

平成 17 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 18 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
I 調査概要 .....	1
1. 調査目的 .....	1
2. 調査内容 .....	1
3. 調査結果 .....	2
II 調査方法と結果 .....	3
1. 複数媒体暴露による長期試験 .....	3
2. 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究 .....	12
III 総括 .....	23
1. 複数媒体暴露による長期試験 .....	23
2. 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究 .....	23

## I 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、単一の媒体からの暴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暴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。複数媒体影響が確認されたクロロホルムを用いて、複数媒体影響発現のメカニズムを明らかにすることは、他の物質について、複数媒体影響の有無を予測するための基礎的知見として役立つと考えられる。このため、平成 16 年度に実施した、クロロホルムによる複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究では、5 日間暴露と 1 日間暴露の比較により未変化体の組織中蓄積性について検討した。

さらに、クロロホルム以外で複数媒体影響を示す化学物質を調査するため、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、複数の媒体からの暴露が予測される化学物質のうち、*N,N*-ジメチルホルムアミド（以下 DMF と略す。）について複数媒体暴露による予備的な動物実験（28 日間反復投与試験）を実施し、平成 16 年度には、長期暴露試験（2 年間の吸入経口暴露）を開始した。

これまでの結果をもとに、平成 17 年度は、DMF について長期複数媒体暴露試験を継続し、クロロホルムによる複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究については、クロロホルム代謝物の体内動態の検討を開始した。

## 2. 調査内容

### (1) 複数媒体暴露による長期試験

ラットにDMFを複数の媒体を通して（吸入および経口投与）2年間にわたり暴露し、一般状態観察、体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査および病理組織学的検査等を実施するための長期動物試験を継続した。

本年度は、DMFの複数媒体（吸入および経口）暴露を継続し、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定および摂水量測定を実施した。また、吸入暴露中のDMFの濃度については常時計測し、経口投与については投与飲水の調製、加圧式ポンベの圧力調整と点検、給水ノズルの不良点検（漏水等）を行った。さらに、動物の飼育管理では、飼育室の清掃・消毒、飼育器材（ケージ、餌箱、作業台、清掃用具等）の交換・洗浄・滅菌、吸入チャンバーや飼育室の環境（温度、湿度、差圧、換気量等）の常時監視を行った。

### (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、胆汁中のクロロホルム代謝物についての検討を行うため、吸入暴露を実施しながら胆汁を採取する方法及びその代謝物の分析法を確立し、実際に吸入暴露後の代謝物の定量を実施した。

## 3. 調査結果

### (1) 複数媒体暴露による長期試験

DMFを0 ppm、200 ppm および 400 ppm の濃度に調整した空気の吸入（全身暴露）と DMF を 0 ppm 、 800 ppm および 1600 ppm 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、すなわち複数媒体暴露による長期試験を実施し、54 週が経過した。

動物の死亡が、吸入 200 ppm + 経口 800 ppm 群（4 群）、吸入 200 ppm + 経口 1600 ppm 群（5 群）および吸入 400 ppm + 経口 0 ppm 群（6 群）で各一例認められた。一般状態の観察では、複数媒体暴露初期（1 から 2 週）に立毛が、吸入 400 ppm+ 経口 0 ppm 群(6 群)で 17/50 匹、吸入 400 ppm + 経口 800 ppm 群（7 群）で 16/50 匹および吸入 400 ppm + 経口 1600 ppm 群（8 群）で 20/50 匹に認められた。しかし、3 週目以降は、DMF 複数媒体暴露の影響と思われる

明らかな所見は認められていない。体重の推移では、複数媒体暴露濃度に依存（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。

これらの途中経過より、複数媒体暴露濃度に依存した体重の増加抑制が認められているが、その影響は吸入暴露要素が大きいと考えられた。また、動物の死亡状況では複数媒体投与の影響はこの時点ではみられていない。

## （２）複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究

クロロホルムによる複数媒体影響の発生メカニズムを解明するために、本年度は、胆汁中のクロロホルム代謝物についての検討を行い、分析法を確立し、実際にクロロホルムを吸入暴露したラット胆汁中の代謝物の定量を実施した。

まず、吸入暴露を実施しながら胆汁を採取する術式を開発し、この方法により吸入暴露中のラットから確実に胆汁を採取できることを確認した。

また、胆汁中のクロロホルム代謝物のLC-MSによる分析方法について、検量線の直線性と再現性、回収率、安定性に関して検討し、分析方法を確立した。さらに、代謝物の胆汁中での安定性を保つために、胆汁採取後直ちに蒸留水で50倍に希釈する前処理が必要であることを明らかにした。

この確立したLC-MSによる分析方法により、ラットを用いてクロロホルム暴露中及び暴露終了後の胆汁を経時的に採取し、その代謝物を定量した。クロロホルム代謝物の濃度は、暴露開始から暴露終了時の360分まで緩やかに上昇した。暴露終了後は急速に濃度が減衰し、暴露終了後180分ではほとんど消失した。胆汁中のグルタチオンも代謝物と同様に測定したが、グルタチオンは、クロロホルム代謝物の濃度上昇より遅れて濃度が上昇し、クロロホルムの暴露終了後も、クロロホルム代謝物に比べて緩やかに減衰した。

