000ppm 群と吸入 40 + 経口 1000ppm 群は経口単独曝露群と同程度の発生匹数であり、複数媒体暴露による影響を示さなかった。これに対し、吸入 160 + 経口 1000ppm 群の発生匹数は、吸入単独曝露群である吸入 160 + 経口 0ppm 群及び経口単独曝露群より高く、複数媒体暴露による影響を示唆する増加がみられた。また、その発生匹数は 18 匹であり、吸入 160 + 経口 0ppm 群の 9 匹と経口単独曝露群の 6 匹の合計匹数に近い値であり、吸入曝露と経口曝露の反応の加算に相当する値であった。

2) 皮下組織

線維腫の発生増加が認められた。

線維腫の発生は、対照群が 6 匹であったのに対し、吸入単独曝露群では吸入 10 + 経口 0ppm 群に 8 匹、吸入 40 + 経口 0ppm 群に 4 匹、吸入 160 + 経口 0ppm 群に 17 匹、経口単独曝露群に 10 匹の発生がみられ、吸入 160 + 経口 0ppm 群は対照群と比較して発生が増加していた。複数媒体曝露群では吸入 10 + 経口 1000ppm 群に 9 匹、吸入 40 + 経口 1000ppm 群に 10 匹、吸入 160 + 経口 1000ppm 群に 19 匹の発生があり、吸入 160 + 経口 1000ppm 群は対照群と比較して発生が増加していた。しかし、吸入 160 + 経口 0ppm 群と吸入 160 + 経口 1000ppm 群の発生を比較すると同程度であり、複数媒体暴露による影響はみられなかった。

3) 肝臓

好塩基性小増殖巣の発生増加がみられた。

好塩基性小増殖巣は、対照群が 3 匹であったのに対し、吸入単独曝露群では吸入 10 + 経口 0ppm 群に 6 匹、吸入 40 + 経口 0ppm 群に 11 匹、吸入 160 + 経口 0ppm 群に 20 匹の発生がみられ、曝露濃度に対応した発生増加が示された。経口単独曝露群には 24 匹の発生がみられ、経口単独曝露群にも発生増加が示された。複数媒体曝露群では吸入 10 + 経口 1000ppm 群に 25 匹、吸入 40 + 経口 1000ppm 群に 24 匹、吸入 160 + 経口 1000ppm 群に 32 匹の発生があった。吸入 10 + 経口 1000ppm 群と吸入 40 + 経口 1000ppm 群は経口単独曝露群と同程度の発生匹数であり、複数媒体暴露による影響を示さなかった。これに対し、吸入 160 + 経口 1000ppm 群の

発生匹数は、吸入単独曝露群である吸入 160 + 経口 0ppm 群及び経口単独曝露群より高く、複数媒体曝露による影響を示唆する増加がみられた。

なお、肝臓の腫瘍については、腺腫の発生がみられたが、各曝露群と対照群の間に発生匹数の差がみられず、曝露による発生増加は認められなかった。

まとめ

- 1,2-ジクロロエタンの吸入曝露と経口（飲水）曝露を組合わせた曝露（複数媒体曝露）による2年間の長期毒性試験を実施し、下記の結果を得た。
- ・1,2-ジクロロエタンの曝露により、皮下組織と腹膜に腫瘍の発生、肝臓に前腫瘍性病変が発生した。
- ・これらの病変は、吸入のみ、経口のみでの曝露でも発生がみられた。
- ・腹膜の腫瘍と肝臓の前腫瘍性病変の発生は、複数媒体曝露により吸入と経口の両者の曝露が加算された影響が認められた。

(3) 結論

酢酸ビニルの吸入暴露と経口（飲水）暴露を組合わせた暴露（複数媒体暴露）による2年間の長期毒性試験を実施し、下記の結果を得た。

酢酸ビニルへの曝露による生体影響は、酢酸ビニルと直接接触する部位である呼吸器と消化管については、それぞれ大気または水、一方のみの曝露の影響を受けるが、体内に吸収された後の影響（腎臓）については、大気及び水の両者からの影響が加算される可能性が示された。

1,2-ジクロロエタンの吸入暴露と経口（飲水）暴露を組合わせた暴露（複数媒体暴露）による2年間の長期毒性試験を実施し、下記の結果を得た。

1,2-ジクロロエタンへの曝露による発がん性を含む健康影響は、大気及び水の両者からの影響が加算される可能性が示された。

2. 複数媒体投与による作用メカニズムに関する研究

(1) 試験概要

複数曝露による健康影響の作用メカニズムを化学物質の体内動態の面から明らかにする。すなわち、化学物質の吸入曝露中の動物から血液を採取出来る装置を用いて吸入曝露と経口投与を同時に行い、血液や主要臓器・組織における化学物質の濃度を測定した。

(2) クロロホルム

1. 試験目的

当センタ - で、環境省の委託により、クロロホルムのラットを用いた複数媒体投与（吸入曝露及び経口投与）によるがん原性試験を実施した。今回、複数媒体投与による生体影響のメカニズムを明らかにすることを目的として、ラットにクロロホルムを吸入曝露及びクロロホルム-d を経口投与し、血液及び組織中の未変化体の濃度を経時的に測定した。

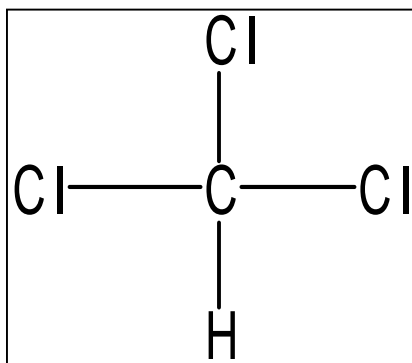
2. 試験方法

2.1 被験物質

吸入曝露に用いた被験物質の作製は（株）日本酸素に依頼した。その調製方法は関東化学製のクロロホルム（純度 98%以上）を窒素で濃度 1000ppm（成分分析値：991～1010ppm）に希釈し、ポンベに充填した。

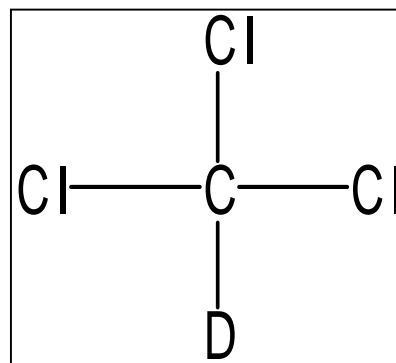
経口投与に用いた被験物質は Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 製のクロロホルム-d（純度 98%以上）を使用した。

吸入曝露



クロロホルム

経口投与



クロロホルム-d

2.2 投与方法

2.2.1 吸入曝露

被験物質の投与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 に示した。所定濃度の被験物質ポンベを新鮮空気と酸素ポンベで約 10 倍希釈して設定濃度に調整後、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投与を行った。投与期間は 1 日最高 6 時間 / 1 回曝露し、投与濃度は複数媒体投与（吸入曝露及び経口投与）によるがん原性試験で実施した 100ppm の投与濃度を設定した。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 40 、注入口温度は 200 、検出器温度は 200 、試料注入量は 1mL とした。

2.2.2 経口投与

被験物質の投与はラットに強制経口投与（単回投与）を行った。

投与用量は複数媒体投与（吸入曝露及び経口投与）によるがん原性試験の飲水による投与群の摂取量から換算して、55mg/kg・BW とした。動物に与える投与量はクロロホルム-d を 5.5mg/mL になるように蒸留水に溶解しラットに体重 1kg 当たり 10 mL 強制経口投与した。

2.2.3 複数媒体投与

上記の吸入曝露と経口投与を同条件下において、同時に投与した。

2.3 使用動物

F344/DuCrj の SPF 雄ラット（日本チャールス・リバー厚木飼育センター）を用いた。ラットは 15 週齢（導入匹数：30 匹、動物番号：5001～5030）、16 週齢（導入匹数：65 匹、動物番号：5031～5095）、17 週齢（導入匹数：20 匹、動物番号：5096～5115）で導入し、1 週間の検疫・馴化を行った。投与は投与実施日の前日の夕刻に絶食し、18 週齢に達した動物を使用した。

2.4 群の構成及び各群の使用動物数

ラットを血液中濃度測定群 20 匹と組織中濃度測定群 95 匹の 2 群に分けた。血液中濃度測定群は更に 1 群 5 匹ずつ、組織中濃度測定群は更に 30 匹ずつ（ただし対照群のみは 5 匹）分け、対照群と単独吸入曝露群、単独経口投与群及び複数媒体投与群の 3 群の合計 8 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
対照群	B-C	T-C
使用動物数 (動物番号)	5匹 (5111～5115)	5匹 (5091～5095)
単独吸入曝露群	B-I	T-I
使用動物数 (動物番号)	5匹 (5106～5110)	30匹 (5061～5090)、
単独経口投与群	B-G	T-G
使用動物数 (動物番号)	5匹 (5101～5105)	30匹 (5031～5060)
複数媒体投与群	B-G+I	T-G+I
使用動物数 (動物番号)	5匹 (5096～5100)	30匹 (5001～5030)

* 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：単独経口投与群、
G + I：複数媒体投与群

2.5 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

2.5.1 血液

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。B-C 群は動物搬出後、B-I 群は吸入曝露開始 15、30、60、180、360、吸入曝露終了後 30、60、120、180 分で、B-G 群は経口投与後 15、30、60、180、360、390、420、480、540 分で、B-G+I 群は吸入曝露開始 15、30、60、180、360、吸入曝露終了後 30、60、120、180 分（経口投与後 15、30、60、180、360、390、420、480、540 分）で採血した。採血した血液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。

2.5.2 組織

組織は動物をエ - テル麻酔下で解剖し、脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪を採取した。T-C 群は動物搬出後、T-I 群は吸入曝露開始 30、60、180、360、吸入曝露終了後 30、120 分で、T-G 群は経口投与後 30、60、180、360、390、480 分で、T-G+I 群は吸入曝露開始 30、60、180、360、吸入曝露終了後 30、120 分（経口投与後 30、60、180、360、390、480 分）で採取した。採取した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。

2.5.3 ヘッドスペース-GC/MS 分析条件

ヘッドスペース（ヒューレットパッカー社 HP7694）-GC/MS（（株）日立製作所 M-80B）を用いて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を測定した。

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、バイアル加熱時間は 10min（血液）、30min（組織）とした。GC/MS の分析条件として、カラムは HP INNOWAX（0.53mmφ × 60m）、キャリアーガスはヘリウムを用い、カラム温度は 80、流量は 5mL/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 250、インターフェイス温度は 250、コレクタ - スリットは 150 μm 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ピークである 82.946m/z、クロロホルム-d のフラグメントイオンピークである 83.953m/z のピークによる SIM 法により実施した。

3. 結果

3.1 生死状況

全動物とも、投与の影響による死亡はみられなかった。

3.2 体重

投与時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。全動物において、特に変化はみられなかった。

3.3 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 99 ± 1 ppm であり、被験物質濃度は設定濃度にきわめて近い値であることから、適正な濃度でラットに曝露されたことを確認した。

3.4 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 ~ 2-4 及び Table 2 に示した。なお、クロロホルム及びクロロホルム-d を投与していない対照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。

3.4.1 単独吸入曝露群

Figure 2-1 に示したように、吸入曝露開始 15 分において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 60 ~ 360 分で血液中濃度はほぼ一定濃度であった。吸入曝露終了後は血液中濃度が減衰し始め、吸入曝露終了後 120 分まで血液中にクロロホルムが認められた。また、吸入曝露終了後 180 分では血液中にクロロホルムは消失した。

3.4.2 単独経口投与群

Figure 2-2 に示したように、経口投与後 15 分においてラットの血液中にクロロホルム-d が認められ、経口投与後 30 分で最高濃度に達し、血液中濃度は経口投与後 60 分以降、急速に減衰し、以後、経口投与後 390 分まで血液中にクロロホルム-d が認められた。また、経口投与後 420 分以降、血液中にクロロホルム-d は消失した。

3.4.3 複数媒体投与群

Figure 2-3 に示したように、吸入曝露は吸入曝露開始 15 分において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 60 分 ~ 360 分で血液中濃度はほぼ一定濃

度であった。吸入曝露終了後は血液中濃度が減衰し始め、吸入曝露終了後 180 分まで血液中にクロロホルムが認められた。経口投与は経口投与後 15 分においてラットの血液中にクロロホルム-d が認められ、経口投与後 30 分で最高濃度に達した。血液中濃度は経口投与後 60 分以降、急速に減衰し、以後、経口投与後 420 分まで血液中にクロロホルム-d が認められた。また、経口投与後 480 分以降、血液中にクロロホルム-d は消失した。

3.4.4 血液中濃度の合計値の比較

Figure 2-4 に血液中濃度の合計値（単独吸入曝露群 + 単独経口投与群、及び複数媒体投与群（吸入曝露由来 + 経口投与由来））を示した。単独で投与した群の合計値に比べ、複数媒体で投与した群の血液中濃度の減衰は多少ゆるやかであった。また、Table 2 に各採血時間の血液中濃度の合計値の比率（単独吸入曝露群 + 単独経口投与群を 1 とした時の複数媒体投与群（吸入曝露由来 + 経口投与由来）の比率）を示した。単独で投与した群の合計値と複数媒体で投与した群の各採血時間における比率は極端に差があるものはなかった。

3.4.5 血液中濃度のまとめ

単独吸入曝露群と複数媒体投与群の吸入曝露由来の血液中濃度の経時的変化はほぼ同じ推移であった。また、単独経口投与群と複数媒体投与群の経口投与由来の血液中濃度を比べると、複数媒体投与群の経口投与後 30～60 分における血液中濃度の減衰は多少ゆるやかであった。以上のことより単独群と複数媒体群を比較するために、血液中濃度の合計値の比率を比較すると、単独で投与した群と複数媒体で投与した群では極端に差がみられなかった。

3.5 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 3-1～3-4 及び Table 3 に示した。なお、クロロホルム及びクロロホルム-d を投与していない対照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。

3.5.1 単独吸入曝露群

Figure 3-1 に単独吸入曝露群の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化

吸入曝露開始 30 分においてラットの各組織（脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪）中に

クロロホルムが認められた。脳、肺、肝臓、腎臓においては、吸入曝露開始 30～360 分で組織中濃度はほぼ一定濃度であった。吸入曝露終了後は各組織とも組織中濃度が減衰したが、吸入曝露終了後 120 分までクロロホルムが認められた。脂肪においては、曝露中は曝露時間が増すほどクロロホルムの脂肪中濃度が増加し、吸入曝露終了後は脂肪中濃度が減衰したが、吸入曝露終了後 120 分までクロロホルムが認められた。

(イ) 組織分布

各組織（脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪）中の濃度を比べると、脳、肺、肝臓、腎臓においては、各組織とも曝露中はほぼ同じ濃度で分布したが脂肪においては、高い濃度で分布した。各採取時間とも脂肪における含有量が他の組織に比べ、多かったことに関して、クロロホルムの脂溶性が高いため、脂肪への分布が多いことが考えられた。

3.5.2 単独経口投与群

Figure 3-2 に単独経口投与群の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化

経口投与後 30 分においてラットの各組織（脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪）中にクロロホルム-d が認められた。経口投与後 30 分で各組織が最高濃度が最高濃度に達した。各組織においては経口投与後 60 分以降、組織中濃度は急速に減衰したが、経口投与後 480 分まで各組織中にクロロホルム-d が認められた。

(イ) 組織分布

各組織（脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪）中の濃度を比べると、経口投与後の最高濃度で脳、肺、肝臓、腎臓の組織中濃度に対して、脂肪の組織中濃度はかなり高く、局在的に脂肪に分布した。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。この事はクロロホルムと同様の物理化学的性質を有するクロロホルム-d は脂溶性が高いため、脂肪への分布が多いことが考えられた。

3.5.3 複数媒体投与群

3.5.3.1 複数媒体群の吸入曝露由来

Figure 3-3-1 に複数媒体投与群の吸入曝露由来の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化

吸入曝露開始 30 分においてラットの各組織（脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪）中にクロロホルムが認められた。脳、肺、肝臓、腎臓においては、吸入曝露開始 30

～360分で組織中濃度はほぼ一定濃度であった。吸入曝露終了後は各組織とも組織中濃度が減衰したが、吸入曝露終了後120分までクロロホルムが認められた。脂肪においては、曝露中は曝露時間が増すほどクロロホルムの脂肪中濃度が増加し、吸入曝露終了後は脂肪中濃度が減衰したが、吸入曝露終了後120分までクロロホルムが認められた。

(イ) 組織分布

各組織(脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪)中の濃度を比べると、脳、肺、肝臓、腎臓においては各組織とも曝露中はほぼ同じ濃度で分布したが脂肪においては、高い濃度で脂肪に分布した。各採取時間とも脂肪における含有量は他の組織に比べ、多かった。

