

平成19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20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	2
3. 調査結果	3
II 調査方法と結果	5
1. 複数媒体ばく露による長期試験	5
2. 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究	28
III 総括	33
1. 複数媒体ばく露による長期試験	33
2. 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究	34

資料 1 複数媒体ばく露による長期試験

FIGURE 1～6

TABLE 1～16, A

資料 2 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究

FIGURE 1～10

I 調査概要

1. 調査目的

PRTR制度の導入や環境実態調査により、化学物質が事業所等から大気や水、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化学物質については、人が単一の媒体だけでなく、複数の媒体（吸入、経口及び経皮）からばく露を受ける可能性があることから、より大きな影響を与えることが懸念されている（複数の媒体からのばく露により、単一の媒体からのばく露のみの場合と比べて、より大きな影響を受けることを、“複数媒体影響”と称する）。

平成14年度までの本調査によると、クロロホルムにおいては複数媒体（吸入及び経口）ばく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。したがって、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ため、平成16年度から平成18年度に複数の媒体からのばく露と、単一の媒体からのばく露との相違点を明確にし、複数媒体影響が発生する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ている。

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、複数の媒体からのばく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）について複数媒体ばく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年度複数媒体影響・複合リスク基礎調査合同検討会における承認を得た後、平成16年度末から複数媒体（吸入及び経口）ばく露による長期間動物試験を開始した。

この動物試験では、DMF複数媒体影響をがん原性をエンドポイントとして検索することより、動物の寿命に近い2年間の複数媒体ばく露をする必要がある。また、腫瘍の発生状況を統計学的に解析する際、各群の使用動物数は50匹を必要とし、90日反復投与試験での10匹/群の5倍の規模の試験となることから、吸入チャンバー及びそれに付随する装置や空調施設も大規模なものを必要とする。従って、平成17年度及び平成18年度は、DMFの複数媒体ばく露を同施設で継続して実施し、ばく露期間中は、吸入ばく露装置の稼動・制御、動物の飼育管理、飼育環境の監視・制御、DMFの吸入ばく露と濃度監視及びDMFの飲水調製と濃度確認、動物の一般状態の観察と各種測定（体重、摂餌量、飲水量等）を実施した。平成19年度は、

2年間の複数媒体ばく露を終えた動物の尿検査、解剖、臨床検査、及び病理学的検査を実施し、長期動物試験から得られたデータを総合的に解析し、DMFの複数媒体影響を考察した。

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、平成19年度は、過去3年間のクロロホルムによる研究成果を総合的に解析し、クロロホルムの複数媒体影響の発生機序を考察した。

2. 調査内容

(1) 複数媒体ばく露による長期試験

DMFをラットに長期間（2年間）にわたり複数媒体（吸入及び経口）ばく露し、ばく露期間中は、吸入ばく露装置の稼動・制御、動物の飼育管理、飼育環境の監視・制御、DMFの吸入ばく露と濃度監視及びDMFの飲水調製と濃度確認、動物の一般状態の観察と各種測定（体重、摂餌量、飲水量、尿検査等）を実施した。また2年間の複数媒体ばく露を終えた動物については、解剖、臨床検査、及び病理学的検査を実施し、長期動物試験から得られたデータを総合的に解析し、DMFの複数媒体影響を考察した。

(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、平成16年度は、5日間ばく露と1日間ばく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、また平成17年度はクロロホルム代謝物についての分析法の確立及びクロロホルムの吸入投与における代謝物の定量を行った。さらに、平成18年度は、複数媒体（吸入及び経口）ばく露におけるクロロホルム代謝物の定量を実施した。

平成19年度は、これらの結果を総合的に解析し、クロロホルムの複数媒体影響の発生機序を考察した。

3. 調査結果

(1) 複数媒体ばく露による長期試験

各吸入チャンバーのDMF濃度は、全ばく露期間を通じて、設定濃度の200 ppm及び400 ppmとほぼ近似した値に制御され、飲水中のDMF濃度も全投与期間を通じて、設定濃度の800 ppm及び16000 ppmとほぼ近似した値に調

製された。また、動物の飼育期間中の環境は、設定の環境基準で制御され、動物は良好な飼育環境で飼育された。

動物の生死状況に顕著な群間差は認められなかった。一般状態の観察では、DMF 複数媒体ばく露の影響と思われる特徴的な所見は認められなかった。体重の推移では、DMF 投与群にばく露開始直後より複数媒体ばく露濃度に依存した体重増加の抑制が見られ、その傾向は最終計測の 104 週まで継続した。摂餌量は、吸入 200 + 経口 800 ppm 群、吸入 200 + 経口 1600 ppm 群、吸入 400 + 経口 0 ppm 群、吸入 400 + 経口 800 ppm 群及び吸入 400 + 経口 1600 ppm 群で、ほぼ全投与期間を通じて低値を示し、体重の増加抑制との関連が示唆された。また、飲水量は、吸入 200 + 経口 1600 ppm 群と吸入 400 + 経口 1600 ppm 群で、ほぼ全投与期間を通じて低値で推移し、体重の増加抑制との関連が示唆された。

実施した検査においては、DMF ばく露による肝臓毒性及び肝腫瘍の発現と関連性の高いと思われる項目に顕著な変化が認められた。すなわち、総ビリルビン、総コレステロール、AST、ALT 及び γ -GTP の増加、剖検における肝臓の結節及び白色斑発生率の増加、肝臓の実重量及び体重比の増加がみられた。また、非腫瘍性病変では前腫瘍性病変としての肝変異小増殖巣の発生増加、腫瘍性病変では DMF 投与群で肝細胞腺腫及び肝細胞癌の顕著な発生増加があった。

複数媒体ばく露群の肝臓腫瘍の発生は、吸入或いは経口の単独ばく露群と比較して有意に増加した。特に、複数媒体ばく露群の吸入 200+経口 800ppm 群 (DMF 推定総摂取量 : 165mg/kg/day) と吸入 200+経口 1600ppm 群 (DMF 推定総摂取量 : 205mg/kg/day) の発生率は、吸入 400+経口 0ppm の単独吸入ばく露群 (DMF 推定総摂取量 : 242 mg/kg/day) より DMF 推定総摂取量が少ないにもかかわらず肝臓腫瘍の発生率が高かった。さらに、DMF 複数媒体ばく露群の肝細胞癌の発生率は、複数経路ばく露群の吸入ばく露濃度と経口投与濃度に対応する単一吸入ばく露群と単一経口ばく露群の肝細胞癌の発生率の合計を大きく上回った。特に、複数経路ばく露群における悪性度の高い低分化型の肝細胞癌の発生は、吸入或いは経口単独ばく露群と比較して顕著に増加した。これらの結果から、DMF の複数媒体ばく露は、肝発がんに対して相加以上の相乗作用があると結論した。