以上のことから、クロロホルムからホスゲンの代謝反応は非常に速いが、ホスゲンからグルタチオン抱合体への反応は緩やかであることが予測された。

## II 調査方法と結果

### 1. 複数媒体暴露による長期試験

#### 【材料および方法】

#### (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) 実験動物および飼育管理

① 実験動物 : F344/DuCrIcrlj (旧 F344/DuCrj) 雄性 SPF ラット

② 飼育環境

環境	検疫期間	馴化・暴露期間	
	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 °C	22 ± 2 °C	23 ± 2 °C
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	

③ 飼料 : CRF-1 固型飼料 (30KGy  $\gamma$  線照射滅菌飼料)

④ 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、動物番号および動物数等

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

(4) 暴露方法 (資料 1 の FIGURE 1 参照)

被験物質の暴露方法は、吸入チャンバー内の動物に 1 日 6 時間の全身暴露による吸入 (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、複数媒体暴露 (吸入および経口投与) とした。

それぞれの投与方法は以下のとおりとした。

① 吸入

イ) 経路

全身暴露による経気道投与

ロ) 期間

群構成日の翌日から 54 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

200 ppm および 400 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。

## ② 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 54 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

800 ppm および 1600 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。

## ニ) 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/cm<sup>2</sup>）し、一定の圧力（許容範囲：0.4～0.6 kg/cm<sup>2</sup>）を加えた後、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・検査項目および方法

### ① 動物の一般状態の観察

検疫および馴化期間には、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）および群構成時（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（各週の 7 日）に詳細な一般状態の観察および基準日以外の日は毎日 1 回、生死確認を行った。

## ② 体重測定

検疫および馴化期間には、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）および群構成時（馴化最終日：0 週-0 日）に測定した。

投与期間は、全動物について、14 週までは毎週、それ以降は 18、22、26、30、34、38、42、46、50、52 および 54 週の基準日（各週の 7 日）に体重の測定を行った。また、死亡動物の搬出時にも行った。

## ③ 摂餌量の測定

投与期間には、全動物（個体別）について、14 週までは毎週、それ以降は 18、22、26、30、34、38、42、46、50、52 および 54 週の基準日（各週の 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（摂餌量測定週の 7 日）の差を 7 日間で除して算出した。

## ④ 摂水量の測定

投与期間には、加圧ボンベ毎に、毎週、14 週までは毎週、それ以降は 18、22、26、30、34、38、42、46、50、52 および 54 週の基準日（各週の 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、給水時の加圧ボンベ全体重量（残水量測定週の前週の 7 日）と残水量測定時の加圧ボンベ全体重量（摂水量測定週の 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。

## ⑤ 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（800 ppm、1600 ppm）およ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。

## 【結果】

### (1) 動物の生死状況（資料 1 の FIGURE 2 および TABLE 1 参照）

動物の死亡が、3 週-6 日に吸入 200 ppm + 経口 1600 ppm 群（5 群）で 1 例（動物番号：1504）、47 週-7 日に吸入 400 ppm + 経口 0 ppm 群（6 群）で 1 例（動物番号：1610）および 52 週-3 日に吸入 200 ppm + 経口 800 ppm 群（4 群）で 1 例（動物番号：1436）認められた。

54 週時点での各群の生存率は、吸入 0 ppm + 経口 0 ppm 群（0 群；対照群）：100 %、吸入 0 ppm + 経口 800 ppm 群（1 群）：100 %、吸入 0 ppm + 経口 1600 ppm 群（2 群）：100 %、吸入 200 ppm + 経口 0 ppm 群（3 群）：100%、吸入 200 ppm + 経口 800 ppm 群（4 群）：98 %、吸入 200 ppm + 経口 1600 ppm 群（5 群）：98 %、吸入 400 ppm + 経口 0 ppm 群（6 群）：98%、吸入 400 ppm + 経口 800 ppm 群（7 群）：100%および吸入 400 ppm + 経口 1600 ppm 群（8 群）：100%であった。

### (2) 一般状態の観察所見

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。

投与開始後 1 週（はじめての一般状態の詳細観察）では、立毛が吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群（6 群）で 17/50 匹、吸入 400 ppm+経口 800 ppm 群（7 群）で 16/50 匹および吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群（8 群）で 20/50 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、DMF の複数媒体暴露の影響と思われる所見はみられなかった。

なお、死亡動物では、動物番号：1504（3 週-6 日に死亡発見）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。動物番号：1610（47 週-7 日に死亡発見）は左耳介部に腫瘍が 40 週以降死亡時までみられ、死亡時の腫瘍は、大きさが 10-20mm でやや硬く、出血痕が認められた。動物番号：1436（52 週-3 日に死亡発見）は 51 週-7 日に呼吸緩除と立毛が認められ、その 3 日後に死に至った。