3.5.3.2 複数媒体群の経口投与由来

Figure 3-3-2に複数媒体投与群の経口投与由来の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化)

経口投与後30分においてラットの各組織(脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪)中にクロロホルム-dが認められた。経口投与後30分で各組織が最高濃度に達した。各組織においては経口投与後60分以降、組織中濃度は急速に減衰したが、経口投与後480分まで各組織中にクロロホルム-dが認められた。

(イ) 組織分布

各組織(脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪)中の濃度を比べると、経口投与後の最高濃度で脳、肺、肝臓、腎臓の組織中濃度に対して、脂肪の組織中濃度はかなり高く、局在的に脂肪に分布した。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。

3.5.4 組織中濃度の合計値の比較

Figure 3-4に組織中濃度の合計値(単独吸入曝露群+単独経口投与群、及び複数媒体投与群(吸入曝露由来+経口投与由来))を示したように、複数媒体で投与したことにより、組織中濃度は単独で投与した群に比べ、各組織中での濃度に多少の差があった。また、Table 3に各採取時間の組織中濃度の合計値の比率(単独吸入曝露群+単独経口投与群を1とした時の複数媒体投与群(吸入曝露由来+経口投与由来)の比率)を示したように各採取時間の比率は単独で投与した群と複数媒体で投与した群と比べて、複数媒体で投与した群で各組織中での濃度に多少の差があった。また、投与後30分における複数媒体で投与した群の腎臓は他の複数媒体で投与した群の組織よ

り、多少、差があった。

3.5.5 組織中濃度のまとめ

単独吸入曝露群と複数媒体投与群の吸入曝露由来の組織中濃度の経時的变化は、ほぼ同じ推移であった。単独経口投与群と複数媒体投与群の経口投与由来の組織中濃度を比べると、投与後 30 分において複数媒体群の経口投与の各組織中での濃度が高かった。各採取時間の組織中濃度の合計値の比率は単独で投与した群と複数媒体で投与した群と比べて、複数媒体で投与した群で各組織中での濃度に多少の差があり、特に投与後 30 分における複数媒体で投与した群の腎臓は他の複数媒体で投与した群の組織より、多少高かった。