(2) 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究

化学物質の複数媒体ばく露による健康障害に関する調査研究について環境省の委託により、クロロホルムについてラットを用いた動物実験による複数媒体

ばく露（吸入ばく露（大気）と経口ばく露（水質）を合わせたばく露）による影響調査を行った。すなわち、2年間にわたりラットにクロロホルムを含む空気を吸入させ、同時にクロロホルムを含む水を飲水として与えながら飼育し（複数媒体ばく露）、クロロホルムを含む空気を吸入させて飼育したラット、及びクロロホルムを含む水を飲水として与えて飼育したラット（単一媒体ばく露）と比較した。その結果、クロロホルムについては、単一媒体ばく露と比較して、複数媒体ばく露によりラットの腎臓に相乗的に腫瘍が発生した。この結果を受けて、動物実験による複数媒体ばく露による影響調査から得られた複数媒体影響の原因等を調べるため、クロロホルムの複数媒体ばく露による体内濃度への影響を動物実験により調査し、組織中の濃度の面から複数媒体影響のメカニズムに関する研究を行った。クロロホルムを複数媒体ばく露させたラットの臓器組織（腎臓、肝臓、脳、肺、脂肪）及び血液におけるクロロホルムの濃度を経時的に測定し、吸入のみ、及び経口のみのはく露の場合と比較した。その結果、複数媒体ばく露したラットの腎臓におけるクロロホルムの組織濃度は吸入ばく露と経口ばく露を単に加算した場合の組織濃度と比較して、約2倍上昇がみられたことから、クロロホルムの2年間にわたる複数媒体ばく露による腎臓腫瘍発生の顕著な増加との関連が示唆された。

これらの複数媒体投与による生体影響のメカニズムをさらに明らかにするために、平成16年度は、体内の蓄積性に関する面から複数媒体のメカニズムを検討するために、クロロホルムを5日間繰り返し複数媒体ばく露し、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、単回ばく露した測定結果と比較する調査研究を行った。また、平成17年度は胆汁中のクロロホルム代謝物について注目し、吸入ばく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LC-MSによる分析法を確立し、実際に吸入ばく露後の代謝物の定量を実施した。さらに平成18年度は、平成17年度に確立した分析法により、クロロホルムをラットに複数媒体ばく露し、胆汁中のクロロホルム代謝物の濃度を測定し、単回ばく露した測定結果と比較し、クロロホルムの胆汁中の代謝物への複数媒体影響について検討した。

以上、平成19年度は過去3年間のクロロホルムによる研究成果をまとめ、クロロホルムの複数媒体影響の発生メカニズムについて、総合的に考察した。

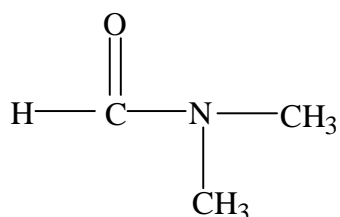
II 調査方法と結果

1. 複数媒体ばく露による長期試験

【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)
- ・構造式及び分子式 (分子量) :



$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ (分子量 : 73.09)

- ・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、SDL3394、LTK2732
- ・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

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

② 飼育環境

環境	検疫期間	馴化・ばく露期間	
	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 γ 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) (群名称) (動物番号) (動物数) 0 吸入0ppm+経口0ppm 1001-1050 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) (群名称) (動物番号) (動物数) 1 吸入0ppm+経口800ppm 1101-1150 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) (群名称) (動物番号) (動物数) 2 吸入0ppm+経口1600ppm 1201-1250 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) ばく露方法（資料1のFIGURE 1参照）

被験物質のばく露方法は、吸入チャンバー内の動物に1日6時間の全身ばく露による吸入（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た、複数媒体ばく露（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。

① 吸入

イ) 経路

全身ばく露による経気道投与

ロ) 期間

群構成日の翌日から104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 及び 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パブリングにより蒸発さ

せた。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 104 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 及び 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/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

① 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（各週の 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。

② 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、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102 及び 104 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、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102 及び 104 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、14 週までは毎週、それ以降は 18、22、26、30、34、38、42、46、50、52、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102 及び 104 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）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。

⑥ 尿検査

投与期間終期まで生存している採尿可能な動物について、新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティスティックス、バイエル社製）を用いて下記の項目について検査を行った。

【検査項目】 pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン

⑦ 血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血し、下記の項目について検査した。検査方法・単位・小数点以下桁数は、資料1の TABLE A に示した。

なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食させた。

【検査項目】 赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、網赤血球比、血小板数、白血球数、白血球分類

⑧ 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、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、遠心分離して得られた血漿を下記の項目について検査した。検査方法・単位・小数点以下桁数は、資料1の TABLE A に示した。

なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食させた。

【検査項目】 総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

⑨ 病理学的検査

(イ) 剖検

全動物について肉眼的観察を行った。

(ロ) 臓器重量

定期解剖動物について下記に示す各臓器の湿重量（実重量）を電子天秤（メトラー，PM400）を用いて測定した。また、各臓器重量体重比（臓器湿

重量の搬出時体重に対する百分率)を算出した。

副腎、精巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(ハ) 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、それらを切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行い、光学顕微鏡により検査した。

皮膚、鼻腔 (3 箇所を横断)、鼻咽頭、喉頭、気管、肺 (左肺に固定液を注入する)、骨髄 (大腿骨)、リンパ節 (腋窩、腹壁等)、胸腺、脾臓、心臓、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、精囊、前立腺、乳腺、脳、脊髄、末梢神経 (坐骨神経)、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨 (大腿骨)、肉眼的に変化のみられた器官、組織

なお、全動物の肝臓については、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、それらを切り出し、パラフィン包埋、薄切、GST-P 染色^(注) を行い、光学顕微鏡を用いて検査した。

(注) 肝中央葉の 1 切片を 2 層デキストランの重合体視覚化システム EnVision+(Dako、EV コペンハーゲン、デンマーク)を用い、抗 GST-P 抗体により免疫組織化学的に染色した。