(3) 体重 (資料 1 の FIGURE 3 および TABLE 2 参照)

群構成時の体重は各群ともに  $124 \pm 7$  g であり、良く揃っていた。

1 週 (投与開始後初めての測定) では、各群の体重は、対照群である吸入 0 ppm+経口 0 ppm 群 (0 群) に対する百分率で見ると、吸入 0 ppm+経口 800 ppm 群 (1 群) : 100%、吸入 0 ppm+経口 1600 ppm 群 (2 群) : 95%、吸入 200 ppm+経口 0 ppm 群 (3 群) : 97%、吸入 200 ppm+経口 800 ppm 群 (4 群) : 94%、吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 群 (5 群) : 89%、吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群 (6 群) : 90%、吸入 400 ppm+経口 800 ppm 群 (7 群) : 89% および吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群 (8 群) : 88% であり、主として吸入濃度に依存した増加抑制がみられた。この体重増加の抑制は、複数媒体暴露を重ねる毎に顕著となり、54 週では、0 群 : 100 % に対して、1 群 : 101%、2 群 : 97 %、3 群 : 97 %、4 群 : 91 %、5 群 : 87 %、6 群 : 81 %、7 群 : 75 % および 8 群 : 71 % であった。

(4) 摂餌量 (資料 1 の FIGURE 4 および TABLE 3 参照)

1 週目 (暴露開始後初めての測定) では、各群の摂餌量は、0 群 (対照群) に対する百分率で見ると、1 群 : 99 %、2 群 : 93 %、3 群 : 94 %、4 群 : 89 %、5 群 : 83 %、6 群 : 83 %、7 群 : 80 % および 8 群 : 80 % であり、主として吸入濃度に依存した摂餌量の低下が見られ、それ以降 54 週目まで摂餌量は同様に推移し、54 週目の各群の摂餌量は、0 群 : 100 % に対して、1 群 : 102 %、2 群 : 101 %、3 群 : 98 %、4 群 : 95 %、5 群 : 91 %、6 群 : 95 %、7 群 : 93 % および 8 群 : 87 % であった。

(5) 摂水量 (資料 1 の FIGURE 5 および TABLE 4 参照)

1 週目 (暴露開始後はじめての測定) では、各群の摂水量は 0 群 : 100 % に対して、1 群 : 88 %、2 群 : 77 %、3 群 : 83 %、4 群 : 79 %、5 群 : 72 %、6 群 : 79 %、7 群 : 77 % および 8 群 : 74 % であり、複数媒体暴露濃度に依存した摂水量の低下が見られた。26 週では、0 群 : 100 % に対して、1 群 : 85 %、2 群 : 81 %、3 群 : 104 %、4 群 : 88 %、5 群 : 80 %、6 群 : 100 %、7 群 : 90 % および 8 群 : 84 % になり、経口濃度に依存した低下傾向がみられた。し

かし、54週 of 各群の摂水量は、0群：100 %に対して、1群：103 %、2群：98 %、3群：107 %、4群：98 %、5群：93 %、6群：104 %、7群：99 % および 8群：98 %になり、群間の差は殆ど認められなくなった。

(6) 吸入チャンバー内DMF濃度（資料 1 の TABLE 5 参照）および環境制御

吸入チャンバー内の目標DMF濃度を、3群、4群、5群（チャンバー番号：CH-3、CH-4、CH-5）は 200 ppm および 6群、7群、8群（チャンバー番号：CH-6、CH-7、CH-8）は 400 ppm として調整し、動物に暴露した。これまでの濃度監視結果より、各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。

吸入チャンバー内環境は、温度：23 ± 2 °C、湿度：55 ± 15 % および換気回数 12 ± 1 回/時（換気量：860 L/分）に制御した。

(7) 経口投与したDMFの摂取量（資料 1 の TABLE 6 参照）

飲水のDMF設定濃度を、1群、4群、7群は 800 ppm および 2群、5群、8群は 1600 ppm に調製し、投与した。

測定した飲水量と体重値をもとに、経口投与したDMFの体重 1kg 当たりの摂取量を算出した。

(8) 死亡動物の剖検所見

死亡発見直後に動物を解剖し、肉眼的観察を行った。

動物番号：1504 には、肝臓の小葉像明瞭および胸腺の赤色斑がみられた（推定死因は不明）。

動物番号：1610 には、肝臓の淡色化と赤色斑および耳の結節（16 mm、出血あり）がみられた（推定死因は肝病変）。

動物番号：1436 には、左胸部から脇腹にかけての皮下腫瘍（80×40×15 mm）および胸水（多量、赤色）がみられた（推定死因は皮下腫瘍）。

## 【まとめ】

DMF を 0 ppm、200 ppm および 400 ppm の濃度に調整した空気の吸入（全身暴露）と DMF を 0 ppm、800 ppm および 1600 ppm 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実施し、54 週が経過した。