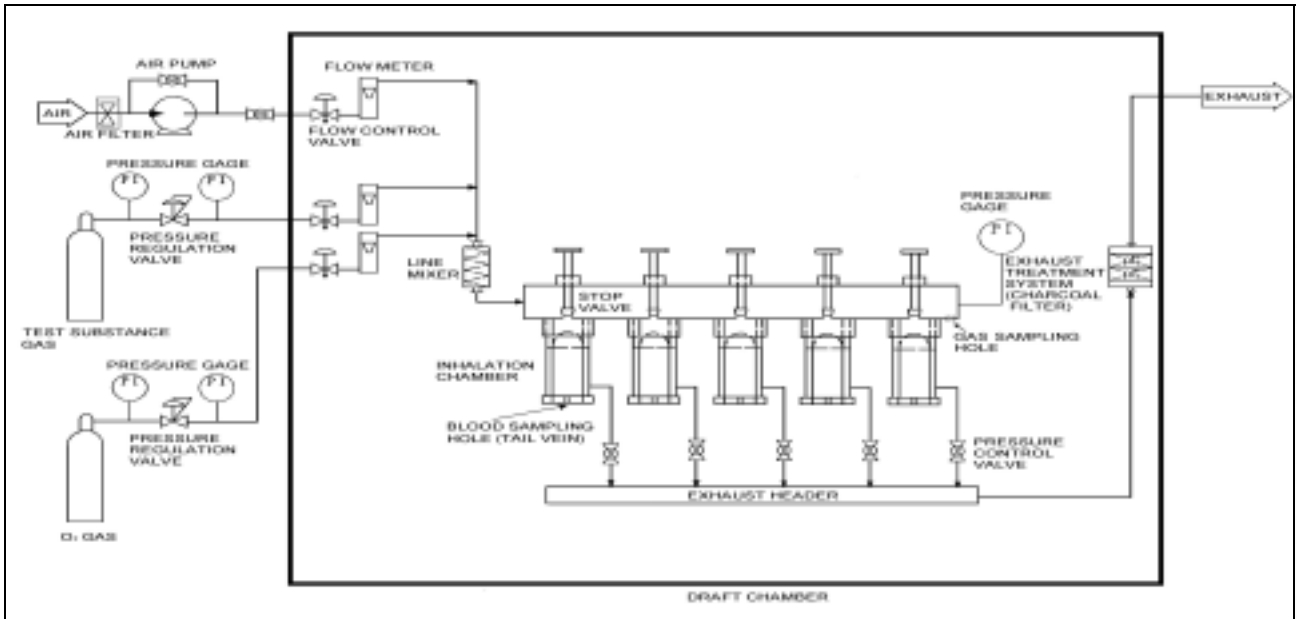


Figure 1. 吸入曝露装置

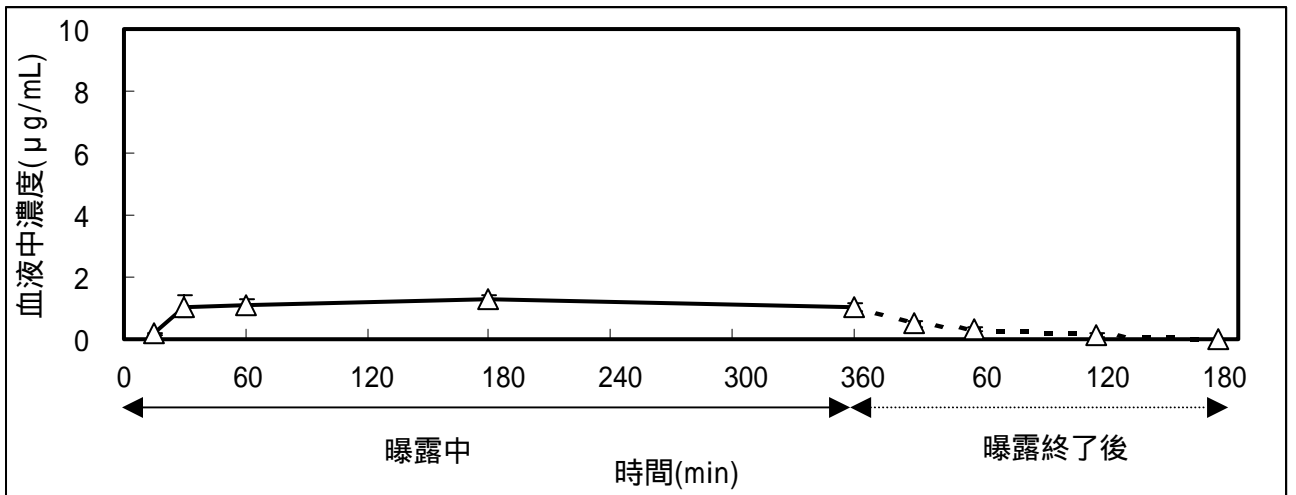


Figure 2-1. 単独吸入曝露群の血液中濃度

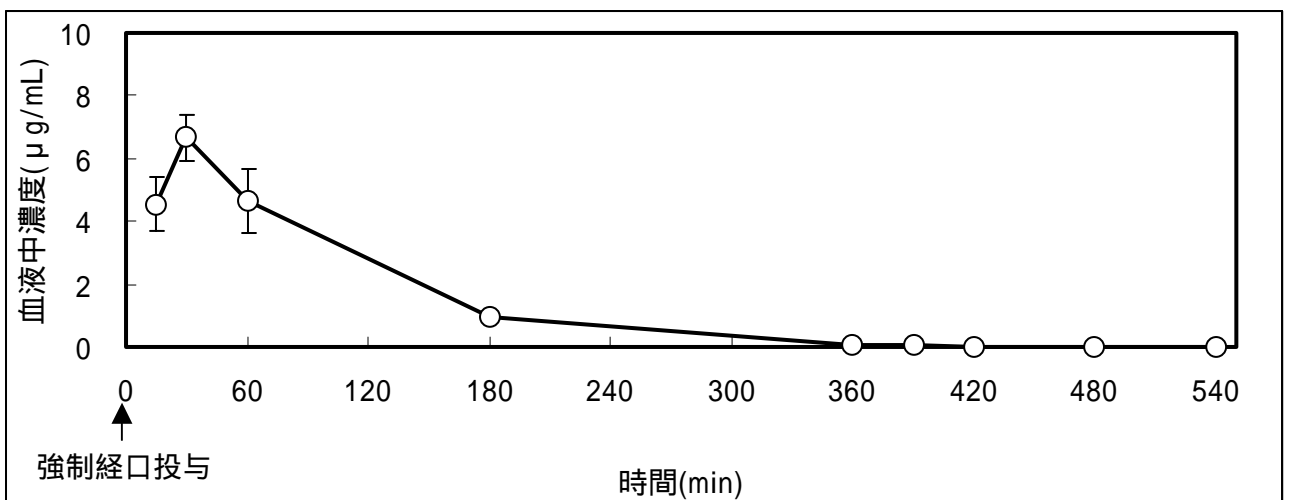


Figure 2-2. 単独経口投与群の血液中濃度

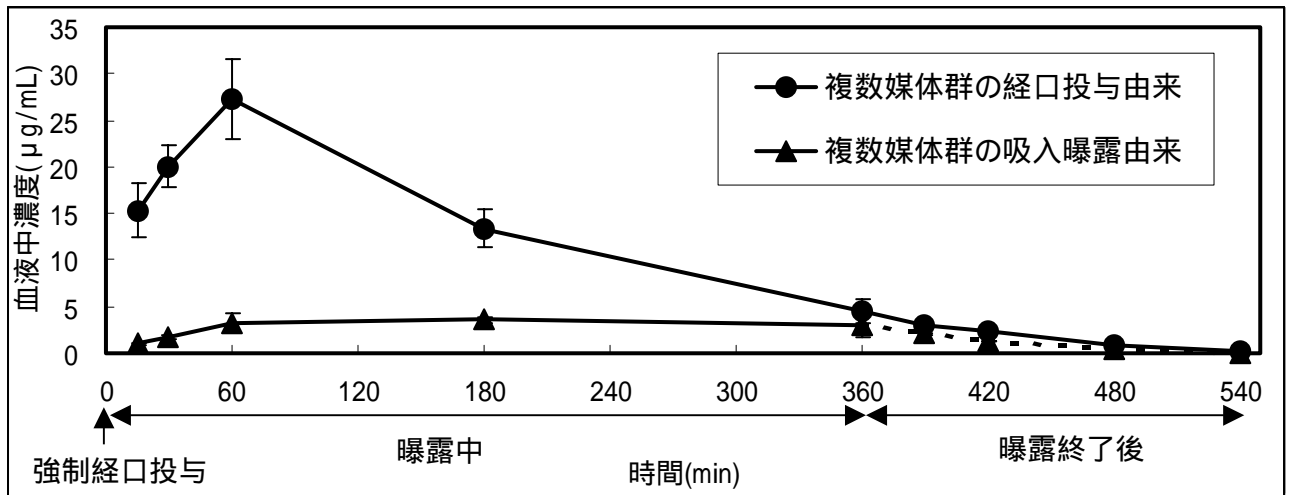


Figure 2-3. 複数媒体投与群の血液中濃度

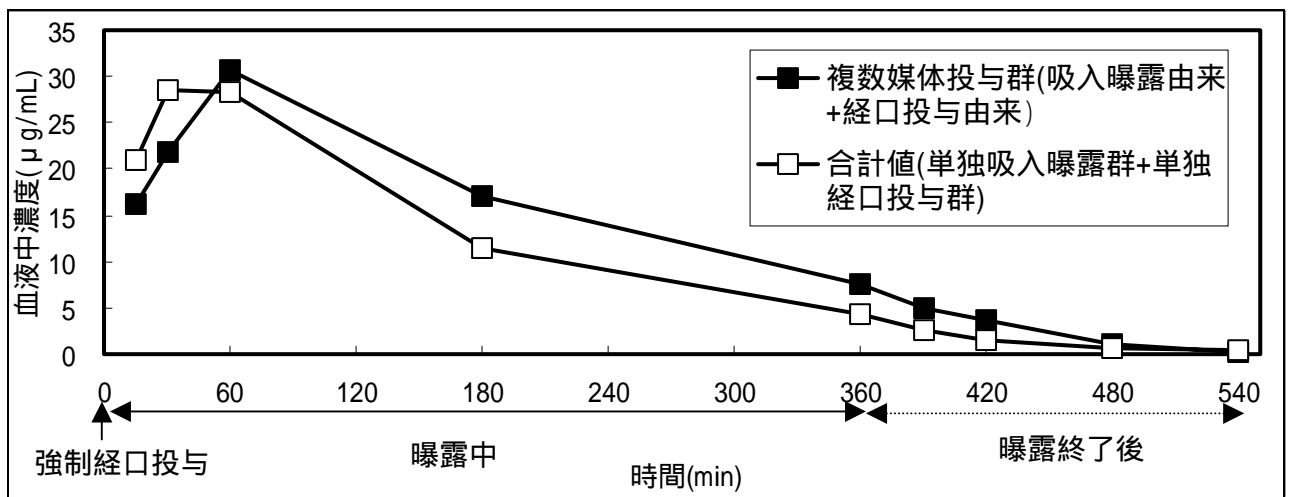


Figure 2-4. 血液中濃度の合計値

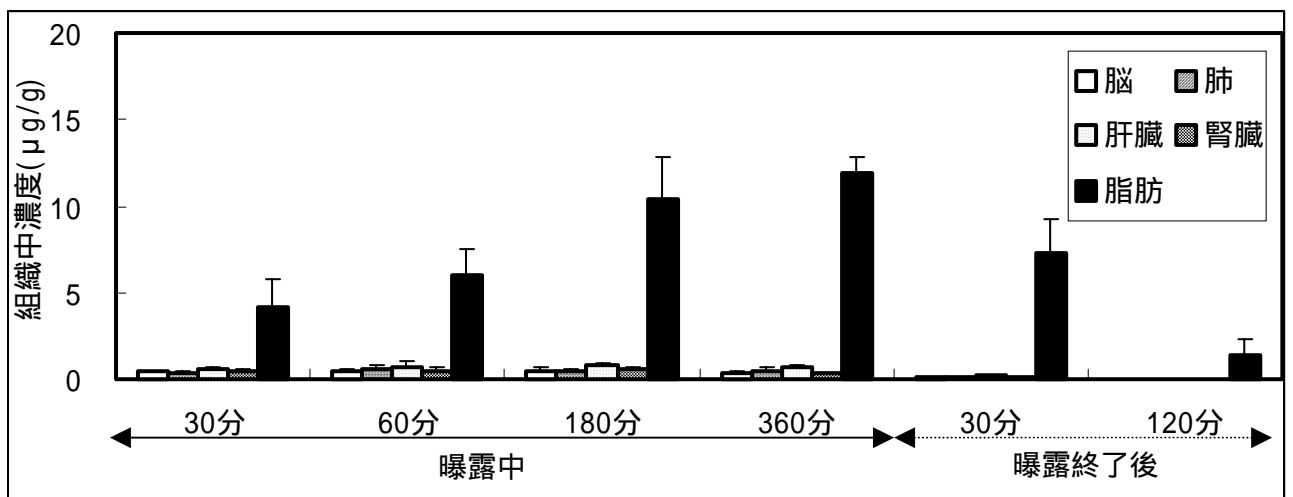


Figure 3-1. 単独吸入曝露群の組織中濃度

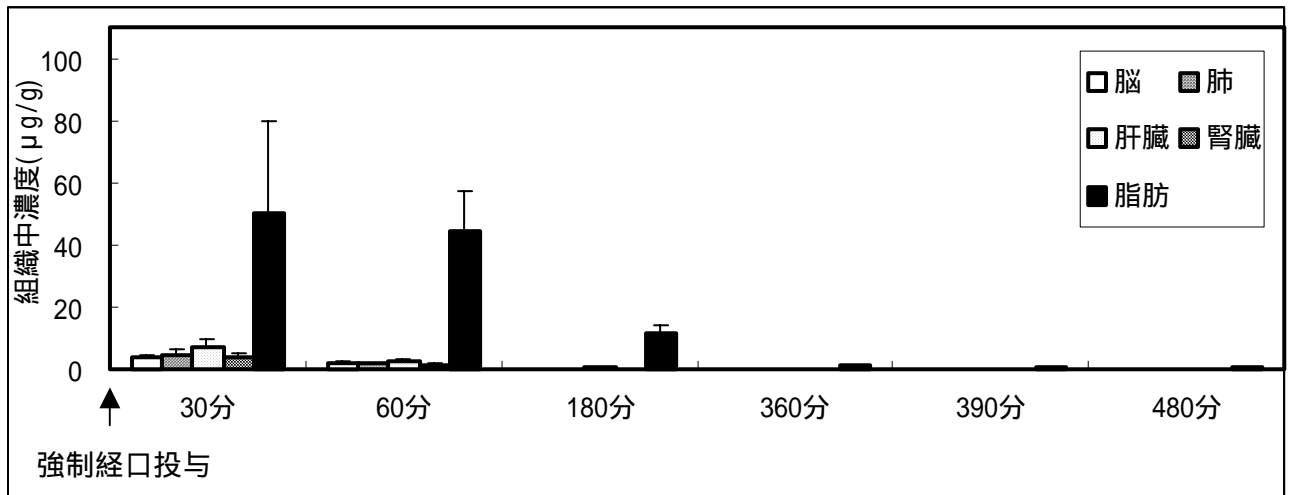


Figure 3-2. 単独経口投与群の組織中濃度

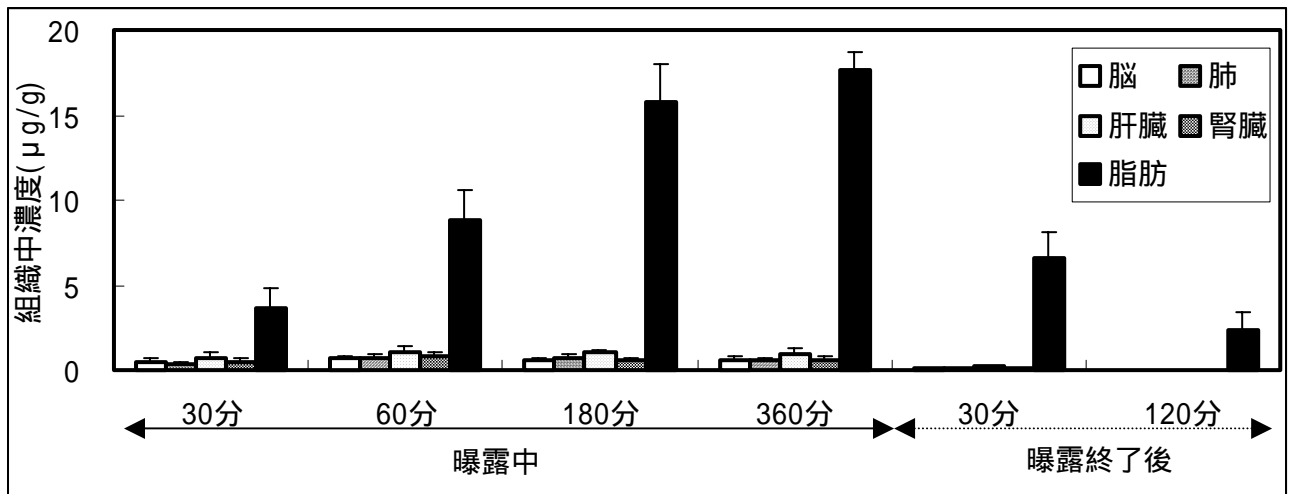


Figure 3-3-1. 複数媒体群の吸入曝露由来の組織中濃度

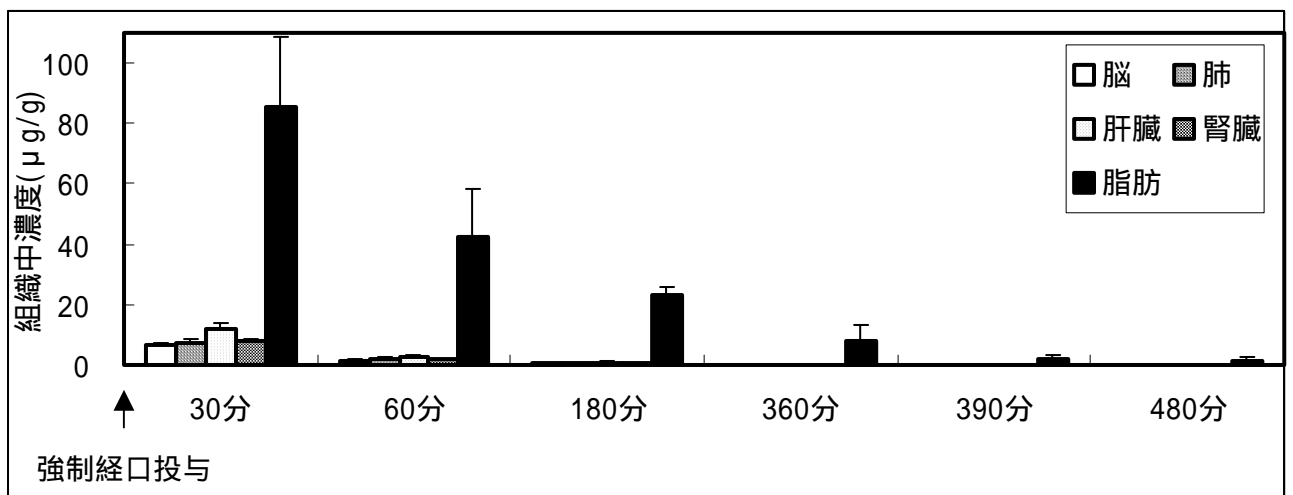


Figure 3-3-2. 複数媒体群の経口投与由来の組織中濃度

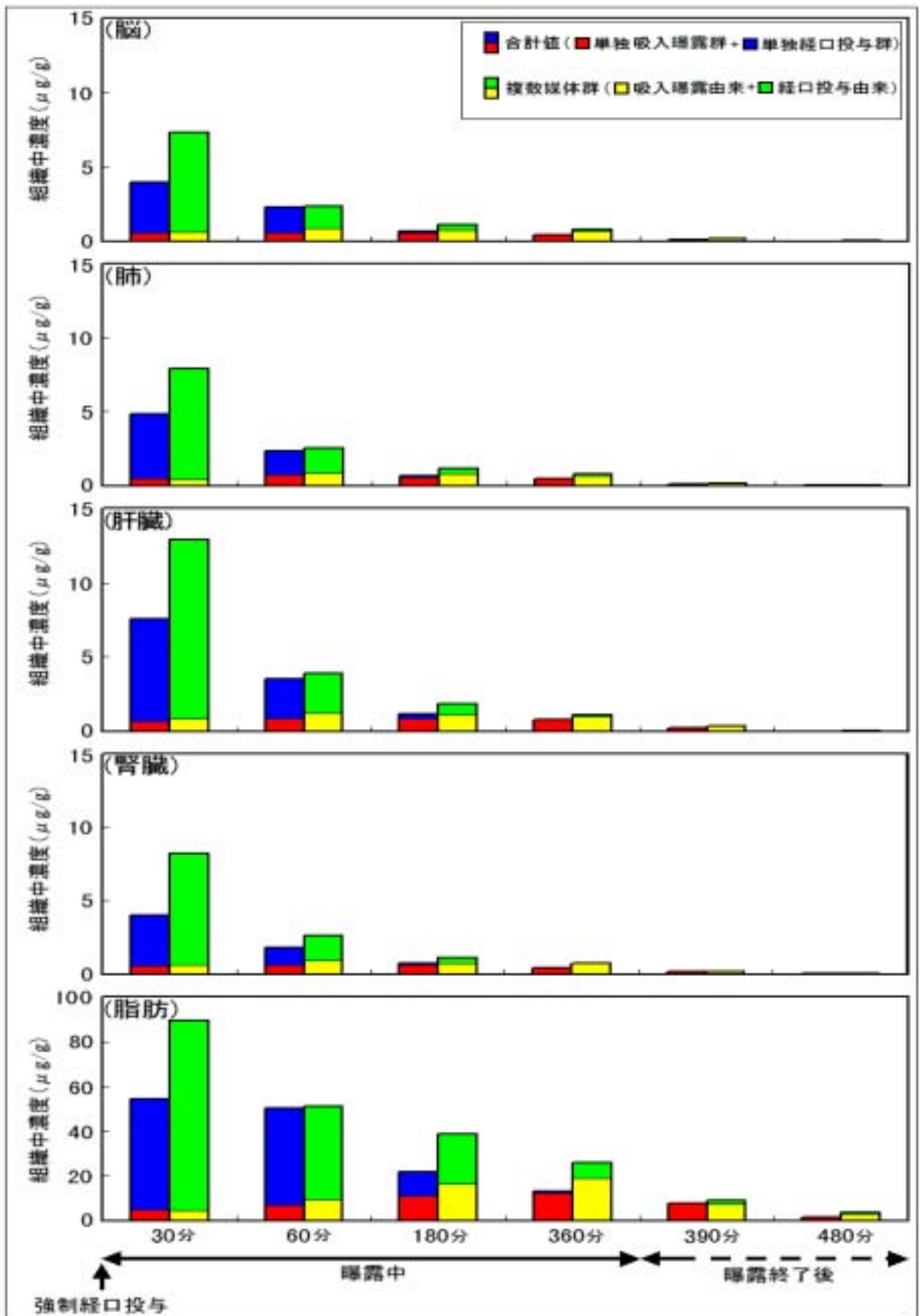


Figure 3-4. 組織中濃度の合計値

Table 1. 動物の体重値の平均値と標準偏差

	対照群	単独吸入曝露群	単独経口投与群	複数媒体投与群
血液中濃度測定群	B-C 群	B-I 群	B-G 群	B-G+I 群
	291 ± 7 ^a	292 ± 3	292 ± 5	289 ± 5
組織中濃度測定群	T-C 群	T-I 群	T-G 群	T-G+I 群
	274 ± 9	270 ± 9	285 ± 9	291 ± 11

^a 体重値の平均値 (g) ± 標準偏差 (g)

Table 2. 血液中濃度の合計値の比率

	15 分	30 分	60 分	180 分	360 分	390 分	420 分	480 分	540 分
単独 ^a	1	1	1	1	1	1	1	1	-
複数 ^b	0.85 ^c	1.20	1.28	1.22	1.00	1.04	1.00	0.50	-

^a : 単独吸入曝露群+単独経口投与群の血液中濃度の合計値

^b : 複数媒体投与群 (吸入曝露由来+経口投与由来) の血液中濃度

^c : 単独吸入曝露群+単独経口投与群の血液中濃度の合計値を 1 とした時の複数媒体投与群 (吸入曝露由来+経口投与由来) の血液中濃度の比率

Table 3. 組織中濃度の合計値の比率

		30分	60分	180分	360分	390分	480分
脳	単独 ^a	1	1	1	1	1	1
	複数 ^b	1.85 ^c	1.01	1.61	1.89	1.33	2.07
肺	単独	1	1	1	1	1	1
	複数	1.63	1.09	1.71	1.63	1.30	2.33
肝臓	単独	1	1	1	1	1	1
	複数	1.70	1.10	1.62	1.41	1.49	2.29
腎臓	単独	1	1	1	1	1	1
	複数	2.06	1.43	1.49	1.73	1.13	2.03
脂肪	単独	1	1	1	1	1	1
	複数	1.63	1.01	1.76	1.98	1.12	2.17

^a : 単独吸入曝露群+単独経口投与群の組織中濃度の合計値

^b : 複数媒体投与群（吸入曝露由来+経口投与由来）の組織中濃度

^c : 単独吸入曝露群+単独経口投与群の組織中濃度の合計値を1とした時の複数媒体投与群（吸入曝露由来+経口投与由来）の組織中濃度の比率

(3) 1,4-ジオキサン

1. 試験目的

当センタ - で、環境省の委託により、1,4-ジオキサンのラットを用いた複数媒体投与（吸入曝露及び経口投与）によるがん原性試験を実施した。今回、複数媒体投与による生体影響のメカニズムを明らかにすることを目的として、ラットに 1,4-ジオキサンを吸入曝露及び 1,4-ジオキサン-d8 を経口投与し、血液及び組織中の未変化体の濃度を経時的に測定した。

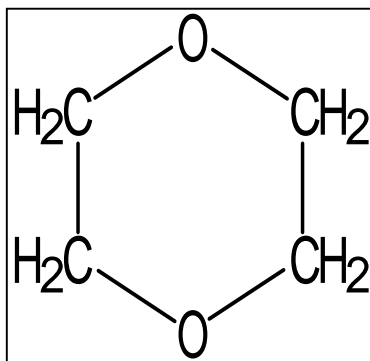
2. 試験方法

2.1 被験物質

吸入曝露に用いた被験物質の作製は（株）住友精化に依頼した。その調製方法はシグマ-アルドリッチ製の 1,4-ジオキサン（純度 99.9%以上）を窒素で濃度 1600ppm（成分分析値：1539～1654ppm）に希釈し、ポンベに充填した。

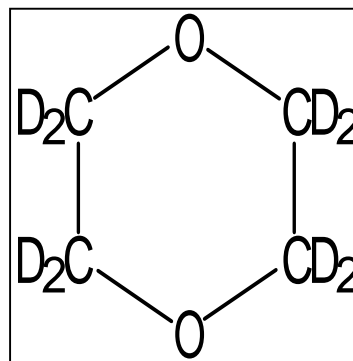
経口投与に用いた被験物質は Cambridge Isotope Laboratories, Inc.製の 1,4-ジオキサン-d8（純度 98%以上）を使用した。

吸入曝露



1,4-ジオキサン

経口投与



1,4-ジオキサン-d8

2.2 投与方法

2.2.1 吸入曝露

被験物質の投与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 に示した。所定濃度の被験物質ポンベを新鮮空気と酸素ポンベで約 6.4 倍希釈して設定濃度に調整後、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投与を行った。投与期間は 1 日最高 6 時間 / 1 回曝露し、投与濃度は複数媒体投与（吸入曝露及び経口投与）によるがん原性試験で実施した 250ppm の投与濃度を設定した。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 40 、注入口温度は 200 、検出器温度は 200 、試料注入量は 1mL とした。

2.2.2 経口投与

被験物質の投与はラットに強制経口投与（単回投与）を行った。

投与用量は複数媒体投与（吸入曝露及び経口投与）によるがん原性試験の飲水による投与群の摂取量から換算して、65mg/kg・BW とした。動物に与える投与量は 1,4-ジオキサン-d8 を 6.5mg/mL になるように蒸留水に溶解しラットに体重 1kg 当たり 10 mL 強制経口投与した。

2.2.3 複数媒体投与

上記の吸入曝露と経口投与を同条件下において、同時に投与した。

2.3 使用動物

F344/DuCrj の SPF 雄ラット（日本チャールス・リバー厚木飼育センター）を用いた。ラットは 15 週齢（導入匹数：30 匹、動物番号：5001～5030）、16 週齢（導入匹数：65 匹、動物番号：5031～5095）、17 週齢（導入匹数：20 匹、動物番号：5096～5115）で導入し、1 週間の検疫・馴化を行った。投与は投与実施日の前日の夕刻に絶食し、18 週齢に達した動物を使用した。

2.4 群の構成及び各群の使用動物数

ラットを血液中濃度測定群 20 匹と組織中濃度測定群 95 匹の 2 群に分けた。血液中濃度測定群は更に 1 群 5 匹ずつ、組織中濃度測定群は更に 30 匹ずつ（ただし対照群のみは 5 匹）分け、対照群と単独吸入曝露群、単独経口投与群及び複数媒体投与群の 3 群の合計 8 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
対照群	B-C	T-C
使用動物数 (動物番号)	5 匹 (5111 ~ 5115)	5 匹 (5061 ~ 5065)
単独吸入曝露群	B-I	T-I
使用動物数 (動物番号)	5 匹 (5106 ~ 5110)	30 匹 (5031 ~ 5060)、
単独経口投与群	B-G	T-G
使用動物数 (動物番号)	5 匹 (5101 ~ 5105)	30 匹 (5066 ~ 5095)
複数媒体投与群	B-G+I	T-G+I
使用動物数 (動物番号)	5 匹 (5096 ~ 5100)	30 匹 (5001 ~ 5030)

* 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：単独経口投与群、
G + I：複数媒体投与群

2.5 1,4-ジオキササン及び1,4-ジオキササン-d8の血液及び組織中濃度測定

2.5.1 血液

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。B-C 群は動物搬出後、B-I 群は吸入曝露開始 30、60、180、360、吸入曝露終了後 60、120、180、360 分で、B-G 群は経口投与後 30、60、180、360、420、480、540、720 分で、B-G+I 群は吸入曝露開始 30、60、180、360、吸入曝露終了後 60、120、180、360 分（経口投与後 30、60、180、360、420、480、540、720 分）で採血した。採血した血液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。