(ニ) 一部の定期解剖動物の肝臓の一部を冷凍 (-80°C以下) 保存した。

(6) 数値の取り扱いと表示及び統計方法

① 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

チャンバー内の被験物質濃度については「ppm」を単位として、小数点以下第 3 位まで測定し、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、整数値の 1 の位まで測定し、表示した。

摂餌量については「g」を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定

期間の日数で除し、1匹の1日当たりの摂取量を算出し、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。

摂水量については「g」を単位とし、給水量及び残水量を整数値で測定し、給水量から残水量を減じて群の摂水量とした。この値を測定期間中の生存動物の延べ匹・日数で除し、各群の1日当たりの平均摂水量を算出し、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。

経口投与による被験物質の体重 kg 当りの1日摂取量は、摂水量に被験物質の設定濃度を乗じ体重で除した値を g / kg body weight / day を単位として、小数点以下第4位を四捨五入して小数点以下第3位まで表示した。

臓器実重量については「g」を単位とし、小数点以下第3位まで測定し、表示した。臓器重量体重比については臓器実重量値を搬出時体重で除し、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、血液生化学的検査は、資料1のTABLE Aに示した単位及び精度により表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は上記に示す桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

② 統計方法

本試験で得られた測定値は、原則として、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。

尿検査及び病理組織学的検査の非腫瘍性病変は、所見のみられなかった動物をグレード0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲等を基準として1~4にグレード分けし、 χ^2 検定を行った。

なお、予備検定は5%の有意水準で、最終検定は5%及び1%の有意水準で両側検定を行った。

【結果】

(1) 動物の生死状況（資料 1 の FIGURE 2 及び TABLE 1 参照）

試験期間をとおして、各群間で動物の生死状況に差はみられなかった。

投与期間最終週（104 週）における動物の生存状況は、吸入 0+経口 0ppm 群が 41/50 匹（82%）、吸入 0+経口 800ppm 群が 34/50 匹（68%）、吸入 0+経口 1600ppm 群が 40/50 匹（80%）、吸入 200+経口 0 ppm 群が 36/50 匹（72%）、吸入 200+経口 800 ppm 群が 36/50 匹（72%）、吸入 200+経口 1600 ppm 群が 41/50 匹（82%）、吸入 400+経口 0 ppm 群が 37/50 匹（74%）、吸入 400+経口 800 ppm 群が 43/50 匹（86%）及び吸入 400+経口 1600 ppm 群が 38/50 匹（76%）であった。

吸入或いは経口単独投与群と複数媒体ばく露群の間で死亡率に統計的有意差は認められなかった。

(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（投与開始後はじめての一般状態の詳細観察）では、立毛が吸入 400+経口 0 ppm 群で 17/50 匹、吸入 400+経口 800 ppm 群で 16/50 匹及び吸入 400+経口 1600 ppm 群で 20/50 匹に認められた。この所見は 2 週には吸入 400+経口 1600 ppm 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 の複数媒体ばく露の影響と思われる特徴的な所見はみられなかった。

(3) 体重（資料 1 の FIGURE 3、TABLE 2 参照）

群構成時の体重は各群ともに 124 ± 7 g であり、良く揃っていた。

投与開始後初めての測定 of 1 週から、各群の体重は対照群と比較して増加の抑制が認められた。すなわち、各群の体重の吸入 0+経口 0 ppm 群（対照群）に対する百分率は、吸入 0+経口 800ppm 群：100%、吸入 0+経口 1600 ppm 群：95%、吸入 200+経口 0 ppm 群：97%、吸入 200+経口 800 ppm 群：94%、吸入 200+経口 1600 ppm 群：89%、吸入 400+経口 0 ppm 群：90%、吸入 400+経口 800 ppm 群：89%及び吸入 400+経口 1600 ppm 群：88%であった。この体重増加の抑制は、複数媒体ばく露を重ねる毎に顕著となり、ばく露開始後ほ

ば1年(54週)では、吸入0+経口0ppm群(対照群)に対する百分率は、吸入0+経口800ppm群:101%、吸入0+経口1600ppm群:97%、吸入200+経口0ppm群:97%、吸入200+経口800ppm群:91%、吸入200+経口1600ppm群:87%、吸入400+経口0ppm群:81%、吸入400+経口800ppm群:75%及び吸入400+経口1600ppm群:71%であった。さらに、最終計測のばく露開始後2年(104週)には、吸入0+経口800ppm群:91%、吸入0+経口1600ppm群:85%、吸入200+経口0ppm群:92%、吸入200+経口800ppm群:87%、吸入200+経口1600ppm群:81%、吸入400+経口0ppm群:78%、吸入400+経口800ppm群:76%及び吸入400+経口1600ppm群:71%であった。

(4) 摂餌量(資料1のFIGURE 4及びTABLE 3参照)

投与開始後初めての測定(1週)では、各群の摂餌量は、吸入0+経口0ppm群(対照群)を100%としたとき、吸入0+経口800ppm群:99%、吸入0+経口1600ppm群:93%、吸入200+経口0ppm群:94%、吸入200+経口800ppm群:89%、吸入200+経口1600ppm群:83%、吸入400+経口0ppm群:83%、吸入400+経口800ppm群:80%及び吸入400+経口1600ppm群:80%であり、複数媒体ばく露濃度に対応した摂餌量の低値が認められた。それ以降、ばく露開始後ほぼ1年(54週)では、各群の摂餌量は、吸入0+経口0ppm群(対照群)の100%に対して、吸入0+経口800ppm群:102%、吸入0+経口1600ppm群:101%、吸入200+経口0ppm群:98%、吸入200+経口800ppm群:95%、吸入200+経口1600ppm群:91%、吸入400+経口0ppm群:95%、吸入400+経口800ppm群:93%及び吸入400+経口1600ppm群:87%、また、最終計測のばく露開始後2年(104週)では、吸入0+経口0ppm群(対照群)の100%に対して、吸入0+経口800ppm群:107%、吸入0+経口1600ppm群:100%、吸入200+経口0ppm群:121%、吸入200+経口800ppm群:103%、吸入200+経口1600ppm群:97%、吸入400+経口0ppm群:101%、吸入400+経口800ppm群:103%及び吸入400+経口1600ppm群:97%であった。

(5) 摂水量(資料1のFIGURE 5及びTABLE 4参照)