動物の死亡が、3 週-6 日に吸入 200 ppm + 経口 1600 ppm 群（5 群）で 1 例（動物番号 1504）、47 週-7 日に吸入 400 ppm + 経口 0 ppm 群（6 群）で 1 例（動物番号 1610） および 52 週-3 日に吸入 200 ppm + 経口 800 ppm 群（4 群）で 1 例（動物番号 1436）認められた。

一般状態の観察では、複数媒体暴露初期（1 から 2 週）に、立毛が吸入 400 ppm+ 経口 0 ppm 群（6 群）で 17/50 匹、吸入 400 ppm + 経口 800 ppm 群（7 群）で 16/50 匹および吸入 400 ppm + 経口 1600 ppm 群（8 群）で 20/50 匹に認められた。しかし、3 週目以降は、DMF の投与による影響と思われる特記所見は認められていない。

体重の推移では、複数媒体暴露濃度に依存（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。

死亡動物の剖検の結果、推定死因は、動物番号：1504 は不明、動物番号：1610 は肝病変、動物番号：1436 は皮下腫瘍であった。

これらの途中経過より、複数媒体暴露濃度に依存した体重の増加抑制が認められているが、その影響は吸入暴露要素が大きいと考えられた。また、動物の死亡状況では複数媒体投与の影響はこの時点ではみられていない。

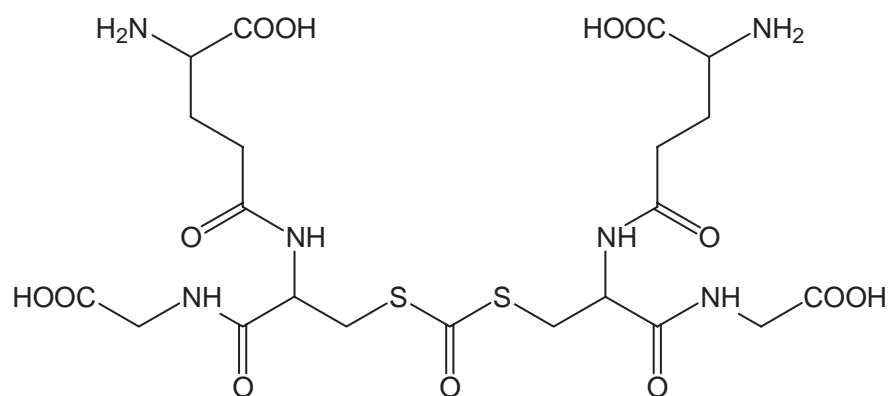
## 2. 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究

### 【方法】

#### (1) 試薬

クロロホルムの代謝物であるジグルタチオニルジチオカルボナートは、Pohl らの方法により合成した（文献 1）。また、吸入暴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。

#### (2) ジグルタチオニルジチオカルボナートの構造式と分子量



分子量：640

#### (3) 吸入暴露における胆汁採取方法の検討

クロロホルム暴露における胆汁採取方法に関しては、吸入暴露を実施しながら動物から胆汁を採取するために、従来の胆汁採取方法を改良し新しい方法を開発、検討した。

#### (4) 胆汁中のクロロホルム代謝物の分析方法の検討

##### ① 胆汁中のクロロホルム代謝物の定性

合成したクロロホルム代謝物の標準品のクロマトグラムとクロロホルムを暴露したラットから採取した胆汁のクロマトグラム及びそのマススペクトルを測定した。さらに、クロロホルムの<sup>13</sup>C体を強制経口投与したラットの胆汁を採取し、マススペクトルを測定した。

② 検量線の直線性と再現性、回収率、安定性の検討

(イ) 検量線の直線性及びその再現性

クロロホルム代謝物の標準品の検量線を 1 µg/mL から 25 µg/mL の濃度範囲において測定し、検量線の直線性を検討した。また、検量線の濃度中の、1 µg/mL、5 µg/mL、25 µg/mL についてはそれぞれ 5 回分析し、その値から変動係数を算出し、再現性を検討した。

(ロ) 回収率

クロロホルム代謝物を無処置のラットから採取したコントロールの胆汁に添加して、蒸留水に添加した溶液と比較し、添加回収率について検討した。

(ハ) 安定性

無処置のラットから採取したコントロールの胆汁または蒸留水に、クロロホルム代謝物を添加して、室温 (25°C) と 37°C における 120 分までのクロロホルム代謝物の安定性について検討した。さらに胆汁の前処理について検討するために、50 倍希釈した調製直後の溶液の室温における安定性を測定した。

(5) クロロホルムの吸入暴露における胆汁中の代謝物の定量

① 吸入暴露

被験物質の暴露はラットに吸入暴露装置 ((株)柴田科学製) により吸入暴露することによって行った。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、空気と混合してラットを収容した吸入暴露チャンバーに送気した。

暴露時間は 6 時間、暴露濃度は 100ppm とした。暴露開始より 15 分間隔で吸入チャンバー内の空気を採気し、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社 HP6890) 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°C、