2.5.2 組織

組織は動物をエ - テル麻酔下で解剖し、脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪を採取した。T-C 群は動物搬出後、T-I 群は吸入曝露開始 30、60、180、360、吸入曝露終了後 60、120、360 分で、T-G 群は経口投与後 30、60、180、360、420、480、720 分で、T-G+I 群は吸入曝露開始 30、60、180、360、吸入曝露終了後 60、120、360 分（経口投与後 30、60、180、360、420、480、720 分）で採取した。採取した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。なお、T-I 群の吸入曝露終了後 360 分の分析試料は B-I 群の動物の採血終了後、解剖し、分析試料とした。T-G 群の経口投与後 720 分の分析試料は B-G 群の動物の採血終了後、解剖し、分析試料とした。T-G+I 群の吸入曝露終了後 360 分（経口投与後 720 分）の分析試料は B-G+I 群の動物の採血終了後、解剖し、分析試料とした。

2.5.3 ヘッドスペース-GC/MS 分析条件

ヘッドスペース（ヒューレットパッカード社 HP7694）-GC/MS（ヒューレットパッカード社 HP5989B）を用いて 1,4-ジオキサン及び 1,4-ジオキサン-d8 の血液及び組織中濃度を測定した。

ヘッドスペースの分析条件として、オープン温度は 110 、ループ温度は 130 、パイアル加熱時間は 10min（血液）、30min（組織）とした。GC/MS の分析条件として、カラムは HP INNOWAX（0.2mmφ × 50m）、キャリアーガスはヘリウムを用い、カラム温度は 120 、流量は 1mL/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 とした。なお、血液及び組織中濃度の定量は 1,4-ジオキサンの分子イオンピークである 88m/z、1,4-ジオキサン-d8 の分子イオンピークである 96m/z のピークによる SIM 法により実施した。

3. 結果

3.1 生死状況

全動物とも、投与の影響による死亡はみられなかった。

3.2 体重

投与時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。全動物において、特に変化はみられなかった。

3.3 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 249 ± 5 ppm であり、被験物質濃度は設定濃度にきわめて近い値であることから、適正な濃度でラットに曝露されたことを確認した。

3.4 1,4-ジオキサン及び1,4-ジオキサン-d8の血液中濃度測定結果

各群における1,4-ジオキサン及び1,4-ジオキサン-d8の血液中濃度測定結果を Figure 2-1 ~ 2-4 及び Table 2 に示した。なお、1,4-ジオキサン及び1,4-ジオキサン-d8を投与していない対照群のラットの血液中では1,4-ジオキサン及び1,4-ジオキサン-d8は認められなかった。

3.4.1 単独吸入曝露群

Figure 2-1 に示したように、吸入曝露開始 30 分においてラットの血液中に1,4-ジオキサンが認められ、吸入曝露開始 180 ~ 360 分で血液中濃度はほぼ一定濃度であった。吸入曝露終了後は血液中濃度が急速に減衰し、吸入曝露終了後 120 分まで血液中に1,4-ジオキサンが認められた。また、吸入曝露終了後 180 分以降、血液中に1,4-ジオキサンは消失した。

3.4.2 単独経口投与群

Figure 2-2 に示したように、経口投与後 30 分においてラットの血液中に1,4-ジオキサン-d8が認められ、経口投与後 60 分で最高濃度に達し、血液中濃度は経口投与後 180 分以降、急速に減衰し、以後、経口投与後 420 分まで血液中に1,4-ジオキサン-d8が認められた。また、経口投与後 540 分以降、血液中に1,4-ジオキサン-d8は消失した。

3.4.3 複数媒体投与群

Figure 2-3 に示したように、吸入曝露は吸入曝露開始 30 分においてラットの血液中に1,4-ジオキサンが認められ、曝露中は曝露時間が増すほど1,4-ジオキサンの血液中濃度が

著しく増加した。吸入曝露終了後は血液中濃度が減衰し始め、吸入曝露終了後 360 分まで血液中に 1,4-ジオキサンが認められた。経口投与は経口投与後 30 分においてラットの血液中に 1,4-ジオキサン-d8 が認められ、経口投与後 60 分で最高濃度に達した。血液中濃度は経口投与後 180 分以降、緩やかに減衰し、以後、経口投与後 360 分まで血液中に 1,4-ジオキサン-d8 が認められた。

3.4.4 血液中濃度の合計値の比較

Figure 2-4 に血液中濃度の合計値（単独吸入曝露群 + 単独経口投与群、及び複数媒体投与群（吸入曝露由来 + 経口投与由来））を示したように、複数媒体で投与したことにより、血液中濃度は単独で投与した群に比べ、特に投与後 180 分以後血液中濃度が高かった。また、Table 2 に各採血時間の血液中濃度の合計値の比率（単独吸入曝露群 + 単独経口投与群を 1 とした時の複数媒体投与群（吸入曝露由来 + 経口投与由来）の比率）を示したように複数媒体で投与したことにより、血液中濃度は単独で投与した群に比べ、かなり比率が高かった。

3.4.5 血液中濃度のまとめ

単独吸入曝露群と複数媒体投与群の吸入曝露由来の血液中濃度を比べると、複数媒体投与群では曝露中の曝露時間が増すほど、吸入曝露由来の血液中濃度が増加する特徴があった。また、単独経口投与群と複数媒体投与群の経口投与由来の血液中濃度を比べると、複数媒体投与群の経口投与由来の経口投与後 360 ~ 540 分で、血液中濃度の減衰はゆるやかであった。更に、単独吸入曝露と単独経口投与群の血液中濃度の合計値よりも複数媒体投与群（吸入曝露由来 + 経口投与由来）の血液中濃度の合計値が高いことから、複数媒体投与つまり、吸入曝露と経口投与の同時投与は、血液中濃度を上昇させる効果があることが明確であった。

3.5 1,4-ジオキサン及び 1,4-ジオキサン-d8 の組織中濃度測定結果

各群における 1,4-ジオキサン及び 1,4-ジオキサン-d8 の組織中濃度測定結果を Figure 3-1 ~ 3-4 及び Table 3 に示した。なお、1,4-ジオキサン及び 1,4-ジオキサン-d8 を投与していない対照群のラットの組織中では 1,4-ジオキサン及び 1,4-ジオキサン-d8 は認められなかった。

3.5.1 単独吸入曝露群

Figure 3-1 に単独吸入曝露群の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化

吸入曝露開始 30 分においてラットの各組織（脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪）中に 1,4-ジオキサンが認められた。各組織においては、吸入曝露開始 30 ~ 360 分で組織中濃度

はほぼ一定濃度であった。吸入曝露終了後は各組織とも組織中濃度が急速に減衰し、吸入曝露終了後 30 分で 1,4-ジオキサンが認められ、吸入曝露終了後 60 分では吸入曝露終了後 30 分に比べ、更に減衰し、吸入曝露終了後 360 分では認められなかった。

(イ) 組織分布

各組織(脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪)中の濃度を比べると、脂肪が各組織に比べ 1,4-ジオキサン濃度が低かったが、特徴的に一部の組織に局在することなく、各組織に分布した。この事は 1,4-ジオキサンが水及び有機溶媒に可溶な為、各組織に分布したと考えられた。

3.5.2 単独経口投与群

Figure 3-2 に単独経口投与群の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化

経口投与後 30 分においてラットの各組織(脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪)中に 1,4-ジオキサン-d8 が認められた。経口投与後 60 分で各組織が最大濃度に達した。各組織とも組織中濃度は経口投与後 180 分以降、急速に減衰した。経口投与後 480 分まで各組織中に 1,4-ジオキサン-d8 が認められ、経口投与後 720 分では肺、脂肪で 1,4-ジオキサン-d8 が認められたが、脳、肝臓、腎臓は認められなかった。

(イ) 組織分布

各組織(脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪)中の濃度を比べると、脂肪が各組織に比べ 1,4-ジオキサン濃度が低かったが、特徴的に一部の組織に局在することなく、各組織に分布した。この事は 1,4-ジオキサンが水及び有機溶媒に可溶な為、各組織に分布したと考えられた。

3.5.3 複数媒体投与群

3.5.3.1 複数媒体群の吸入曝露由来

Figure 3-3-1 に複数媒体投与群の吸入曝露由来の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化

吸入曝露開始 30 分においてラットの組織中に 1,4-ジオキサンが認められた。各組織においては、曝露中は曝露時間が増すほど 1,4-ジオキサンの濃度が増加した。吸入曝露終了後は各組織とも組織中濃度が減衰したが、吸入曝露終了後 120 分まで 1,4-ジオキサンが認められ、吸入曝露終了後 360 分では各組織とも認められなかった。

(イ) 組織分布

各組織(脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪)中の濃度を比べると、経口投与後の最大濃度で脳、肺、肝臓、腎臓の組織中濃度に対して、脂肪の組織中濃度は低かったが、特徴

的に一部の組織に局在することなく、各組織に分布した。

3.5.3.2 複数媒体群の経口投与由来

Figure 3-3-2 に複数媒体投与群の経口投与由来の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化

経口投与後 30 分においてラットの各組織（脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪）中に 1,4-ジオキサン-d8 が認められた。経口投与後 30 分で脂肪が最大濃度、経口投与後 60 分で脳、肺、肝臓、腎臓が最大濃度に達した。各組織とも組織中濃度は最大濃度に達した後、緩やかに減衰し、経口投与後 480 分まで各組織中に 1,4-ジオキサン-d8 が認められ、経口投与後 720 分では肝臓で 1,4-ジオキサン-d8 が認められなかったが、肺、脂肪、脳及び腎臓で認められた。

(イ) 組織分布

各組織（脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪）中の濃度を比べると、経口投与後の最大濃度で脳、肺、肝臓、腎臓の組織中濃度に対して、脂肪の組織中濃度は低かったが、特徴的に一部の組織に局在することなく、各組織に分布した。

3.5.4 組織中濃度の合計値の比較

Figure 3-4 に組織中濃度の合計値（単独吸入曝露群 + 単独経口投与群、及び複数媒体投与群（吸入曝露由来 + 経口投与由来））を示したように、複数媒体で投与したことにより、組織中濃度は単独で投与した群に比べ、各組織中での濃度が高かった。また、Table 3 に各採取時間の組織中濃度の合計値の比率（単独吸入曝露群 + 単独経口投与群を 1 とした時の複数媒体投与群（吸入曝露由来 + 経口投与由来）の比率）を示したように複数媒体で投与したことにより、組織中濃度は単独で投与した群に比べ、かなり比率が高かった。

3.5.5 組織中濃度のまとめ

単独吸入曝露群と複数媒体投与群の吸入曝露由来の組織中濃度を比べると、複数媒体投与群では曝露中の曝露時間が増すほど、吸入曝露由来の組織中濃度が増加する特徴があった。また、単独経口投与群と複数媒体投与群の経口投与由来の組織中濃度を比べると、複数媒体投与群の経口投与由来の経口投与後 360 ~ 480 分で、組織中濃度が高かった。更に、単独吸入曝露と単独経口投与群の組織中濃度の合計値よりも複数媒体投与群（吸入曝露由来 + 経口投与由来）の組織中濃度の合計値が高いことから、複数媒体投与つまり吸入曝露と経口投与の同時投与は、組織中濃度を上昇させる効果があることが明確であった。