投与開始後初めての測定(1週)では、各群の摂水量は、吸入0+経口0ppm群

(対照群) を 100 % としたとき、吸入 0+経口 800ppm 群 : 88 %、吸入 0+経口 1600ppm 群 : 77 %、吸入 200+経口 0ppm 群 : 83 %、吸入 200+経口 800ppm 群 : 79 %、吸入 200+経口 1600ppm 群 : 72 %、吸入 400+経口 0ppm 群 : 79 %、吸入 400+経口 800ppm 群 : 77 % 及び吸入 400+経口 1600ppm 群 : 74 % であり、複数媒体ばく露濃度に依存した摂水量の低下が見られた。それ以降、ばく露開始後ほぼ一年 (54 週) では、各群の摂水量は、吸入 0+経口 0 ppm 群 (対照群) の 100 % に対して、吸入 0+経口 800ppm 群 : 103 %、吸入 0+経口 1600ppm 群 : 98 %、吸入 200+経口 0ppm 群 : 107 %、吸入 200+経口 800ppm 群 : 98 %、吸入 200+経口 1600ppm 群 : 93 %、吸入 400+経口 0ppm 群 : 104 %、吸入 400+経口 800ppm 群 : 99 % 及び吸入 400+経口 1600ppm 群 : 98 %、また、最終計測のばく露開始後 2 年 (104 週) では、吸入 0+経口 0 ppm 群 (対照群) の 100 % に対して、吸入 0+経口 800ppm 群 : 146%、吸入 0+経口 1600ppm 群 : 126 %、吸入 200+経口 0ppm 群 : 106 %、吸入 200+経口 800ppm 群 : 99 %、吸入 200+経口 1600ppm 群 : 88 %、吸入 400+経口 0ppm 群 : 99 %、吸入 400+経口 800ppm 群 : 97 % 及び吸入 400+経口 1600ppm 群 : 96 % であった。

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

吸入チャンバー内の目標 DMF 濃度を、3、4 及び 5 群 (チャンバー番号 : CH-3、CH-4、CH-5) は 200 ppm 及び 6、7 及び 8 群 (チャンバー番号 : CH-6、CH-7、CH-8) は 400 ppm として調整し、動物にばく露した。

各吸入チャンバーの DMF 濃度監視結果は、全ばく露日の平均値が CH-3 : 201.3 ± 2.0 ppm、CH-4 : 201.8 ± 2.9 ppm、CH-5 : 199.7 ± 1.7 ppm、CH-6 : 400.0 ± 3.3 ppm、CH-7 : 401.3 ± 2.8 ppm 及び CH-8 : 400.7 ± 2.9 ppm であり、ほぼ設定濃度に近似した値であった。

また、吸入チャンバー内環境は、全飼育期間を通じて、設定の温度 : 23 ± 2 °C、湿度 : 55 ± 15 % 及び換気回数 12 ± 1 回/時 (換気量 : 860 L/分) に制御され、動物は良好な環境で飼育された。

(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、4 及び 7 群は 800 ppm 及び 2、5 及び 8 群は 1600 ppm に調製し、投与した。

測定した摂水量と体重値をもとに、経口投与した DMF の 1 日、体重 1kg 当たりの摂取量を算出した。経口投与による DMF の摂取量は、吸入 0+経口 800ppm 群：0.030～0.086 g/kg/day、吸入 0+経口 1600ppm 群：0.059～0.157 g/kg/day、吸入 200+経口 800ppm 群：0.031～0.082 g/kg/day、吸入 200+経口 1600ppm 群：0.062～0.159 g/kg/day、吸入 400+経口 800ppm 群：0.037～0.085g/kg/day 及び吸入 400+経口 1600ppm 群：0.076～0.162g/kg/day であった。

(8) 尿検査（資料 1 の TABLE 7 参照）

ビリルビンの有意な低下が吸入 200+経口 0ppm 群、吸入 200+経口 800ppm 群、吸入 200+経口 1600ppm 群、吸入 400+経口 0ppm 群、吸入 400+経口 800ppm 群及び吸入 400+経口 1600ppm 群にみられた。蛋白の有意な低下が吸入 400+経口 1600ppm 群にみられた。

(9) 血液学的検査（資料 1 の TABLE 8 参照）

ヘモグロビン及びヘマトクリット値の有意な低下が吸入 200+経口 0ppm 群以外の全ての投与群でみられた。また、平均赤血球容積(MCV)及び平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)は全ての投与群で、また平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)は吸入 0+経口 800ppm 群及び吸入 200+経口 0ppm 群以外の全ての投与群で有意な低下がみられた。

血小板数の有意な増加が吸入 200+経口 0ppm 群及び吸入 400+経口 0ppm 群以外の全ての投与群でみられた。

網赤血球比の有意な低下が吸入 200+経口 1600ppm 群及び吸入 400+経口 1600ppm 群で、また有意な増加が吸入 400+経口 800ppm 群でみられた。

リンパ球比の有意な増加が 200+経口 1600ppm 群及び吸入 400+経口 1600ppm 群にみられた。

(10) 血液生化学的検査（資料 1 の TABLE 9 参照）

総ビリルビン、総コレステロール、りん脂質、AST,ALT 及びγ-GTP の有意な増加が全ての投与群でみられた。

ALP の有意な増加が吸入 0+経口 800ppm 群、吸入 0+経口 1600ppm 群を除

く全ての投与群にみられた。

総蛋白は吸入 200+経口 0ppm 群、吸入 200+経口 800ppm 群、吸入 400+経口 0ppm 群、吸入 400+経口 800ppm 群及び吸入 400+経口 1600ppm 群、トリグリセライドは吸入 0+経口 800ppm 群、吸入 0+経口 1600ppm 群、吸入 200+経口 0ppm 群及び吸入 200+経口 1600ppm 群、LDHは吸入 200+経口 1600ppm 群、吸入 400+経口 1600ppm 群、カルシウムは吸入 0+経口 800ppm 群、吸入 0+経口 1600ppm 群、吸入 200+経口 0ppm 群、吸入 200+経口 800ppm 群及び吸入 400+経口 0ppm 群で、それぞれ有意な増加がみられた。