注入口温度は 200°C、検出器温度は 200°C、試料注入量は 1mL とした。

② 使用動物及び数

F344/DuCr1Cr1j (旧 F344/DuCrj) の 12 週齢 SPF ラット雄 (日本チャールス・リバー厚木飼育センター) を使用した。使用した動物数は 5 匹であった。

③ クロロホルム代謝物の胆汁中濃度測定

(イ) 胆汁の採取

ラットの胆管に結果 (1) に示した手法によりカニューレを挿入し、カニューレから流出する胆汁をサンプルビンに採取した。

(ロ) 採取時間

吸入暴露開始から 60、120、180、240、300、360 分、吸入暴露終了後、60、120、180 分に採取した。

(ハ) 採取した胆汁の前処理

動物から採取した胆汁は、直ちに蒸留水で 50 倍に希釈し、LC-MS による分析を実施した。

(ニ) LC-MS の分析条件

LC-MS (サーモエレクトロン社 TSQ-7000) を用いてクロロホルムの代謝物の胆汁中濃度を測定した。

LC-MS の分析条件として、カラムは資生堂カプセルパック Q (4.6 mmφ × 3.5 cm)、カラム温度は 40 °C、流量は 1 mL/min、イオン化法はエレクトロスプレー法、イオン化極性は陰極、印加電圧は 7 kV、ヒーテッドキャピラリー温度は 250 °C、シースガスは窒素 (70 psi) とした。移動相はメタノール : 蒸留水 : ギ酸 = 5 : 95 : 3.5 とした。

## 【結果】

### (1) 吸入暴露下における胆汁採取方法の検討

以下に、吸入暴露を実施しながらラットから胆汁を採取するために新しく開発した胆汁採取の手法を記述した。

FIGURE 1 に、使用した機材を示す。麻酔器（イソフルラン吸入麻酔装置）、動物固定台（鼻部吸入麻酔用）、麻酔箱を用いた。ラットは麻酔箱の中に約 3 ～ 5 分入れ、十分に麻酔させた。麻酔したラットを固定台に復位に保定し、正中線のやや右側に沿って皮膚を剣状突起下約 1.5 cm 切開した。皮膚の切開部から、リングピンセットを肝臓直下に挿入し、十二指腸をつまみ出した。その十二指腸を軽くつまみ、胆管及び胆管の左側を併走する血管を確認した。FIGURE 2 に、ラットから胆汁を採取するために改良した留置針を示した。留置針は留置針外筒、接続カニューレの留置針内筒挿入部、カニューレからの胆汁漏出防止カバー、腹腔からのカニューレ抜け防止用ストッパーで構成されている。胆管と十二指腸の間に留置針固定用縫合糸を通した後、改良型留置針を、留置針固定用縫合糸の約 5 mm 下方から胆管に挿入した。留置針の内筒部に胆汁の流入を確認できたら、内筒を引抜き、外筒を胆管の上から縫合糸で結紮し固定させた。また、カニューレの内筒挿入部から胆汁の漏出防止のため、胆汁漏出防止カバーで内筒挿入部を覆い、カバーの両端を縫合糸で結紮した。術式の最後に、縫合糸で腹膜・腹筋を縫合し、さらにオートクリップで表皮の縫合を行った。これらの術式が終了したラットは、麻酔中に吸入暴露用のホルダーに保定し、暴露チャンバーに収容した。覚醒した後、クロロホルムの吸入暴露を実施した。この実験で用いたラットの胆汁の排泄量を計測した結果、胆汁採取を行った 5 匹の動物とも 1 分間に約 1 mL であった。

### (2) 胆汁中のクロロホルム代謝物の分析方法の検討

#### ① 胆汁中のクロロホルム代謝物の定性

FIGURE 3 に合成したクロロホルム代謝物の標準品のクロマトグラムとクロロホルムを暴露して採取した胆汁のクロマトグラムを示した。保持時間は約 2.1 分であった。また、クロロホルムを暴露したラットから採取した胆汁に認められたピークのマススペクトルを FIGURE 4 に示した。その結果、639 m/z にピークが認められた。また、クロロホルムの <sup>13</sup>C 体を強制経口投与し、その

胆汁を採取して認められたピークのマススペクトルを **FIGURE 5** に示した。その結果、**640 m/z** にピークが認められた。

## ② 検量線の直線性、再現性、回収率、安定性の検討

### (イ) 検量線の直線性及び再現性

**FIGURE 6** にクロロホルム代謝物の標準品の検量線を示した。1  $\mu\text{g/mL}$  から 25  $\mu\text{g/mL}$  の範囲における濃度とピーク面積の相関係数は **0.998** であった。また、その検量線の濃度の中で、3 種類の濃度つまり、1  $\mu\text{g/mL}$ 、5  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$  をそれぞれ 5 回分析した結果、1  $\mu\text{g/mL}$  の変動係数は **1.67 %**、5  $\mu\text{g/mL}$  では **1.91 %**、25  $\mu\text{g/mL}$  では **1.66 %** であった。