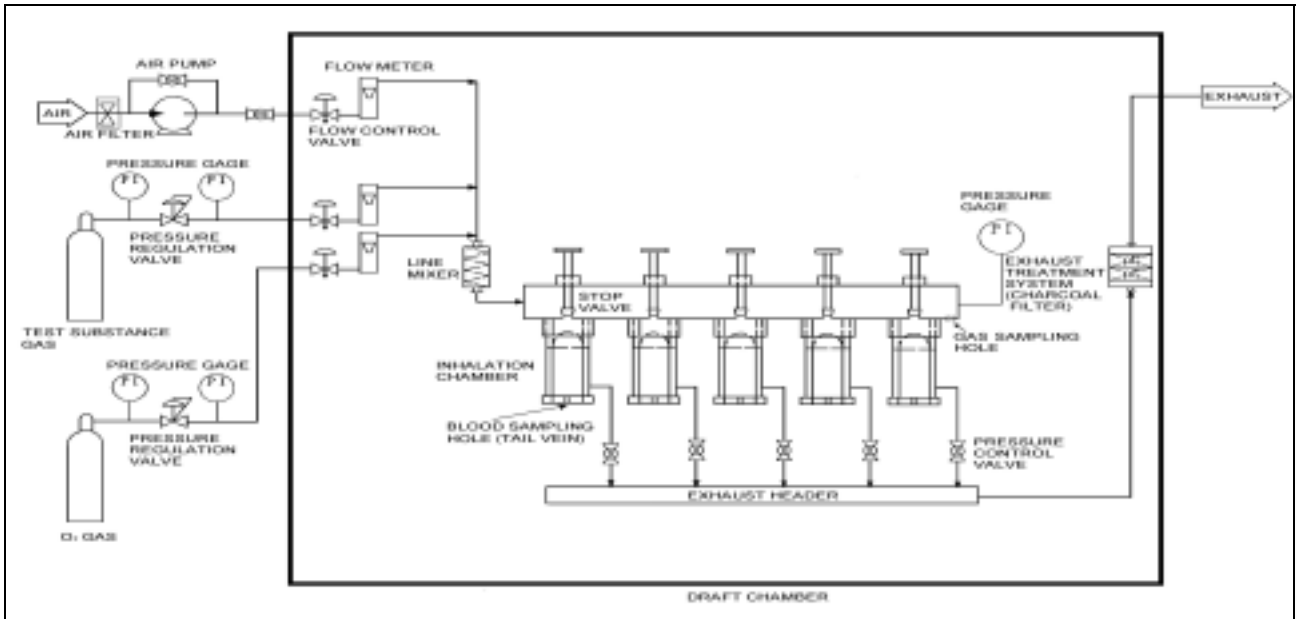


Figure 1. 吸入曝露装置

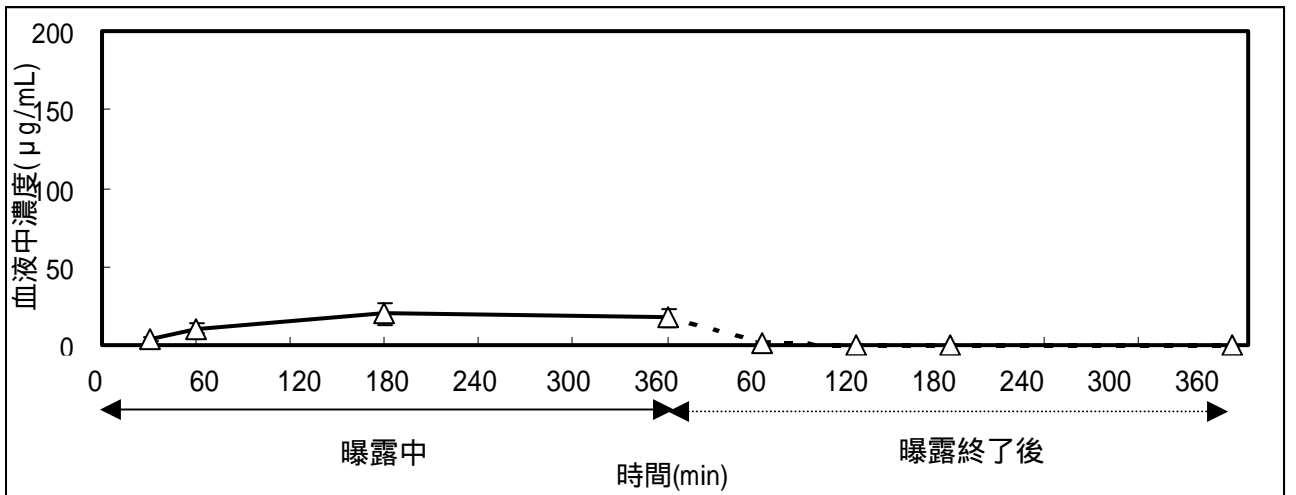


Figure 2-1. 単独吸入曝露群の血液中濃度

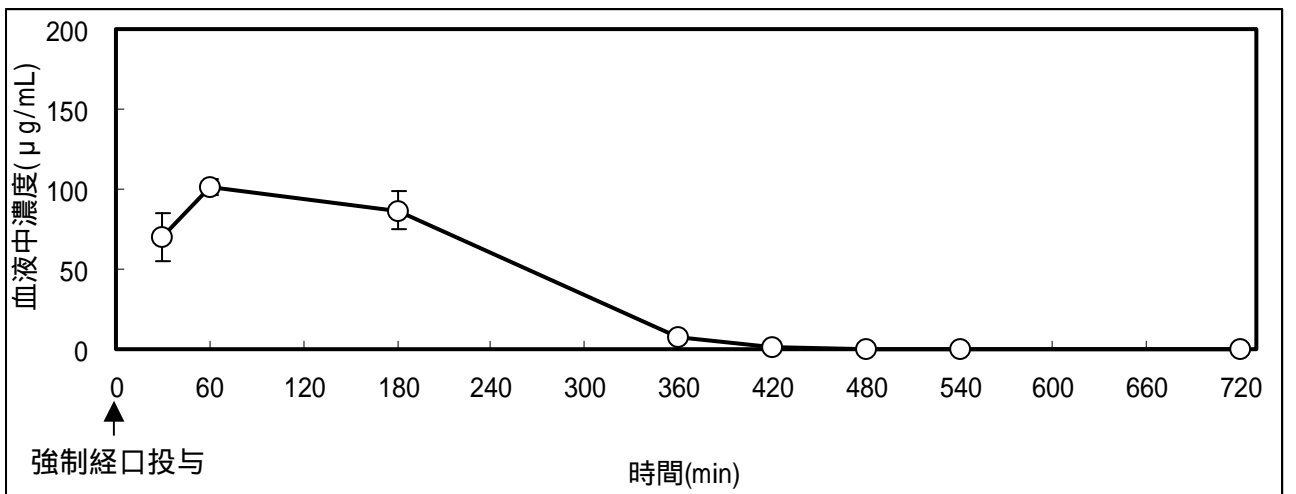


Figure 2-2. 単独経口投与群の血液中濃度

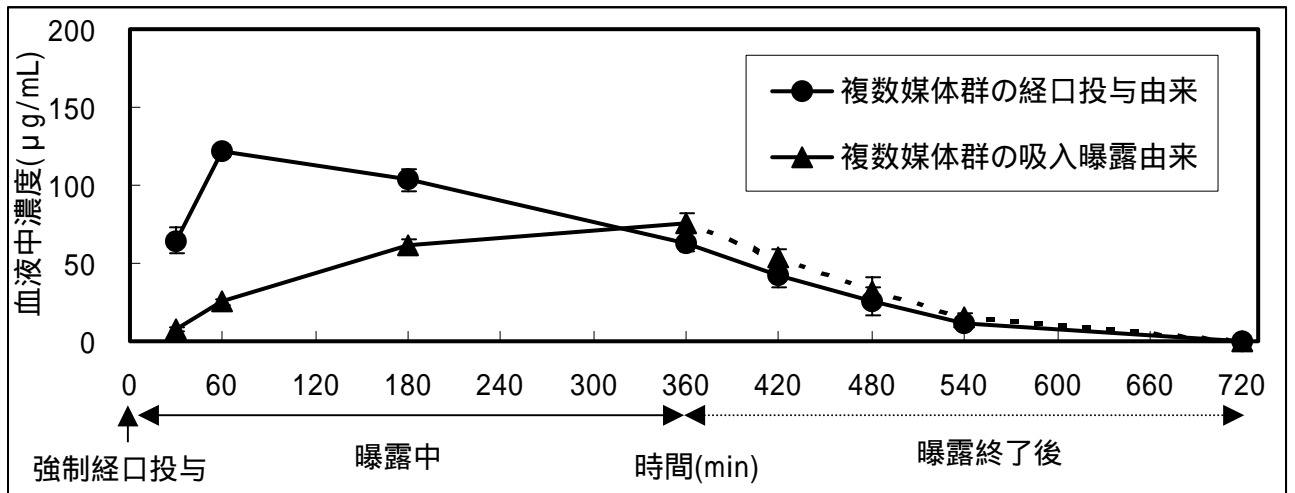


Figure 2-3. 複数媒体投与群の血液中濃度

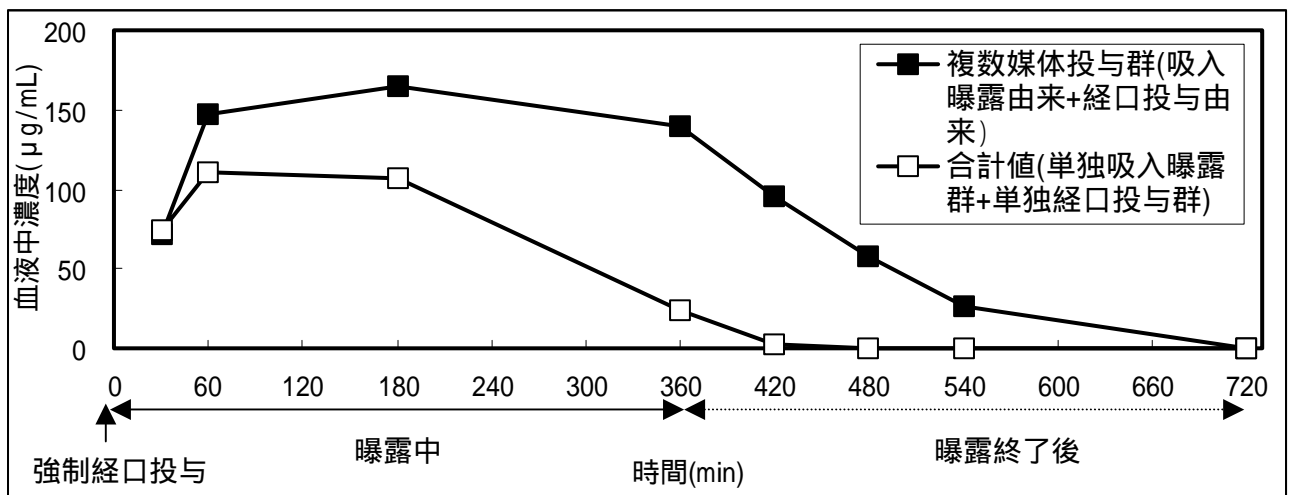


Figure 2-4. 血液中濃度の合計値

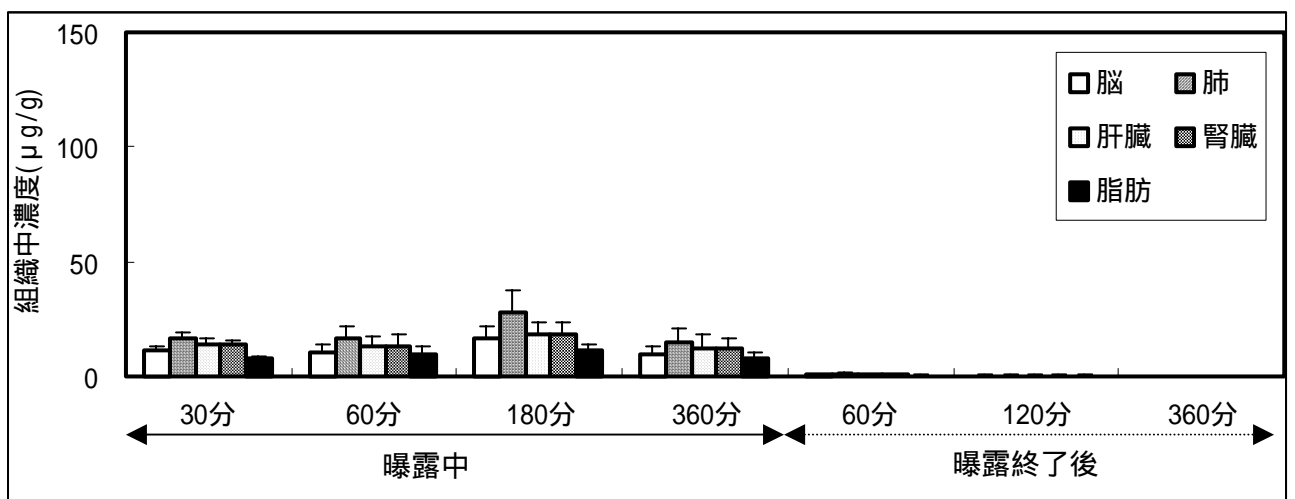


Figure 3-1. 単独吸入曝露群の組織中濃度

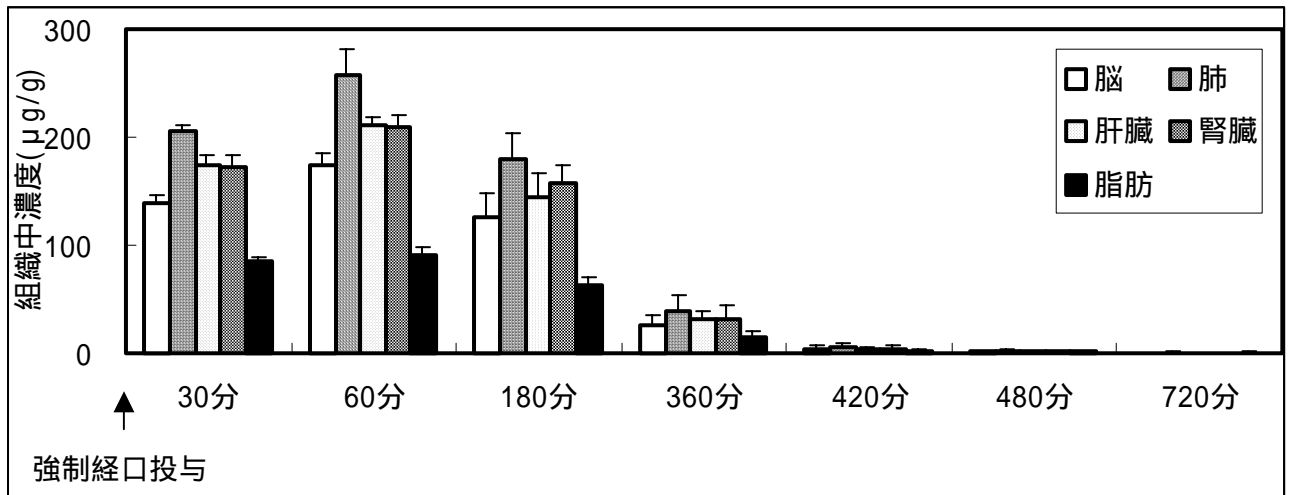


Figure 3-2. 単独経口投与群の組織中濃度

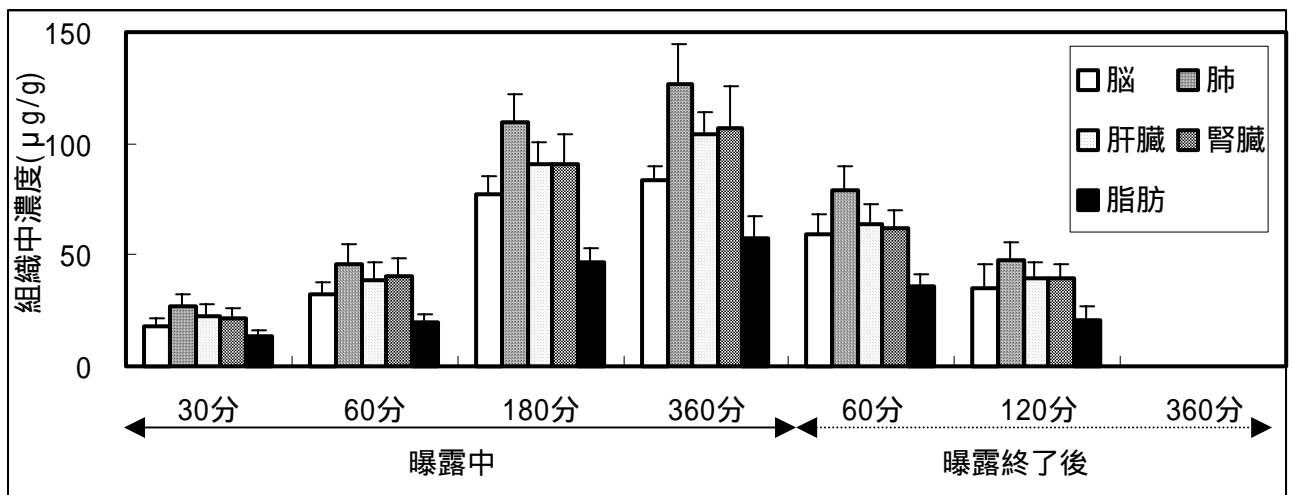


Figure 3-3-1. 複数媒体群の吸入曝露由来の組織中濃度

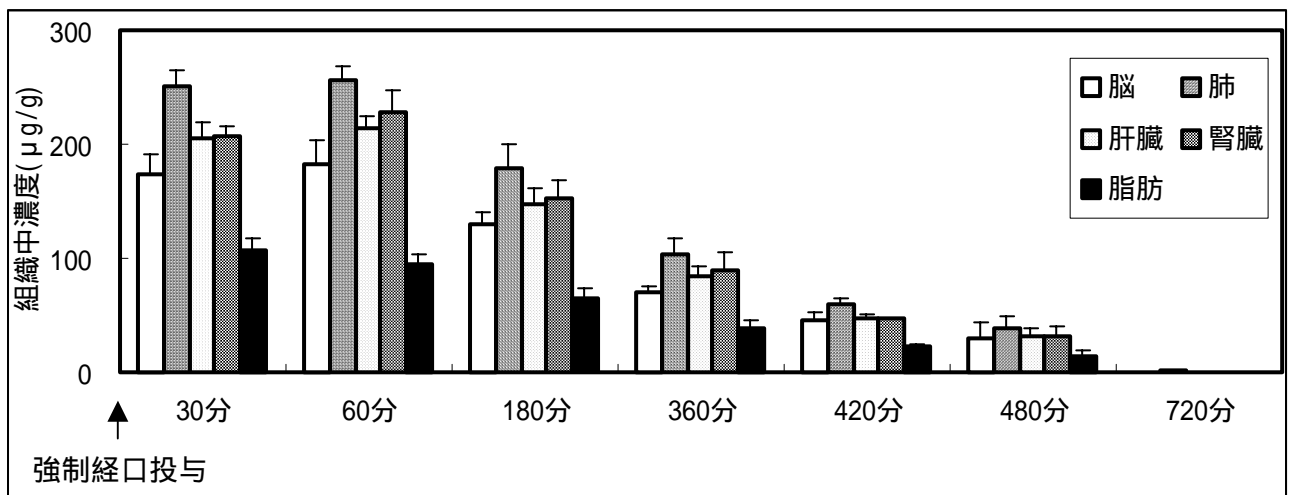


Figure 3-3-2. 複数媒体群の経口投与由来の組織中濃度

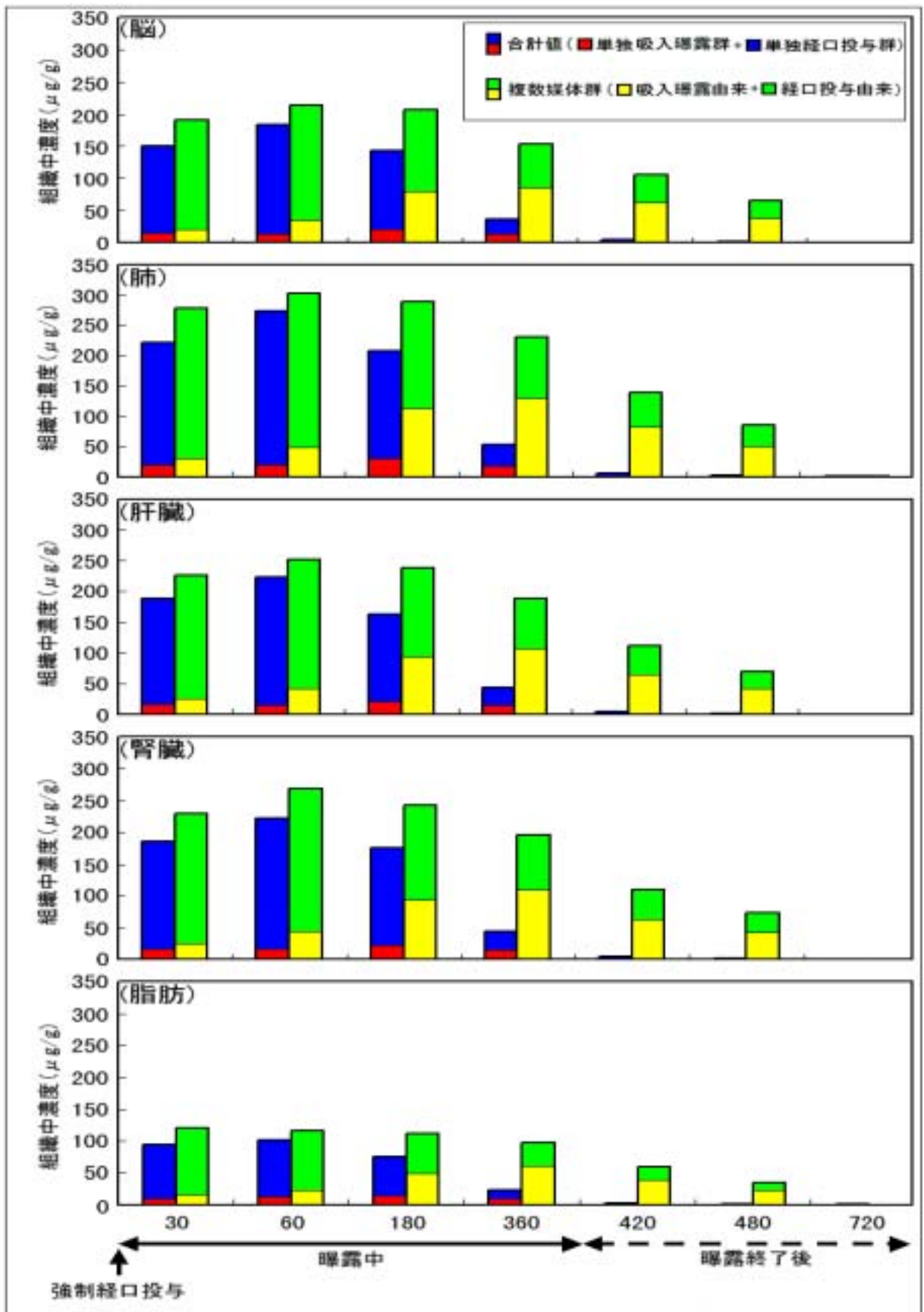


Figure 3-4. 組織中濃度の合計値

Table 1. 動物の体重値の平均値と標準偏差

	対照群	単独吸入曝露群	単独経口投与群	複数媒体投与群
血液中濃度測定群	B-C 群	B-I 群	B-G 群	B-G+I 群
	280 ± 3 ^a	285 ± 10	289 ± 4	291 ± 7
組織中濃度測定群	T-C 群	T-I 群	T-G 群	T-G+I 群
	279 ± 5	279 ± 15	278 ± 9	271 ± 6