また、アルブミンは吸入 400+経口 0ppm 群、吸入 400+経口 800ppm 群及び吸入 400+経口 1600ppm 群で有意な増加、吸入 0+経口 800ppm 群と吸入 0+経口 1600ppm 群で有意な低下がみられた。尿素窒素は吸入 0+経口 800ppm 群と吸入 0+経口 1600ppm 群で有意な増加、吸入 400+経口 800ppm 群で有意な低下がみられた。

A/G 比は経口吸入 0+800ppm 群と吸入 0+経口 1600ppm 群、グルコースは吸入 0+経口 1600ppm 群、吸入 200+経口 1600ppm 群、吸入 400+経口 800ppm 群及び吸入 400+経口 1600ppm 群、クレアチニンは吸入 200+経口 0ppm 群と吸入 200+経口 800ppm 群を除く全ての群で、ナトリウムは吸入 0+経口 800ppm 群、吸入 0+経口 1600ppm 群、吸入 200+経口 0ppm 群及び吸入 200+経口 800ppm 群で、それぞれ有意な低下がみられた。

(11) 剖検 (資料 1 の TABLE 10 参照)

肝臓の結節が DMF 投与量に応じた発生率の増加を示し、各群の発生動物数 (発生率) は、吸入 0+経口 0ppm 群 : 0 匹 (0%)、吸入 0+経口 800ppm 群 : 4 匹 (8%)、吸入 0+経口 1600 ppm 群 : 11 匹 (22%)、吸入 200+経口 0 ppm 群 : 16 匹 (32%)、吸入 200+経口 800 ppm 群 : 26 匹 (52%)、吸入 200+経口 1600 ppm 群 : 45 匹 (90%)、吸入 400+経口 0 ppm 群 : 22 匹 (44%)、吸入 400+経口 800 ppm 群 : 44 匹 (88%) 及び吸入 400+経口 1600 ppm 群 : 44 (88%) であった。

また、肝臓の白色斑も DMF 投与量に応じた発生率の増加を示し、各群の発生動物数 (発生率) は、吸入 0+経口 0ppm 群 : 1 匹 (2%)、吸入 0+経口 800ppm 群 : 1 匹 (2%)、吸入 0+経口 1600 ppm 群 : 1 匹 (2%)、吸入 200+経口 0 ppm 群 : 2 匹 (4%)、吸入 200+経口 800 ppm 群 : 17 匹 (34%)、吸入 200+経口 1600 ppm 群 : 16 匹 (32%)、吸入 400+経口 0 ppm 群 : 10 匹 (20%)、吸入 400+経口 800 ppm 群 : 26 匹 (52%) 及び吸入 400+経口 1600 ppm 群 : 27 (54%)

であった。

(12) 臓器重量 (資料 1 の TABLE 11, 12 参照)

肝臓の実重量は、吸入 200+経口 0ppm 群と吸入 400+経口 0ppm 群を除く全ての投与群、体重比は、吸入 200+経口 0ppm 群を除く全ての投与群で吸入 0+経口 0ppm 群に対して有意な増加が認められた。

腎臓実重量は吸入 0+経口 800ppm 群、吸入 0+経口 1600ppm 及び吸入 200+経口 0ppm 群で有意な増加、吸入 400+経口 0ppm 群、吸入 400+経口 800ppm 群及び吸入 400+経口 1600ppm 群で有意な低下がみられた。また、腎臓体重比は全ての投与群で有意な増加がみられた。

副腎、精巣、心臓、肺、脾臓及び脳の実重量は投与量に対応した低下がみられた。

心臓、肺及び脳の体重比は投与量に対応した増加がみられた。

(13) 病理組織学的検査

① 非腫瘍性病変 (資料 1 の TABLE 13 参照)

肝臓において、前腫瘍性病変である肝変異小増殖巣の発生が、吸入 0+経口 0ppm 群に比べて DMF 投与群で増加した。即ち、明細胞性小増殖巣は吸入 0+経口 800ppm 群を除く全ての投与群で、好酸性小増殖巣は、吸入 0+経口 800ppm 群と吸入 0+経口 1600ppm 群を除く全ての投与群で、好塩基性小増殖巣は、吸入 200+経口 1600ppm 群、吸入 400+経口 0ppm 群及び吸入 400+経口 800ppm 群で、また、肝海綿状変性が全ての投与群で発生増加がみられた。なお、胆管増生は全ての投与群で発生減少が認められた。

腎臓において、近位尿細管における褐色色素沈着が吸入 200+経口 800ppm 群、吸入 200+経口 1600ppm 群、吸入 400+経口 0ppm 群、吸入 400+経口 800ppm 群及び吸入 400+経口 1600ppm 群で吸入 0+経口 0ppm 群に比べて有意な発生増加が見られた。なお、慢性腎症については吸入 0+経口 800 ppm 群と吸入 0+経口 1600 ppm 群に程度の増強、吸入 400+経口 800 ppm 群と経口 400+経口 1600 ppm 群に発生減少がみられた。

その他、脾臓の萎縮は吸入 0+経口 800 ppm 群を除く全ての投与群で発生減少認められた。また、甲状腺の C 細胞増生は吸入 200+経口 1600 ppm 群と吸入 400+経口 1600 ppm 群、前立腺の過形成が吸入 400+経口 1600 ppm 群で発生減少がみられた。

その他の各組織・器官には DMF 投与によると思われる非腫瘍性病変の発生

への影響は認められなかった。

② 腫瘍性病変（資料 1 の TABLE 14 参照）

肝臓において、DMF 投与群で肝細胞腺腫及び肝細胞癌の顕著な発生増加がみられた。

肝細胞腺腫を持つ動物数（発生率）は、吸入 0+経口 0ppm 群：1 匹（2%）、吸入 0+経口 800ppm 群：6 匹（12%）、吸入 0+経口 1600 ppm 群：8 匹（16%）、吸入 200+経口 0 ppm 群：15 匹（30%）、吸入 200+経口 800 ppm 群：28 匹（56%）、吸入 200+経口 1600 ppm 群：45 匹（90%）、吸入 400+経口 0 ppm 群：26 匹（52%）、吸入 400+経口 800 ppm 群：43 匹（86%）及び吸入 400+経口 1600 ppm 群：46 匹（92%）であった。