### (ロ) 回収率

クロロホルム代謝物を無処置のラットから採取したコントロールの胆汁に添加して、蒸留水で希釈した溶液と比較し、添加回収率について検討した結果を **TABLE 1** に示した。その結果、500  $\mu\text{g/mL}$  の設定濃度に対して、平均 **96%** の回収率であった。また、5 回の測定におけるクロロホルム代謝物の測定濃度の変動係数は、**2.96%** であった。

### (ハ) 安定性

無処置の動物から採取したコントロールの胆汁または蒸留水に、クロロホルム代謝物を強制添加して、室温 (25°C) と 37°C における 120 分までのクロロホルム代謝物の安定性について測定した結果を **FIGURE 7** に示した。その結果、室温では、60 分経過すると初期濃度の半分まで濃度が低下した。また、37°C では、わずか 10 分で初期濃度の半分まで濃度が低下した。

**FIGURE 8** に、50 倍希釈した調製直後の溶液の室温における安定性について測定した結果を示した。その結果、胆汁にクロロホルム代謝物を添加し希釈したクロロホルム代謝物の溶液は、60 分経過しても初期濃度をほぼ維持していた。ただし、120 分経過すると、胆汁に添加した溶液は初期濃度の約 **80%** 以下まで減衰した。

(3) クロロホルムの吸入暴露下における胆汁中の代謝物の定量

① 動物の生死状況

全動物とも、暴露の影響による死亡はみられなかった。

② 動物の体重

暴露時における動物の体重の平均値と標準偏差を TABLE 2 に示した。

③ 暴露チャンバー内のクロロホルムの濃度

暴露チャンバー内のクロロホルム濃度は  $98.9 \pm 0.66$  ppm であり、被験物質濃度は設定濃度 (100ppm) に近い値であった。

④ クロロホルム代謝物の胆汁中濃度

クロロホルムを暴露して採取した胆汁中のクロロホルム代謝物の濃度測定結果を FIGURE 9 に示した。クロロホルム代謝物の濃度は、暴露開始 60 分目から緩やかに上昇し、暴露中 360 分で最高濃度に達した。暴露を終了すると急速に減衰し、暴露終了後 60 分では暴露終了直前の約 20% であり、暴露終了後 180 分ではほとんど消失した。胆汁中のグルタチオンも代謝物と同様に測定したが、グルタチオンは、クロロホルム代謝物の濃度上昇より遅れて濃度が上昇し、クロロホルムの暴露終了後は、クロロホルム代謝物に比べて緩やかに減衰した。

## 【考察】

複数媒体メカニズム研究に関するこれまでの経緯として、クロロホルムの複数媒体効果における組織中濃度への影響及び、クロロホルムの体内蓄積性について検討を行ってきた。これまでの研究から、クロロホルムはラットに対して、吸入暴露と経口暴露の同時投与である複数媒体投与によりラット雄に腎臓癌が発生することが認められた（文献2）。また、クロロホルムの吸入暴露に関して、マウスに腎臓癌（文献3）及びその毒性（文献4、5）が認められている。また、変異原性試験では、クロロホルムの気相暴露により、変異原性が認められている（文献6）。

クロロホルムの代謝研究は、Pohlらによって実施されており、胆汁中でグルタチオン代謝物であるジグルタチオニルジチオカルボナートに代謝されることが確認されている（文献1）。この研究では、クロロホルムを動物に投与し、その胆汁中での最終代謝物であるグルタチオンの抱合体の構造決定を行った。その結果、クロロホルムは動物の体内でホスゲンを経由して代謝されていることを証明し、クロロホルムの毒性発現にホスゲンが関与していることを示唆している。

平成17年度は、複数媒体影響という事象について、より普遍的な機序を解明するため、クロロホルムを用いた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。特に、クロロホルムによる複数媒体影響の発生メカニズムを解明するために、クロロホルム代謝物について検討を行い、分析法を確立し、実際に吸入暴露後の代謝物の定量を実施した。

### (1) 吸入暴露における胆汁採取方法の検討

吸入暴露における胆汁採取方法の検討により、以下のことが確立された。

- ア) 動物を吸入暴露用ホルダーに固定し、吸入暴露をしながら胆汁を採取できる。
- イ) 胆汁の流量に動物間の差が少ないため、再現性の良い実験環境が設定できる。
- ウ) 手術に要する時間が短いため、動物に負担をかけることなく胆汁を採取することができる。