^a 体重値の平均値 (g) ± 標準偏差 (g)

Table 2. 血液中濃度の合計値の比率

	30分	60分	180分	360分	420分	480分	540分	720分
単独 ^a	1	1	1	1	1	1	-	-
複数 ^b	0.98 ^c	1.33	1.54	5.70	34.65	251.57	-	-

^a : 単独吸入曝露群+単独経口投与群の血液中濃度の合計値

^b : 複数媒体投与群 (吸入曝露由来+経口投与由来) の血液中濃度

^c : 単独吸入曝露群+単独経口投与群の血液中濃度の合計値を 1 とした時の複数媒体投与群 (吸入曝露由来+経口投与由来) の血液中濃度の比率

Table 3. 組織中濃度の合計値の比率

	30分	60分	180分	360分	420分	480分	720分
脳 単独 ^a	1	1	1	1	1	1	-
複数 ^b	1.26 ^c	1.16	1.45	4.27	24.20	40.94	-
肺 単独	1	1	1	1	1	1	1
複数	1.25	1.10	1.39	4.27	23.31	31.17	1.06
肝臓 単独	1	1	1	1	1	1	-
複数	1.20	1.13	1.46	4.39	28.29	41.82	-
腎臓 単独	1	1	1	1	1	1	-
複数	1.23	1.21	1.39	4.45	25.77	45.51	-
脂肪 単独	1	1	1	1	1	1	1
複数	1.28	1.14	1.49	4.25	20.13	21.74	0.50

^a : 単独吸入曝露群+単独経口投与群の組織中濃度の合計値

^b : 複数媒体投与群 (吸入曝露由来+経口投与由来) の組織中濃度

^c : 単独吸入曝露群+単独経口投与群の組織中濃度の合計値を 1 とした時の複数媒体投与群 (吸入曝露由来+経口投与由来) の組織中濃度の比率

(4) 1,2-ジクロロエタン

1. 試験目的

当センターで、環境省の委託により、1,2-ジクロロエタンのラットを用いた複数媒体投与（吸入曝露及び経口投与）によるがん原性試験を実施した。今回、複数媒体投与による生体影響のメカニズムを明らかにすることを目的として、ラットに1,2-ジクロロエタンを吸入曝露及び1,2-ジクロロエタン-d4を経口投与し、血液及び組織中の未変化体の濃度を経時的に測定した。

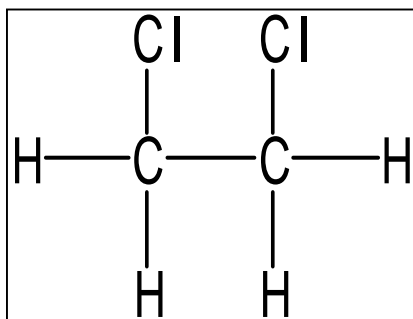
2. 試験方法

2.1 被験物質

吸入曝露に用いた被験物質の作製は（株）日本酸素に依頼した。その調製方法は関東化学製の1,2-ジクロロエタン（純度99.5%以上）を窒素で濃度2000ppm（成分分析値：1990～2070ppm）に希釈し、ボンベに充填した。

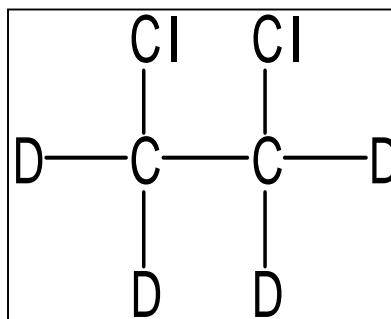
経口投与に用いた被験物質はCambridge Isotope Laboratories, Inc.製の1,2-ジクロロエタン-d4（純度98%以上）を使用した。

吸入曝露



1,2-ジクロロエタン

経口投与



1,2-ジクロロエタン-d4

2.2 投与方法

2.2.1 吸入曝露

被験物質の投与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 に示した。所定濃度の被験物質ボンベを新鮮空気と酸素ボンベで約12.5倍希釈して設定濃度に調整後、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投与を行った。投与期間は1日最高6時間/1回曝露し、投与濃度は複数媒体投与（吸入曝露及び経口投与）によるがん原性試験で実施した160ppmの投与濃度を設定した。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 40、注入口温度は 200、検出器温度は 200、試料注入量は 1mL とした。

2.2.2 経口投与

被験物質の投与はラットに強制経口投与（単回投与）を行った。

投与用量は複数媒体投与（吸入曝露及び経口投与）によるがん原性試験の飲水による投与群の摂取量から換算して、50mg/kg・BW とした。動物に与える投与量は 1,2-ジクロロエタン-d4 を 5mg/mL になるように蒸留水に溶解しラットに体重 1kg 当たり 10 mL 強制経口投与した。

2.2.3 複数媒体投与

上記の吸入曝露と経口投与を同条件下において、同時に投与した。

2.3 使用動物

F344/DuCrj の SPF 雄ラット（日本チャールス・リバー厚木飼育センター）を用いた。ラットは 15 週齢（導入匹数：30 匹、動物番号：5001～5030）、16 週齢（導入匹数：65 匹、動物番号：5031～5095）、17 週齢（導入匹数：20 匹、動物番号：5096～5115）で導入し、1 週間の検疫・馴化を行った。投与は投与実施日の前日の夕刻に絶食し、18 週齢に達した動物を使用した。

2.4 群の構成及び各群の使用動物数

ラットを血液中濃度測定群 20 匹と組織中濃度測定群 95 匹の 2 群に分けた。血液中濃度測定群は更に 1 群 5 匹ずつ、組織中濃度測定群は更に 30 匹ずつ（ただし対照群のみは 5 匹）分け、対照群と単独吸入曝露群、単独経口投与群及び複数媒体投与群の 3 群の合計 8 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
対照群	B-C	T-C
使用動物数 (動物番号)	5匹 (5111～5115)	5匹 (5091～5095)
単独吸入曝露群	B-I	T-I
使用動物数 (動物番号)	5匹 (5106～5110)	30匹 (5031～5040、 5071～5090)
単独経口投与群	B-G	T-G
使用動物数 (動物番号)	5匹 (5101～5105)	30匹 (5041～5070)
複数媒体投与群	B-G+I	T-G+I
使用動物数 (動物番号)	5匹 (5096～5100)	30匹 (5001～5030)

* 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：単独経口投与群、
G + I：複数媒体投与群

2.5 1,2-ジクロロエタン及び1,2-ジクロロエタン-d4の血液及び組織中濃度測定

2.5.1 血液

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。B-C 群は動物搬出後、B-I 群は吸入曝露開始 15、30、60、180、360、吸入曝露終了後 30、60、120、180 分で、B-G 群は経口投与後 15、30、60、180、360、390、420、480、540 分で、B-G+I 群は吸入曝露開始 15、30、60、180、360、吸入曝露終了後 30、60、120、180 分（経口投与後 15、30、60、180、360、390、420、480、540 分）で採血した。採血した血液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。

2.5.2 組織

組織は動物をエ - テル麻酔下で解剖し、脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪を採取した。T-C 群は動物搬出後、T-I 群は吸入曝露開始 30、60、180、360、吸入曝露終了後 30、120 分で、T-G 群は経口投与後 30、60、180、360、390、480 分で、T-G+I 群は吸入曝露開始 30、60、180、360、吸入曝露終了後 30、120 分（経口投与後 30、60、180、360、390、480 分）で採取した。採取した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。

2.5.3 ヘッドスペース-GC/MS 分析条件

ヘッドスペース（ヒューレットパッカード社 HP7694）-GC/MS（ヒューレットパッカード社 HP5989B）を用いて 1,2-ジクロロエタン及び 1,2-ジクロロエタン-d4 の血液及び組織中濃度を測定した。

ヘッドスペースの分析条件として、オープン温度は 80 、ループ温度は 130 、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-1（0.25mmφ × 60m）、キャリアーガスはヘリウムを用い、カラム温度は 100 、流量は 1mL/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 とした。なお、血液及び組織中濃度の定量は 1,2-ジクロロエタンのフラグメントイオンピークである 62m/z、1,2-ジクロロエタン-d4 のフラグメントイオンピークである 65m/z のピークによる SIM 法により実施した。

3. 結果

3.1 生死状況

全動物とも、投与の影響による死亡はみられなかった。

3.2 体重

投与時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。全動物において、特に変化はみられなかった。

3.3 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 158 ± 3 ppm であり、被験物質濃度は設定濃度にきわめて近い値であることから、適正な濃度でラットに曝露されたことを確認した。

3.4 1,2-ジクロロエタン及び1,2-ジクロロエタン-d4の血液中濃度測定結果

各群における1,2-ジクロロエタン及び1,2-ジクロロエタン-d4の血液中濃度測定結果を Figure 2-1~2-4 及び Table 2 に示した。なお、1,2-ジクロロエタン及び1,2-ジクロロエタン-d4 を投与していない対照群のラットの血液中では1,2-ジクロロエタン及び1,2-ジクロロエタン-d4 は認められなかった。

3.4.1 単独吸入曝露群

Figure 2-1 に示したように、吸入曝露開始 15 分においてラットの血液中に1,2-ジクロロエタンが認められ、吸入曝露開始 60~360 分で血液中濃度はほぼ一定濃度であった。吸入曝露終了後は血液中濃度が減衰し始め、吸入曝露終了後 180 分まで血液中に1,2-ジクロロエタンが認められた。

3.4.2 単独経口投与群

Figure 2-2 に示したように、経口投与後 15 分においてラットの血液中に1,2-ジクロロエタン-d4 が認められ、経口投与後 30 分で最高濃度に達し、血液中濃度は経口投与後 60 分以降、急速に減衰し、以後、経口投与後 540 分まで血液中に1,2-ジクロロエタン-d4 が認められた。

3.4.3 複数媒体投与群

Figure 2-3 に示したように、吸入曝露は吸入曝露開始 15 分においてラットの血液中に1,2-ジクロロエタンが認められ、吸入曝露開始 60 分~360 分で血液中濃度はほぼ一定濃度であった。吸入曝露終了後は血液中濃度が減衰し始め、吸入曝露終了後 180

分まで血液中に 1,2-ジクロロエタンが認められた。経口投与は経口投与後 15 分においてラットの血液中に 1,2-ジクロロエタン-d4 が認められ、経口投与後 60 分で最高濃度に達した後、血液中濃度は急速に減衰し、以後、経口投与後 540 分まで血液中に 1,2-ジクロロエタン-d4 が認められた。

3.4.4 血液中濃度の合計値の比較

Figure 2-4 に血液中濃度の合計値（単独吸入曝露群 + 単独経口投与群、及び複数媒体投与群（吸入曝露由来 + 経口投与由来））を示した。単独で投与した群の合計値に比べ、複数媒体で投与した群の血液中濃度の減衰は多少ゆるやかであった。また、Table 2 に各採血時間の血液中濃度の合計値の比率（単独吸入曝露群 + 単独経口投与群を 1 とした時の複数媒体投与群（吸入曝露由来 + 経口投与由来）の比率）を示した。単独で投与した群の合計値と複数媒体で投与した群の各採血時間における比率は極端に差があるものはなかった。

3.4.5 血液中濃度のまとめ

単独吸入曝露群と複数媒体投与群の吸入曝露由来の血液中濃度の経時的変化はほぼ同じ推移であった。また、単独経口投与群と複数媒体投与群の経口投与由来の血液中濃度を比べると、複数媒体投与群の経口投与後 180 ~ 420 分における血液中濃度の減衰は多少ゆるやかであった。以上のことより単独群と複数媒体群を比較するために、血液中濃度の合計値の比率を比較すると、単独で投与した群と複数媒体で投与した群では極端に差がみられなかった。

3.5 1,2-ジクロロエタン及び 1,2-ジクロロエタン-d4 の組織中濃度測定結果

各群における 1,2-ジクロロエタン及び 1,2-ジクロロエタン-d4 の組織中濃度測定結果を Figure 3-1 ~ 3-4 及び Table 3 に示した。なお、1,2-ジクロロエタン及び 1,2-ジクロロエタン-d4 を投与していない対照群のラットの組織中では 1,2-ジクロロエタン及び 1,2-ジクロロエタン-d4 は認められなかった。

3.5.1 単独吸入曝露群

Figure 3-1 に単独吸入曝露群の組織中濃度を示した。

（ア）経時的変化

吸入曝露開始 30 分においてラットの各組織（脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪）中に 1,2-ジクロロエタンが認められた。脳、肺、肝臓、腎臓においては、吸入曝露開始

30～360分で組織中濃度はほぼ一定濃度であった。吸入曝露終了後は各組織とも組織中濃度が減衰したが、吸入曝露終了後120分まで1,2-ジクロロエタンが認められた。脂肪においては、曝露中は曝露時間が増すほど1,2-ジクロロエタンの脂肪中濃度が増加し、吸入曝露終了後は脂肪中濃度が減衰したが、吸入曝露終了後120分まで1,2-ジクロロエタンが認められた。

(イ) 組織分布

各組織(脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪)中の濃度を比べると、脳、肺、肝臓、腎臓においては、各組織とも曝露中はほぼ同じ濃度で分布したが脂肪においては、高い濃度で分布した。各採取時間とも脂肪における含有量が他の組織に比べ、多かったことに関して、1,2-ジクロロエタンの脂溶性が高いため、脂肪への分布が多いことが考えられた。

3.5.2 単独経口投与群

Figure 3-2に単独経口投与群の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化

経口投与後30分においてラットの各組織(脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪)中に1,2-ジクロロエタン-d4が認められた。経口投与後30分で脳、肺、肝臓、腎臓が最高濃度、経口投与後60分で脂肪が最高濃度に達した。脳、肺、肝臓、腎臓においては経口投与後60分以降、脂肪においては最高濃度に達した後、組織中濃度は急速に減衰したが、経口投与後480分まで各組織中に1,2-ジクロロエタン-d4が認められた。

(イ) 組織分布

各組織(脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪)中の濃度を比べると、経口投与後の最高濃度で脳、肺、肝臓、腎臓の組織中濃度に対して、脂肪の組織中濃度はかなり高く、局在的に脂肪に分布した。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。この事は1,2-ジクロロエタンと同様の物理化学的性質を有する1,2-ジクロロエタン-d4は脂溶性が高いため、脂肪への分布が多いことが考えられた。

3.5.3 複数媒体投与群

3.5.3.1 複数媒体群の吸入曝露由来

Figure 3-3-1に複数媒体投与群の吸入曝露由来の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化

吸入曝露開始30分においてラットの各組織(脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪)中

に1,2-ジクロロエタンが認められた。脳、肺、肝臓、腎臓においては、吸入曝露開始 30～360 分で組織中濃度はほぼ一定濃度であった。吸入曝露終了後は各組織とも組織中濃度が減衰したが、吸入曝露終了後 120 分まで 1,2-ジクロロエタンが認められた。脂肪においては、曝露中は曝露時間が増すほど 1,2-ジクロロエタンの脂肪中濃度が増加し、吸入曝露終了後は脂肪中濃度が減衰したが、吸入曝露終了後 120 分まで 1,2-ジクロロエタンが認められた。

(イ) 組織分布

各組織（脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪）中の濃度を比べると、脳、肺、肝臓、腎臓においては各組織とも曝露中はほぼ同じ濃度で分布したが脂肪においては、高い濃度で脂肪に分布した。各採取時間とも脂肪における含有量は他の組織に比べ、多かった。

3.5.3.2 複数媒体群の経口投与由来

Figure 3-3-2 に複数媒体投与群の経口投与由来の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化)