悪性度の高い肝細胞癌については、その組織学的特徴から二つのタイプに分類された。タイプ 1 の肝細胞癌の組織像は、基本的に細胞質に富んでいて円形の核を有する正常肝細胞に類似した肝細胞が充実性あるいは索状に配列している（写真 1 参照）。タイプ 2 の肝細胞癌は、細胞質が乏しく紡錘形のクロマチンに富んだ核を有する腫瘍細胞が充実性に増生する組織像を呈する（写真 2 参照）。タイプ 2 の肝細胞癌は、タイプ 1 の肝細胞癌よりも低分化で悪性と考えられた。

肝細胞癌を持つ動物数（発生率）は、吸入 0+経口 0ppm 群：0 匹（0%）、吸入 0+経口 800ppm 群：0 匹（0%）、吸入 0+経口 1600 ppm 群：4 匹（8%）、吸入 200+経口 0 ppm 群：1 匹（2%）、吸入 200+経口 800 ppm 群：6 匹（12%）、吸入 200+経口 1600 ppm 群：14 匹（28%）、吸入 400+経口 0 ppm 群：2 匹（4%）、吸入 400+経口 800 ppm 群：12 匹（24%）及び吸入 400+経口 1600 ppm 群：14 匹（28%）であった。

低分化型肝細胞癌を持つ動物数（発生率）は、吸入 0+経口 0ppm 群：0 匹（0%）、吸入 0+経口 800ppm 群：0 匹（0%）、吸入 0+経口 1600 ppm 群：1 匹（2%）、吸入 200+経口 0 ppm 群：0 匹（0%）、吸入 200+経口 800 ppm 群：5 匹（10%）、吸入 200+経口 1600 ppm 群：5 匹（10%）、吸入 400+経口 0 ppm 群：2 匹（4%）、吸入 400+経口 800 ppm 群：9 匹（18%）及び吸入 400+経口 1600 ppm 群：9 匹（18%）であった。

肝臓腫瘍が死因と診断された動物は、吸入 200+経口 1600ppm 群：2/50 匹、吸入 400+経口 0ppm 群：2/50 匹、吸入 400+経口 800ppm 群：4/50 匹及び吸入 400+経口 1600ppm 群：4/50 匹であり、DMF 投与量に応じた増加傾向がみられた。しかしこの変化は、吸入 0+経口 0ppm 群（対照群）と比べて統計的有意差はみられなかった（資料 1 の TABLE 14 参照）。

その他の組織或いは器官に DMF 投与と関連する腫瘍の発生増加が認められ

なかった。また、腫瘍の転移の増加は認められなかった（資料1のTABLE 15参照）。

③ GST-P 染色標本の光学顕微鏡による観察

DMF 全投与群において、主として中心静脈周囲から広がるように、肝細胞が GST-P に染まる所見が認められた。この所見を GST-P 陽性領域 (GST-P positive area) と定義した。GST-P positive area は、中心静脈に近いほど GST-P に濃く染まり、また中心静脈から離れるほど GST-P に薄く染まる傾向がみられ、かつ、細胞毎に GST-P 染色性の程度は異なっていた。この所見は、DMF 全投与群において認められ、投与用量に応じてその染色域の面積が広がる傾向が認められた。しかし、DMF を投与しない、吸入 0+経口 0 ppm 群では GST-P 陽性領域は全く認められなかった。

一方、GST-P に均一に濃染した肝細胞の増殖巣が、対照群を含む全群で認められた。この肝細胞増殖巣は、その周囲の肝細胞とは境界が明瞭であり、染色性は各細胞とも均一に濃染する傾向が見られた。GST-P 陽性の肝細胞増殖巣は、吸入 0+経口 0 ppm 群を含む全群で認められた。

今回の試験においては肝臓腫瘍の発生が多くの個体に認められ、腫瘍発生動物と発生していない動物、また腫瘍の大きさ及び数の違いにより、肝臓標本において、GST-P 陽性領域 (GST-P positive area) と GST-P 陽性の肝細胞増殖巣を観察できる領域が個体毎にまちまちであり、定量的データを得ることが不可能であった。特に、2 から 3 個の GST-P 陽性肝細胞からなる増殖巣の識別は GST-P 陽性領域の妨害によりさらに定量的識別を困難にさせられた。

従って、今回の試験の GST-P 染色標本の光学顕微鏡による観察では、DMF 投与量に応じて GST-P 陽性領域 (GST-P positive area) が広いと思われたが、GST-P 陽性の肝細胞増殖巣は、各群及び各個体間での観察結果を比較することは不可能であった。

【考察】

DMF を雄ラットに 104 週間にわたり複数媒体（吸入及び経口）ばく露し、得られた動物の飲水量と飲水中 DMF 濃度及びばく露空気の DMF 測定値、体重値等を用いて各群の推定 DMF 摂取量を算出し以下に示した。

DMF 推定摂取量

群名称	DMF 推定摂取量 (mg/kg/day)		
	吸入	飲水 (経口)	合計
I-0 + O-0 ppm	0	-	0
I-0 + O-800 ppm	0	44	44
I-0 + O-1600 ppm	0	82	82
I-200 + O-0 ppm	121	-	121
I-200 + O-800 ppm	121	44	165
I-200 + O-1600 ppm	121	84	205
I-400 + O-0 ppm	242	-	242
I-400 + O-800 ppm	242	47	289
I-400 + O-1600 ppm	242	96	338

註)

・ I : Inhalation、O : Oral

- ・ 1 日 (6 時間) 当たりの呼吸量: $561 \text{ ml/min, kg body weight} \times 60 \text{ 分} \times 6 \text{ 時間/日} = 0.202 \text{ m}^3/6\text{hr, kg body weight}$
Mauderly, J. L., Tesarek, J. E., Sifford, L. J., and Sifford, L. J. 1979. Respiratory measurements of unsexed small laboratory mammals using nonbreathing valves. Lab. Anim. Sci. 29:323- 329.)
- ・ DMF の換算係数 Conversion factor (at 20°C) : $1 \text{ ppm} = 3 \text{ mg/m}^3$
Environmental Health Criteria 114 Dimethylformamide. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva, World Health Organization (WHO), 1991.
- ・ 従って、1 日 (6 時間) の体重 1 kg 当たりの吸入量 (estimated amount of DMF uptake) は、1 ppm の吸入ばく露による DMF の推定摂取量 (吸収率を 100% として計算) : $3 \text{ mg/m}^3 \times 0.202 \text{ m}^3/6\text{hr, kg body weight} = 0.606 \text{ mg/6hr, kg body weight}$