以上のことから、今回開発した胆汁採取方法により、クロロホルムを吸入暴露しながら胆汁を採取することが可能となった。

## (2) 胆汁中のクロロホルム代謝物の分析方法の検討

クロロホルム代謝物の標準品及びクロロホルムを暴露して採取した胆汁のマススペクトルに  $639\text{ m/z}$  のピークが認められた。クロロホルム代謝物の分子量が  $640$  であることから、このピークはプロトンが脱離したクロロホルム代謝物の偽分子イオンのピークであると考えられた。この結果は、グルタチオン代謝物の末端代謝物であるアセチルシステイン代謝物は、LC-MS のエレクトロスプレーのネガティブモードで偽分子イオンとしてイオン化されるという最近のわれわれの研究の結果（文献7）と類似した。また、 $^{13}\text{C}$  体のクロロホルムを投与した胆汁中のマススペクトルで認められた  $640\text{ m/z}$  のピークは、投与したクロロホルムの  $^{13}\text{C}$  の炭素がグルタチオン代謝物として認められたことを示しており、クロロホルムがホスゲンを經由して、クロロホルム代謝物として胆汁中に排泄されたことが証明された。

クロロホルム代謝物の LC-MS 分析における検量線の直線性は、相関係数  $0.998$  であり、LC-MS 分析において要求される直線性の  $0.990$  以上を満足する値であり、クロロホルム代謝物を測定する上で問題のない直線性であった。また、その再現性に関しては、検量線で用いた各濃度における変動係数が  $1.66\%$ ～ $1.91\%$  の範囲であり、 $10\%$  以内の変動係数であることからクロロホルム代謝物を測定する上で問題のない再現性であった。

回収率に関して検討した結果、 $96\%$  の回収率であり、 $90\%$  以上の回収率が得られたことからクロロホルム代謝物を測定する上で問題のない回収率と考えた。

胆汁中のクロロホルム代謝物の安定性に関して、室温では  $60$  分経過すると初期濃度の半分まで濃度が低下し、また、 $37\text{ }^\circ\text{C}$  では  $10$  分で初期濃度の半分まで濃度が低下することから、動物からの胆汁採取は必要最小限とし、検体の採取後、速やかに分析する必要があることがわかった。また、胆汁を  $50$  倍希釈した溶液におけるクロロホルム代謝物の室温における安定性は、 $60$  分経過しても初期濃度をほぼ維持していたことから、クロロホルム代謝物は上記のように胆汁中では不安定であるが、蒸留水で  $50$  倍以上に希釈することにより安定となることがわかった。従って、胆汁中のクロロホルム代謝物を正確に測定するためには、速やかに検体を希釈することが必要であると考えた。

### (3) クロロホルムを吸入暴露したラットにおける胆汁中の代謝物の定量

これまでの一連の研究結果から、クロロホルムを暴露した動物における胆汁中のクロロホルムの代謝物の挙動がはじめて明確になった。クロロホルムはホスゲンに代謝され、さらにグルタチオン抱合体になることが Pohl らの研究により、証明されている（文献 1）。その研究では、クロロホルム代謝物であるグルタチオン抱合体を高速液体クロマトグラフで定量しているが、紫外吸収の感度が悪く、フェノバルビタールで酵素を誘導することによりクロロホルム代謝物の定量が可能となっている。これに対し、本研究で確立した方法であれば、フェノバルビタールでクロロホルム代謝物を誘導することなく低い濃度のクロロホルム代謝物を正確に測定することが可能である。

クロロホルム代謝物は、クロロホルムの暴露開始から終了時（360分）まで緩やかに上昇した。しかし、クロロホルムは動物の体内において短時間でホスゲンに代謝されることが予測される。今回の実験と同じ濃度のクロロホルムをラットに暴露しその血液中のクロロホルムの濃度を測定した実験では、血液中クロロホルム未変化体の濃度は短時間（約30分）のうちに上昇することが明確となっている。クロロホルム未変化体はホスゲンに代謝される時間が非常に短時間であることを仮定すると、ホスゲンはクロロホルムを暴露した直後の早い時間から体内で生成していることが考えられる。従って、ホスゲンがグルタチオン抱合を受けグルタチオン代謝物となるにはクロロホルムがホスゲンに代謝されるよりも長い時間が必要であることが予測される。このことは次の2つの証拠から裏付けられる。1つ目の証拠は、胆汁中に排泄されるグルタチオンの濃度は、クロロホルム代謝物よりもさらに遅れて緩やかに上昇していることである。この結果、ホスゲンが肝臓内のグルタチオンにより抱合されるに際して、暴露初期では、ホスゲンを抱合するグルタチオン反応が充分でないため、グルタチオンの濃度が緩やかに上昇したことを示している。もう1つの証拠は、クロロホルムの暴露を終了すると、グルタチオン抱合体の濃度が急速に減少したことである。この結果は、クロロホルムの代謝物の元であるクロロホルム及びその代謝物のホスゲンが急速に消失したことを示している。以上のことから、クロロホルムからホスゲンの代謝反応は非常に速いことが予測されるが、ホスゲンからグルタチオン抱合体への反応は緩やかであると考えられた。