経口投与後 30 分においてラットの各組織（脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪）中に 1,2-ジクロロエタン-d4 が認められた。経口投与後 30 分で脳、肺、肝臓、腎臓が最高濃度、経口投与後 60 分で脂肪が最高濃度に達した。脳、肺、肝臓、腎臓においては経口投与後 60 分以降、脂肪においては最高濃度に達した後、組織中濃度は急速に減衰したが、経口投与後 480 分まで各組織中に 1,2-ジクロロエタン-d4 が認められた。

(イ) 組織分布

各組織（脳、肺、肝臓、腎臓、脂肪）中の濃度を比べると、経口投与後の最高濃度で脳、肺、肝臓、腎臓の組織中濃度に対して、脂肪の組織中濃度はかなり高く、局在的に脂肪に分布した。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。

3.5.4 組織中濃度の合計値の比較

Figure 3-4 に組織中濃度の合計値（単独吸入曝露群 + 単独経口投与群、及び複数媒体投与群（吸入曝露由来 + 経口投与由来））を示したように、複数媒体で投与したことにより、組織中濃度は単独で投与した群に比べ、脂肪中での濃度に多少の差があった。また、Table 3 に各採取時間の組織中濃度の合計値の比率（単独吸入曝露群 + 単独経口投与群を 1 とした時の複数媒体投与群（吸入曝露由来 + 経口投与由来）の比率）を示したように各採取時間の比率は極端に差があるものはなかった。

3.5.5 組織中濃度のまとめ

単独吸入曝露群と複数媒体投与群の吸入曝露由来の組織中濃度の経時的变化はほぼ同じ推移であった。単独経口投与群と複数媒体投与群の経口投与由来の組織中濃度を比べると、複数媒体群の経口投与の脂肪中での濃度に多少の差があった。以上のことより、単独群と複数媒体群を比較するために、組織中濃度の合計値の比率を比較すると、単独で投与した群と複数媒体で投与した群では極端に差がみられなかった。