各群の DMF 推定総摂取量は、単独吸入群では吸入 200+ 経口 0 ppm 群 : 121 mg/kg/day 及び吸入 400 + 経口 0 ppm 群 : 242 mg/kg/day、単独経口投与群では吸入 0 + 経口 800 ppm 群 : 44 mg/kg/day 及び吸入 0+ 経口 1600 ppm 群 : 82 mg/kg/day、複数媒体ばく露群では吸入 200 + 経口 800 ppm 群 : 165 mg/kg/day、吸入 200 + 経口 1600 ppm 群 : 205 mg/kg/day、吸入 400 + 経口 800 ppm 群 : 289 mg/kg/day 及び吸入 400 + 経口 1600 ppm 群 : 338 mg/kg/day であった。

104 週間にわたり DMF を複数媒体（吸入及び経口）ばく露し、ばく露期間中は、動物の生死確認及び一般状態の観察、体重測定、尿検査（ばく露期間終期）、また、ばく露終了後は、動物を解剖し、剖検、臓器重量測定、血液学的検査、血液生化学的検査及び病理組織学的検査を行った。その結果、動物の生存率及び一般状態の観察結果には DMF 投与による顕著な影響はみられなかった。一方、体重の増加抑制が全投与期間を通じてみられた。また肝臓重量（実重量及び体重比）の増加がみられた。血

液生化学的検査では、総ビリルビン、総コレステロール、リン脂質、AST、ALT、ALP、 γ -GTP の増加がみられた。肝臓には臓器重量 (実重量と体重比) の増加が認められ、組織所見としては、前腫瘍性病変である肝変異小増殖巣の発生増加が、また腫瘍性病変としては、肝細胞腺腫、肝細胞癌及び低分化型肝細胞癌の発生増加がみられた。

これらの所見について、吸入 0+経口 0ppm 群 (対照群) を基準群とする各群間との検定に加えて、次の検定を行った。すなわち、経口単独投与影響に与える吸入ばく露の影響を調べるために、吸入 0+経口 800ppm 群を基準群とし、吸入 200+経口 800 ppm 群、吸入 400+経口 800 ppm 群の間、及び吸入 0+経口 1600ppm 群を基準群とし、吸入 200+経口 1600 ppm 群、吸入 400+経口 1600 ppm 群の間の有意差検定を行った。また、吸入単独の影響に与える経口投与の影響を調べるために、吸入 200+経口 0 ppm 群を基準群とし、吸入 200+経口 800 ppm 群、吸入 200+経口 1600 ppm 群の間、及び吸入 400+経口 0 ppm 群を基準群とし、吸入 400+経口 800 ppm 群、吸入 400+経口 1600 ppm 群の間の有意差検定を行った。その結果を次頁の表に示した。

搬出時体重及び肝臓重量 (実重量と体重比ともに) については、吸入 0+経口 0 ppm 群に対しては、吸入 200+経口 0 ppm 群を除く全群で有意な体重の低値と肝臓重量の高値がみられ、その変化は DMF 推定総摂取量に対応していた。また、吸入 0+経口 800ppm 群或いは吸入 0+経口 1600ppm 群に対しては3つの複数媒体群 (吸入 200+経口 1600 ppm 群、吸入 400+経口 800 ppm 群及び吸入 400+経口 1600 ppm 群)、また、吸入 200+経口 0 ppm 群或いは吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群に対しては4つの複数媒体群 (吸入 200+経口 800 ppm 群、吸入 200+経口 1600 ppm 群、吸入 400+経口 800 ppm 群及び吸入 400+経口 1600 ppm 群) で有意な体重の低値と肝臓重量の高値がみられた。

血液生化学的検査では、肝機能パラメータである総ビリルビン、AST、ALT、ALP 及び γ -GTP が、吸入 0+経口 0 ppm 群に対しては、全 DMF 投与群で有意な高値がみられた。特に、総ビリルビン、AST 及び ALT は、経口単独投与群 (吸入 0+経口 800 ppm 群、吸入 0+経口 1600 ppm 群) 及び吸入単独投与群 (吸入 200+経口 0 ppm 群、吸入 400+経口 0 ppm 群) と比較して4つの複数媒体群 (吸入 200+経口 800 ppm 群、吸入 200+経口 1600 ppm 群、吸入 400+経口 800 ppm 群及び吸入 400+経口 1600 ppm 群) とも有意な高値を示した。また、各項目とも DMF 推定総摂取量が 242 mg/kg/day である吸入 400+経口 0 ppm 群より DMF 推定総摂取量の少ない複数媒体投与群の吸入 200+経口 800 ppm 群 (DMF 推定総摂取量 : 165 mg/kg/day) と吸入 200+経口 1600 ppm 群 (DMF 推定総摂取量 : 205 mg/kg/day) でより高値であった。