【文献】

- (1) Lance R. Pohl, Richard V. Branchflower, Robert J. Highet, Jackie L. Martin, David S. Nunn, Terrence J. Monks, John W. George and Jack A. Hinson: The formation of diglutathionyl dithiocarbonate as a metabolite of chloroform, bromotrichloromethane, and carbon tetrachloride. *Drug Metabolism and Disposition* (1981) 9, 334-339
- (2) Kasuke Nagano, Hirokazu Kano, Heihachiro Arito, Seigo Yamamoto and Taijiro Matsushima: Enhancement of renal carcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to chloroform in male rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* (2006) in Press
- (3) Seigo Yamamoto, Tatsuya Kasai, Michiharu Matsumoto, Tomoshi Nishizawa, Heihachiro Arito, Kasuke Nagano and Taijiro Matsushima: Carcinogenicity and chronic toxicity in rats and mice exposed to chloroform by inhalation. *Journal of Occupational Health* (2002) 44, 283-293
- (4) Seigo Yamamoto, Tomoshi Nishizawa, Kasuke Nagano, Shigetoshi Aiso, Tatsuya Kasai, Tetsuya Takeuchi and Taijiro Matsushima: Development of resistance to chloroform toxicity in male BDF1 mice exposed to a stepwise increase in chloroform concentration. *The Journal of Toxicological Sciences* (1999) 24, 421-424
- (5) Tatsuya Kasai, Tomoshi Nishizawa, Heihachiro Arito, Kasuke Nagano, Seigo Yamamoto, Taijiro Matsushima and Toshihiro Kawamoto: Acute and subchronic inhalation toxicity of chloroform in rats and mice. *Journal of Occupational Health* (2002) 44, 193-202
- (6) Akihiro Araki, Nobuyuki Kamigaito, Toshiaki Sasaki, and Taijiro Matsushima: Mutagenicity of carbon tetrachloride and chloroform in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, and TA1537, and *Escherichia*



coli WP2uvrA/pKM101 and WP2/pKM101, using a gas exposure method. :  
Environmental and Molecular Mutagenesis (2004) 43, 128-133

- (7) Makoto Ohnishi, Kazunori Yamazaki, Seigo Yamamoto and Taijiro Matsushima: Characterization of *N*-acetylcysteine conjugate in yellow urine by oral administration of 1,4-dichloro-2-nitrobenzene in rats. Journal of Health Science (2004) 50, 319-322

### III. 総括

#### (1) 複数媒体暴露による長期試験

DMF を 0 ppm、200 ppm および 400 ppm の濃度に調整した空気の吸入（全身暴露）と DMF を 0 ppm、800 ppm および 1600 ppm 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、すなわち複数媒体暴露による長期試験を実施し、54 週が経過した。

動物の死亡が、吸入 200 ppm + 経口 800 ppm 群（4 群）、吸入 200 ppm + 経口 1600 ppm 群（5 群）および吸入 400 ppm + 経口 0 ppm 群（6 群）で各一例認められた。一般状態の観察では、複数媒体暴露初期（1 から 2 週）に立毛が、吸入 400 ppm + 経口 0 ppm 群（6 群）で 17/50 匹、吸入 400 ppm + 経口 800 ppm 群（7 群）で 16/50 匹および吸入 400 ppm + 経口 1600 ppm 群（8 群）で 20/50 匹に認められた。しかし、3 週目以降は、DMF 複数媒体暴露の影響と思われる明らかな所見は認められていない。体重の推移では、複数媒体暴露濃度に依存（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。

これらの途中経過より、複数媒体暴露濃度に依存した体重の増加抑制が認められているが、その影響は吸入暴露要素が大きいと考えられた。また、動物の死亡状況では複数媒体投与の影響はこの時点ではみられていない。

#### (2) 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究

クロロホルムによる複数媒体影響の発生メカニズムを解明するために、本年度は、胆汁中のクロロホルム代謝物についての検討を行い、分析法を確立し、実際にクロロホルムを吸入暴露したラット胆汁中の代謝物の定量を実施した。

まず、吸入暴露を実施しながら胆汁を採取する術式を開発し、この方法により吸入暴露中のラットから確実に胆汁を採取できることを確認した。

また、胆汁中のクロロホルム代謝物の LC-MS による分析方法について、検量線の直線性と再現性、回収率、安定性に関して検討し、分析方法を確立した。さらに、代謝物の胆汁中での安定性を保つために、胆汁採取後直ちに蒸留水で 50 倍に希釈する前処理が必要であることを明らかにした。

この確立した LC-MS による分析方法により、ラットを用いてクロロホルム暴露中及び暴露終了後の胆汁を経時的に採取し、その代謝物を定量した。クロロ

ホルム代謝物の濃度は、暴露開始から暴露終了時の 360 分まで緩やかに上昇した。暴露終了後は急速に濃度が減衰し、暴露終了後 180 分ではほとんど消失した。胆汁中のグルタチオンも代謝物と同様に測定したが、グルタチオンは、クロロホルム代謝物の濃度上昇より遅れて濃度が上昇し、クロロホルムの暴露終了後も、クロロホルム代謝物に比べて緩やかに減衰した。

以上のことから、クロロホルムからホスゲンの代謝反応は非常に速いが、ホスゲンからグルタチオン抱合体への反応は緩やかであることが予測された。