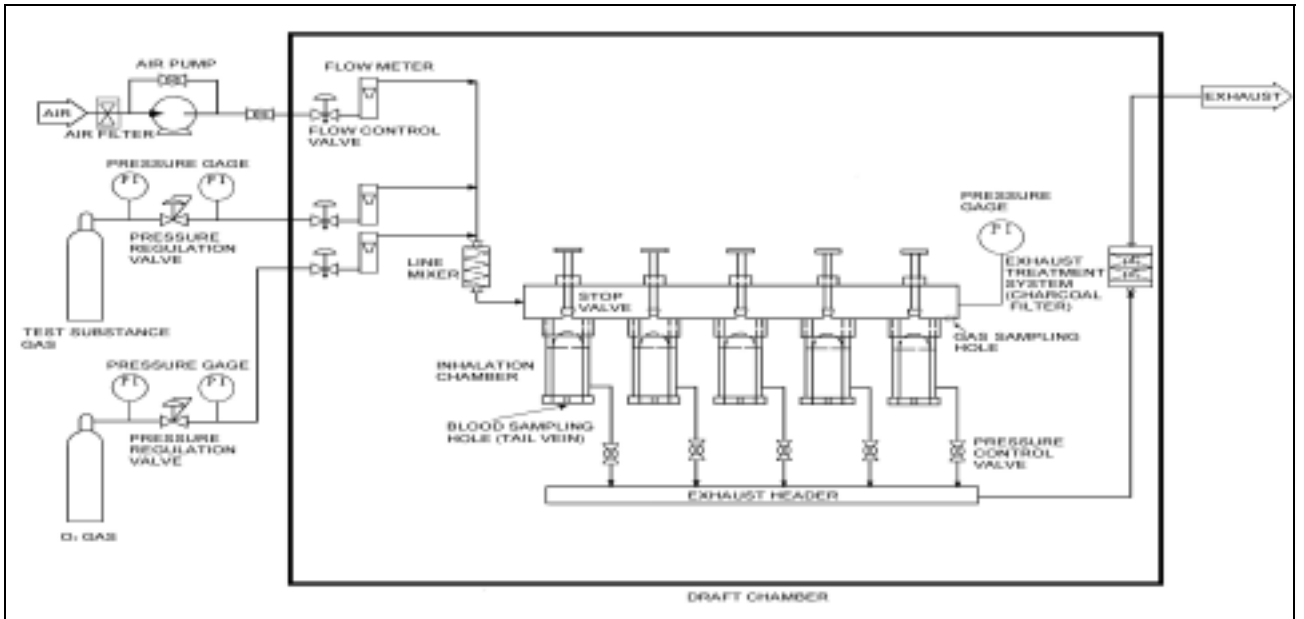


Figure 1. 吸入曝露装置

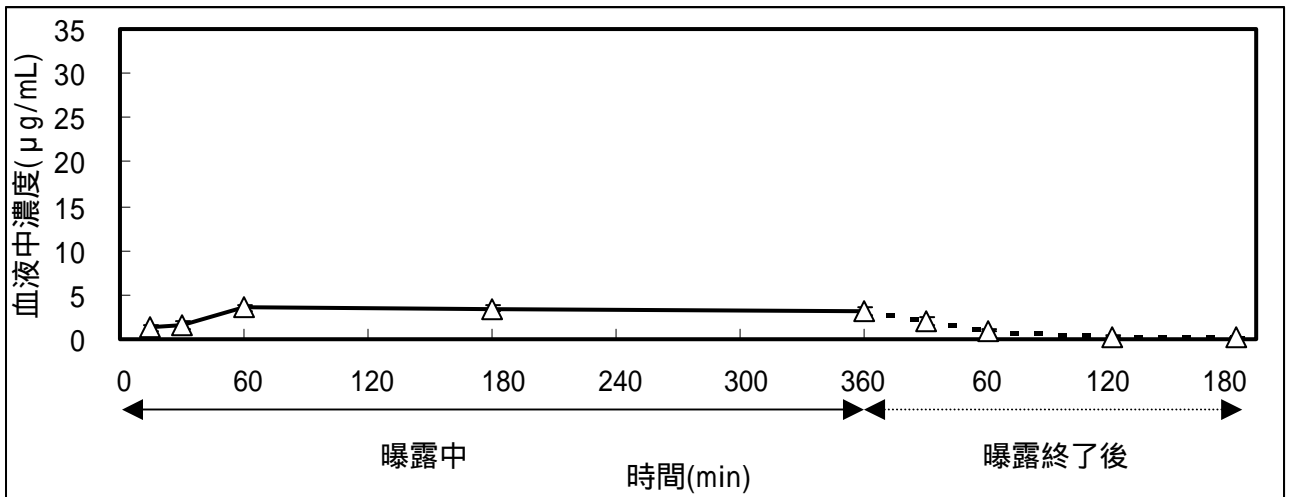


Figure 2-1. 単独吸入曝露群の血液中濃度

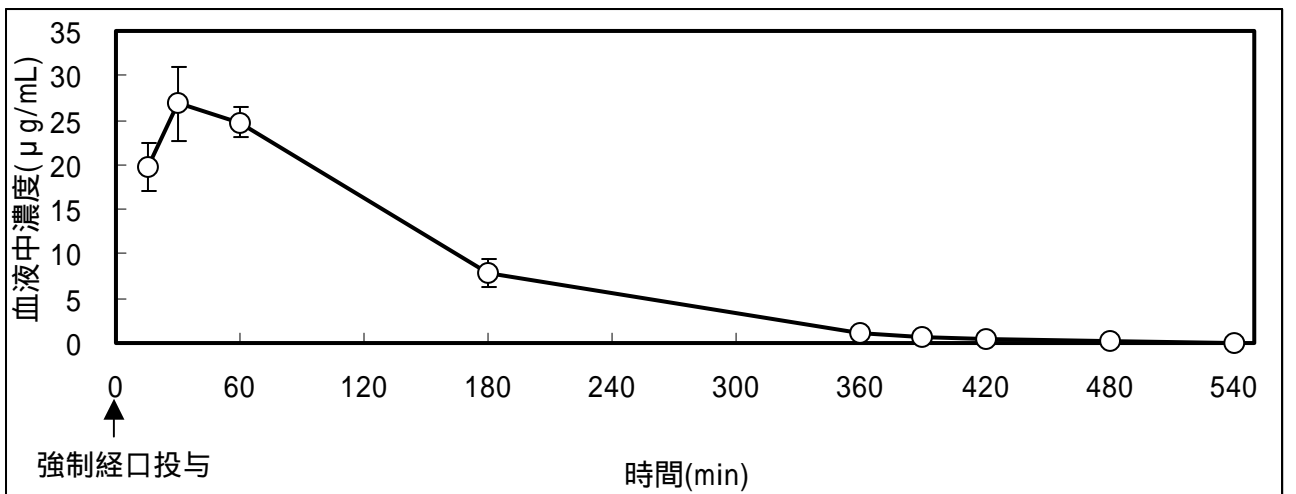


Figure 2-2. 単独経口投与群の血液中濃度

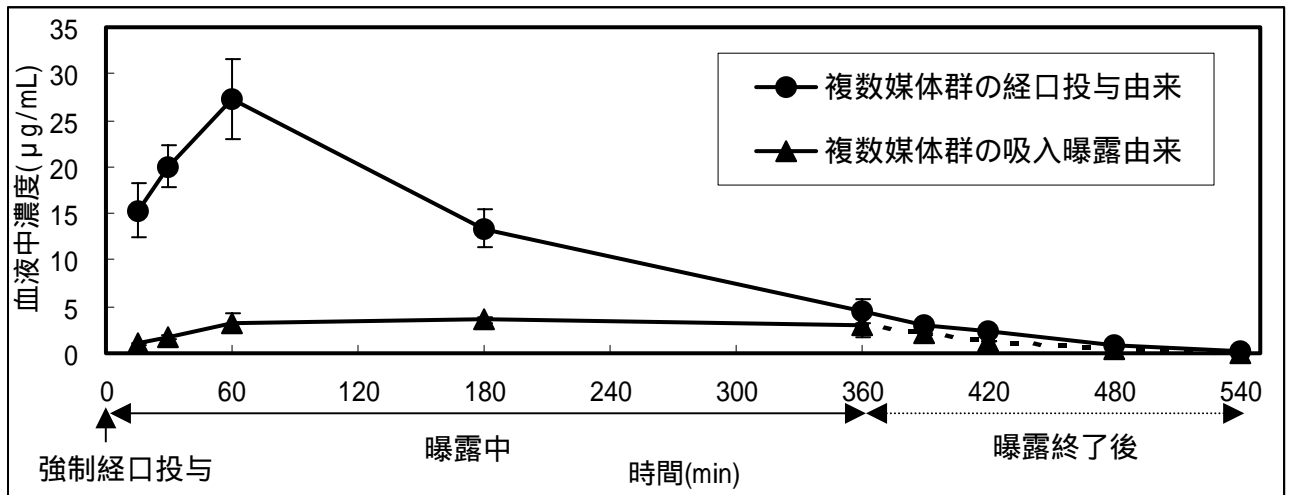


Figure 2-3. 複数媒体投与群の血液中濃度

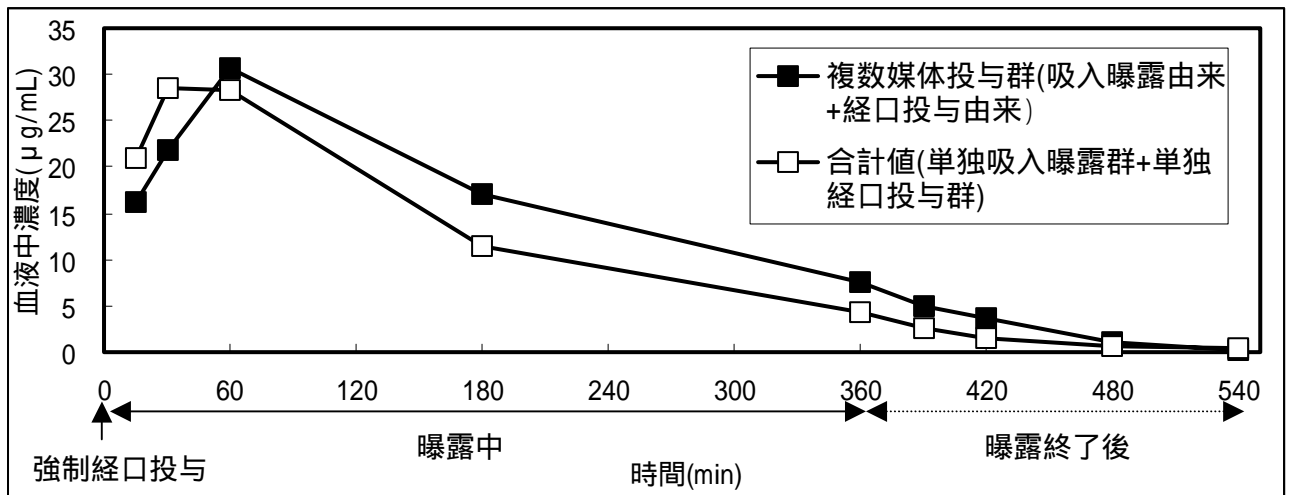


Figure 2-4. 血液中濃度の合計値

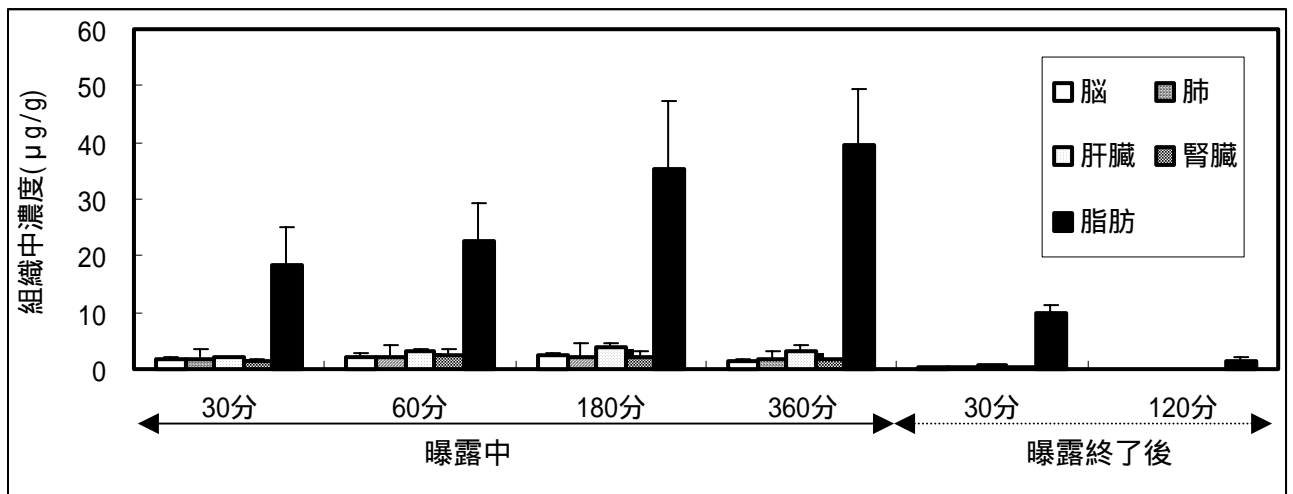


Figure 3-1. 単独吸入曝露群の組織中濃度

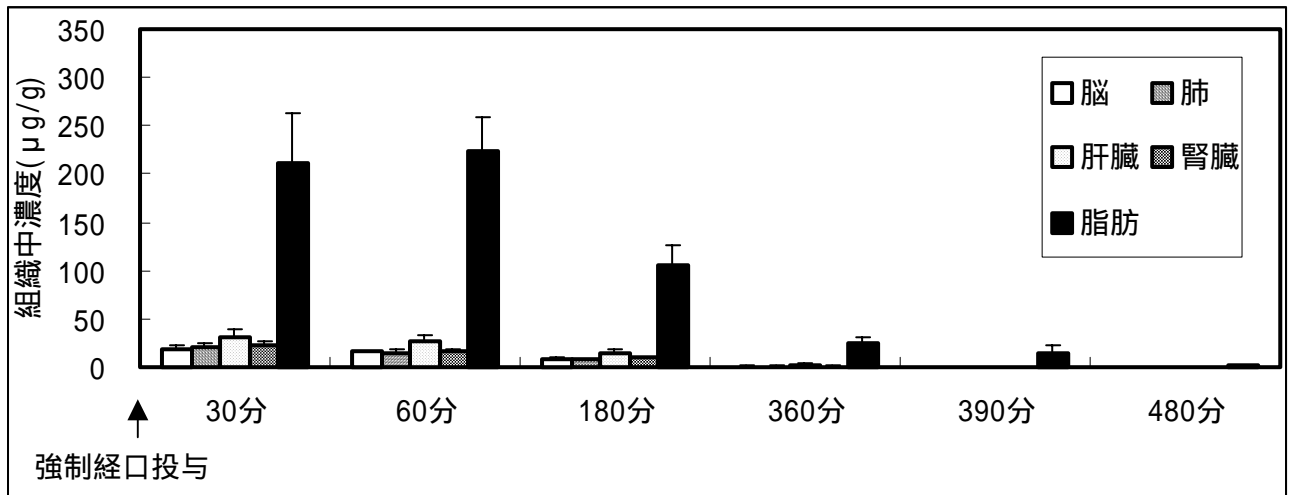


Figure 3-2. 単独経口投与群の組織中濃度

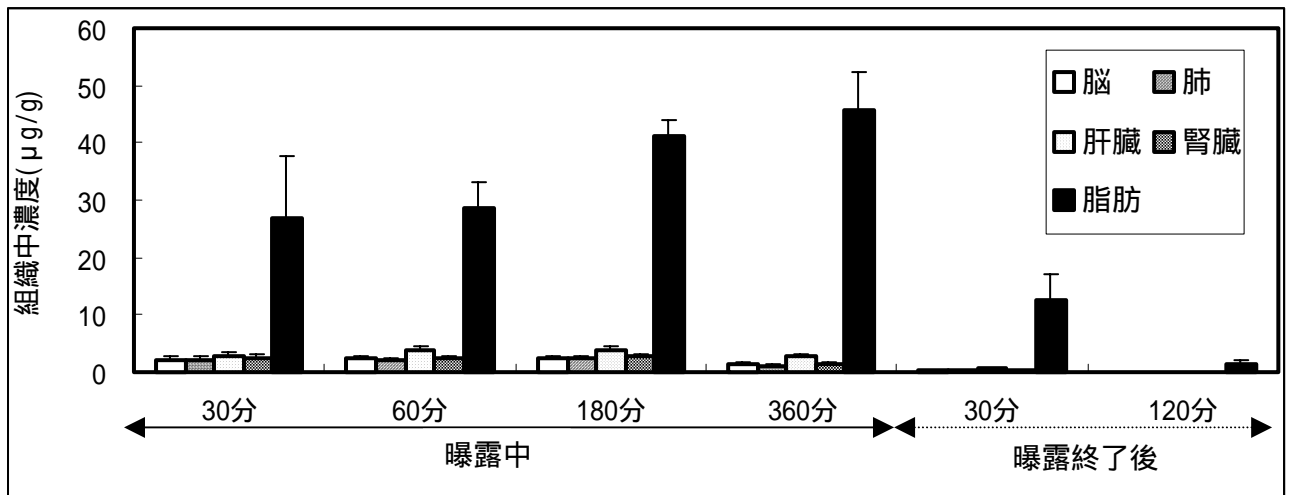


Figure 3-3-1. 複数媒体群の吸入曝露由来の組織中濃度

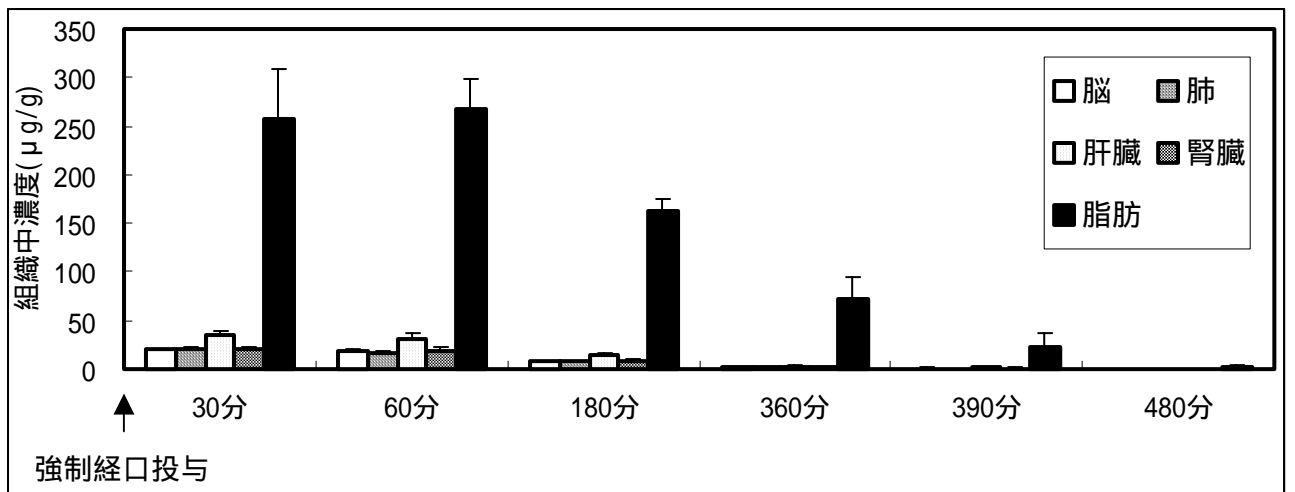


Figure 3-3-2. 複数媒体群の経口投与由来の組織中濃度

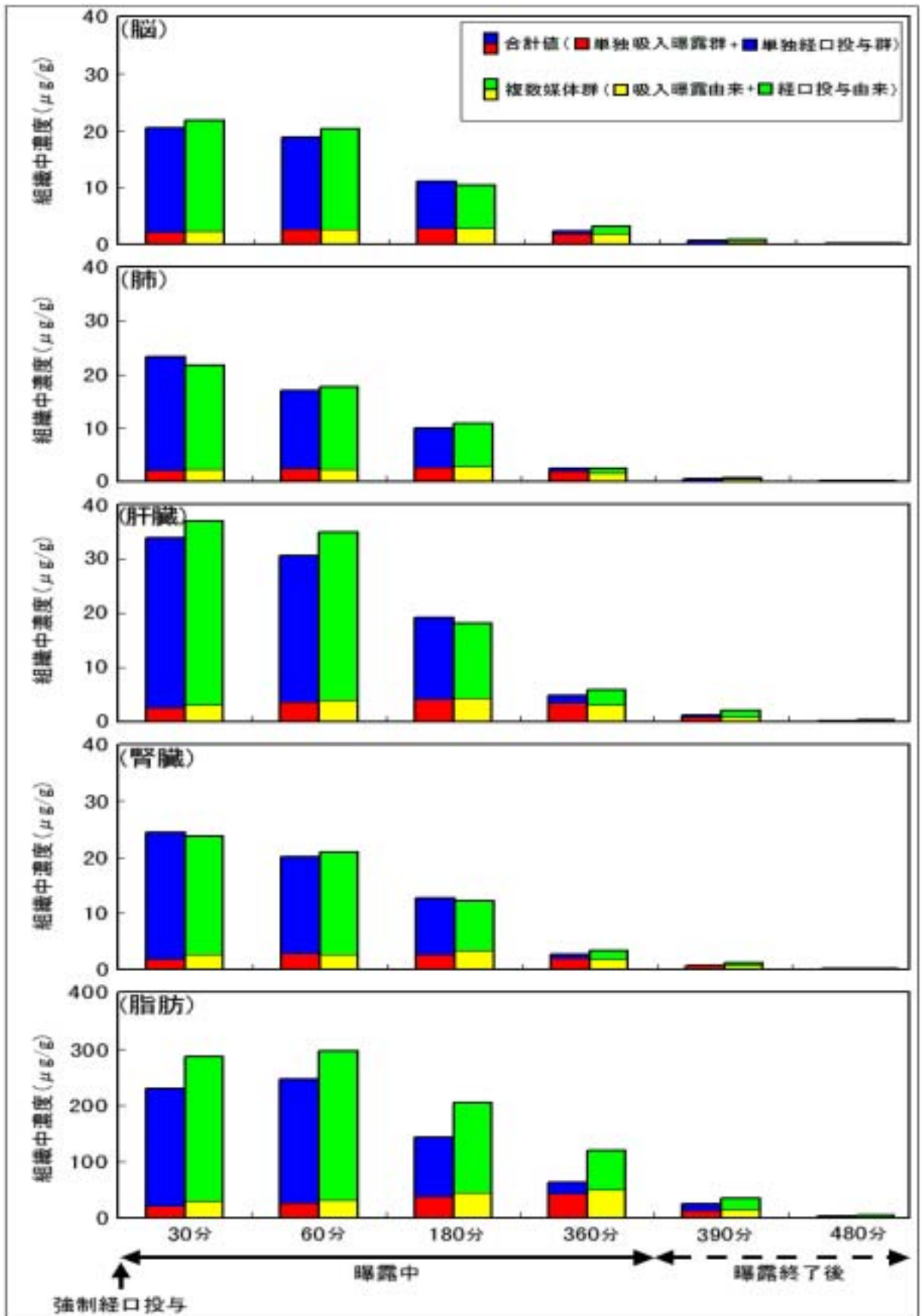


Figure 3-4. 組織中濃度の合計値

Table 1. 動物の体重値の平均値と標準偏差

	対照群	単独吸入暴露群	単独経口投与群	複数媒体投与群
血液中濃度測定群	B-C 群	B-I 群	B-G 群	B-G+I 群
	282 ± 8 ^a	274 ± 8	282 ± 5	278 ± 8
組織中濃度測定群	T-C 群	T-I 群	T-G 群	T-G+I 群
	268 ± 14	267 ± 13	251 ± 5	262 ± 7

^a 体重値の平均値 (g) ± 標準偏差 (g)

Table 2. 血液中濃度の合計値の比率

	15分	30分	60分	180分	360分	390分	420分	480分	540分
単独 ^a	1	1	1	1	1	1	1	1	1
複数 ^b	0.78 ^c	0.76	1.09	1.50	1.77	1.89	2.50	1.93	0.62

^a : 単独吸入暴露群+単独経口投与群の血液中濃度の合計値

^b : 複数媒体投与群 (吸入暴露由来+経口投与由来) の血液中濃度

^c : 単独吸入暴露群+単独経口投与群の血液中濃度の合計値を 1 とした時の複数媒体投与群 (吸入暴露由来+経口投与由来) の血液中濃度の比率

Table 3. 組織中濃度の合計値の比率

		30分	60分	180分	360分	390分	480分
脳	単独 ^a	1	1	1	1	1	1
	複数 ^b	1.07 ^c	1.08	0.94	1.31	1.32	1.16
肺	単独	1	1	1	1	1	1
	複数	0.93	1.05	1.09	1.02	1.25	0.91
肝臓	単独	1	1	1	1	1	1
	複数	1.09	1.14	0.94	1.21	1.60	1.46
腎臓	単独	1	1	1	1	1	1
	複数	0.97	1.04	0.96	1.24	1.53	1.00
脂肪	単独	1	1	1	1	1	1
	複数	1.24	1.20	1.44	1.86	1.42	1.32

^a : 単独吸入曝露群+単独経口投与群の組織中濃度の合計値

^b : 複数媒体投与群（吸入曝露由来+経口投与由来）の組織中濃度

^c : 単独吸入曝露群+単独経口投与群の組織中濃度の合計値を1とした時の複数媒体投与群（吸入曝露由来+経口投与由来）の組織中濃度の比率

(5) 結論

クロロホルムでは、複数媒体投与により腫瘍の顕著な増加があった腎臓の濃度は単独吸入曝露と単独強制経口投与の相加的な量に比べ、複数媒体投与により約 2 倍の組織中濃度の増加がみられた。1,2-ジクロロエタンについては、腹膜脂肪中の濃度に関して、複数媒体投与による効果はみられなかった。1,4-ジオキサンについては、各組織において単独吸入曝露に比べ、複数媒体投与が組織中濃度は著しく高かったものの、腫瘍発生への影響については複数媒体投与による効果はみられなかった。

3. 文献調査

(1) 調査物質

化学物質の複数媒体曝露及び複数化学物質による複合曝露による健康影響に関する調査対象物質は「化学物質排出把握管理促進法施行令(政令)」で「第一種指定化学物質」として指定された 354 物質とした。これらの物質について

1. 「平成 13 年度版、化学物質と環境」(黒本調査)の環境調査実施化学物質一覧(昭和 49 年度～平成 12 年度)の検出例と検出範囲に記載された、水質、底質、魚類、大気についての検出データ
2. 「平成 13 年度 PRTR データの概要 - 化学物質の排出量・移動量の集計結果 - 」の、全国の届出排出量・移動量、全国の届出外排出量をまとめ、その他の情報を追加した。

(2) Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures(EPA/630/R-00/002 August 2000)

1986 年に出された EPA のガイドライン「化学物質混合物の健康リスクアセスメントへのアプローチ」という文書の補足として方法論をある程度具体化したものである。構成として、総論に続いて、Whole-mixture(混合物全体)としてリスクデータが存在する場合についての方法を述べ、Whole-mixture のデータが存在しない場合に構成成分のデータから混合物のリスクアセスメントを行う方法が述べられている。

この文書での混合物は、成分やその割合が一定な製品としての混合物だけでなく、ディーゼルエンジンや焼却炉の排ガス、製品の副産物、土壤汚染や、廃棄物処理場からの漏れ等、広い範囲の物質群を混合物として定義している。このため、成分も一定でなく、時間によってもその成分が変化していくこともあり得る。

データには、毒性、健康への影響、用量反応、疫学、また曝露データには、環境濃度、曝露ルート等があげられている。これらのデータが Whole-mixtur そのものであれば良いが、無い場合、恐らく大多数であろうが、まず十分に類似した混合物、Similar-mixtur について比較検討し、そういったデータが無ければ、混合物の各構成成分のデータに基づいた評価を行う。特に構成成分の中でも定量的な作用に十分な情報があれば、それについて評価を行う。それが無ければ、全ての構成成分について、追加した研究を行い、リスク評価が必要になる。実際の評価としては、EPA の IRIS(Integrated Risk Information System)のような形を想定している。

(3) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures

「化学物質及び混合物のヒトの健康と環境災害についての国際調和分類システム(GHS)」

(OECD series on testing and assessment No.33) (2001:OECD)

具体的、实际的に MSDS や容器のラベルでどのように有害性表示するかを示している。この文献での混合物の定義は、その構成成分が混合物になることで、化学反応を起さない、静的な混合物である。

すでに毒性が評価されている化学物質については、そのデータの有効利用が、動物愛護とも関連し強調されている。まず混合物で無い、化合物について、急性毒性、皮

膚刺激/腐食性、眼刺激/腐食性、皮膚・呼吸器感作性、生殖細胞変異原性、がん原性、生殖毒性、単回暴露による標的臓器・全身毒性、反復暴露における標的臓器・全身毒性、水生環境影響の10種類の毒性の分類基準(カテゴリー分け)を示している。急性毒性については、経口、経皮、及び吸入毒性に分け、さらに吸入については、蒸気、ミスト、粉じんと細かく分け、さらにそれぞれについて一番強いカテゴリー1から弱い5までの分類基準が示されている。これらの単独の化合物の分類基準を示したうえで、混合物の分類方法を示している。まず、混合物そのものについての毒性情報があれば、それを用いて分類する。次に混合物の成分全て、あるいは大部分に毒性データがあれば加算方式を用いる。これは、たとえば皮膚刺激性・腐食性でカテゴリー1の物質が5%以上含まれていれば、カテゴリー1と分類し、1以上5%未満であればカテゴリー2と分類し、カテゴリー1の物質が含まれず、カテゴリー2の物質が10%以上含まれているなら、カテゴリー2という具合に各毒性ごとに分類する表が用意されている。最後に含有成分や、同等品のデータから毒性を推定しなければならない場合があるがこの場合は「つなぎの原則(Bridging Principle)」を適用する。つなぎの原則とは、

- 1.Dilution：無毒成分による希釈では希釈率に応じてLD₅₀値等を調整する。
- 2.Batching：バッチが異なっても同一製品の毒性は同じと推定する。
- 3.Concentration of Highly Toxic Mixtures：最強カテゴリーに分類された混合物より毒性が強いものは最強カテゴリーとする。
- 4.Interpolation Within One Toxicity Category：同一カテゴリーの二つの混合物の中間の毒性の場合は同一カテゴリーとする。
- 5.Substantially Similar Mixtures：毒性が同程度の物質を同量含む場合は同一カテゴリーとする。
- 6.Aerosols：毒性試験された混合物のエアロゾルは吸入経路による毒性を除いて、同じ分類とする。」である。

・総括

平成5年度より進めてきた本調査では、単一の曝露経路によるものと複数の曝露経路によるものでは影響の程度が異なることが示され、クロロホルムにおいては、複数媒体曝露により腫瘍の発生数の著明な増加が確認された。また、発生メカニズムについて調べるために、化学物質の組織濃度を測定したところ、クロロホルムにおいて複数媒体による曝露では組織濃度の著明な増加を認めた。

こうした研究により、従来から行われている単一媒体による曝露だけでなく、複数媒体による影響も考慮して化学物質の評価を行う必要があると考えられた。さらにメカニズムについての研究は、複数媒体効果の作用機序の解明に有益である事が示された。