DMFの複数媒体投与の影響が顕著に見られた所見

吸入ばく露空气中DMF濃度 (ppm)		0			200			400				
飲水中DMF濃度 (ppm)		0	800	1600	0	800	1600	0	800	1600		
DMF推定総摂取量 (mg/kg/day)		0	44	82	121	165	205	242	289	338		
		検査動物数	41	34	40	36	36	41	37	43	37	
項目1)	定期解剖時(105週)体重 (g)	平均値	410	369 <i>a</i>	346 <i>a</i>	378	359 <i>a,c</i>	333 <i>a,b,c</i>	324 <i>a</i>	313 <i>a,b,c</i>	290 <i>a,b,c</i>	
		標準偏差	67	41	44	26	18	29	41	20	29	
	肝臓実重量 (g)	平均値	12.108	14.027 <i>a</i>	14.144 <i>a</i>	12.848	14.274 <i>a,c</i>	16.452 <i>a,b,c</i>	12.700 <i>a</i>	15.217 <i>a,b,c</i>	15.455 <i>a,b,c</i>	
		標準偏差	2.042	1.587	2.015	2.182	1.817	2.976	2.993	2.529	2.950	
	肝臓体重比 (%)	平均値	3.002	3.841 <i>a</i>	4.183 <i>a</i>	3.421	3.981 <i>a,c</i>	4.998 <i>a,b,c</i>	3.943 <i>a</i>	4.877 <i>a,b,c</i>	5.312 <i>a,b,c</i>	
		標準偏差	0.609	0.555	1.022	0.693	0.552	1.133	0.996	0.877	0.877	
	総ビリルビン (mg/dl)	平均値	0.29	0.46 <i>a</i>	0.41 <i>a</i>	0.38 <i>a</i>	1.06 <i>a,b,c</i>	1.22 <i>a,b,c</i>	0.55 <i>a</i>	1.17 <i>a,b,c</i>	1.85 <i>a,b,c</i>	
		標準偏差	0.56	0.76	0.28	0.39	1.99	0.87	0.55	1.35	1.17	
	AST (IU/L)	平均値	113	217 <i>a</i>	383 <i>a</i>	204 <i>a</i>	520 <i>a,b,c</i>	947 <i>a,b,c</i>	273 <i>a</i>	408 <i>a,b,c</i>	487 <i>a,b,c</i>	
		標準偏差	91	186	564	117	420	1320	172	214	290	
	ALT (IU/L)	平均値	46	95 <i>a</i>	146 <i>a</i>	85 <i>a</i>	204 <i>a,b,c</i>	388 <i>a,b,c</i>	117 <i>a</i>	206 <i>a,b,c</i>	220 <i>a,b,c</i>	
		標準偏差	43	47	135	42	138	555	44	215	186	
	ALP (IU/L)	平均値	224	238	263	354 <i>a</i>	414 <i>a,b</i>	510 <i>a,b,c</i>	389 <i>a</i>	506 <i>a,b,c</i>	542 <i>a,b,c</i>	
		標準偏差	120	75	118	172	138	170	153	169	142	
	G-GTP (IU/L)	平均値	8	22 <i>a</i>	29 <i>a</i>	23 <i>a</i>	25 <i>a</i>	29 <i>a</i>	19 <i>a</i>	24 <i>a,c</i>	23 <i>a</i>	
		標準偏差	6	12	37	10	11	17	8	8	13	
		検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
	項目2)	病理組織学的所見: 前がん病変 肝変性細胞小増殖巣		20	14	31 <i>a</i>	37 <i>a</i>	41 <i>a,b</i>	46 <i>a,b,c</i>	45 <i>a</i>	46 <i>a,b</i>	47 <i>a,b</i>
		病理組織学的所見: 腫瘍性病変 肝細胞線種		1	6 <i>a</i>	8 <i>a</i>	15 <i>a</i>	28 <i>a,b,c</i>	45 <i>a,b,c</i>	26 <i>a</i>	43 <i>a,b,c</i>	46 <i>a,b,c</i>
肝細胞癌			0	0	4 <i>a</i>	1	6 <i>a,b,c</i>	14 <i>a,b,c</i>	2	12 <i>a,b,c</i>	14 <i>a,b,c</i>	
肝細胞線種 + 肝細胞癌			1	6 <i>a</i>	12 <i>a</i>	16 <i>a</i>	30 <i>a,b,c</i>	46 <i>a,b,c</i>	26 <i>a</i>	45 <i>a,b,c</i>	47 <i>a,b,c</i>	
低分化肝細胞癌			0	0	1	0	5 <i>a,b,c</i>	5 <i>a,c</i>	2	9 <i>a,b,c</i>	9 <i>a,b,c</i>	
		検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	

a,b,c : 無処置対照群(吸入0+経口0ppm群)との検定(a), 単独経口投与群(経口400ppm或いは経口800ppm)との検定(b)及び 単独吸入ばく露群(吸入200ppm或いは吸入400ppm)との検定(c), p<0.05 有意、項目1)はダンネット多重比較検定を項目2)はカイ2乗検定を実施した。

IARC の発がん性評価 (IARC, 1999) によると、DMF はグループ 3 (人に対する発癌物質に分類できない) に分類されている。その根拠として Malley ら (1994) の報告、すなわち、DMF をラットとマウスに 2 年間吸入ばく露した実験で、発癌性がみられなかったという報告が採用されていることが一部根拠となっている。しかし、最近、妹尾ら (2004) は、DMF を 200、400 及び 800ppm の濃度で 2 年間吸入ばく露した実験から雌雄のラットに肝細胞腺腫と肝細胞癌、雌雄マウスに肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫を発生させることを示した。

本研究では、DMF を雄 F344 ラットに 104 週間、吸入と経口の複数媒体ばく露した結果、肝細胞腫瘍、特に悪性の肝細胞腫瘍の発生を著しく増加させるという結果が得られた。すなわち、複数媒体投与群の肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生は、単独経口投与群及び単独吸入投与群と比較して有意な増加を示した。また、肝細胞癌のうち低分化型肝細胞癌の発生についても、単独経口投与群と比較して全ての複数媒体投与群で有意な高値、単独吸入投与群の発生として吸入 200+経口 1600 ppm 群を除いた複数媒体投与群で有意な高値を示した。肝臓腫瘍の発生と DMF 推定総摂取量の関係についてみると、DMF 推定総摂取量がそれぞれ 165 と 205mg/kg/日である吸入 200+経口 800 ppm と吸入 200+経口 1600 ppm の複数媒体ばく露群の両群に複数媒体影響を示唆する結果が認められた。これらの 2 つの複数媒体ばく露群は、単独吸入ばく露群である吸入 400+経口群 (DMF 推定総摂取量 242mg/kg/日) より DMF 推定総摂取量が少ないにもかかわらずより大きく、特に肝細胞癌、さらに悪性度の高い低分化型肝細胞癌の発生増加が顕著であった。

複数媒体ばく露群における肝細胞腺腫の発生は、吸入或いは経口投与の単独ばく露群の肝細胞腺腫の発生の合計の 1.2 から 2.0 倍に増加した(次頁図の (A) 参照)。また、肝細胞癌の発生は、吸入或いは経口投与の単独ばく露群の肝細胞癌の発生の合計の 2.3 から 6.0 倍に増加した(次頁図の (B) 参照)。さらに、上記の肝細胞癌より形態学的に悪性度の高い、低分化型の肝細胞癌の発生は、吸入或いは経口投与の単独ばく露群の発生の合計に比べてさらに大きく増加した(次頁図の (C) 参照)。

本研究結果は、DMF 複数媒体ばく露による悪性の肝臓腫瘍の発生の増加は相加以上の相乗作用があることを示した。

従って、米国 EPA(2000)によって化学物質混合物の影響に適用された概念(「相乗性」)に従うと、DMF に吸入と経口の複数媒体ばく露されたラットにみられた吸入と経口の単独ばく露の 2 つの発癌作用の合計を上回る複数媒体投与による相乗作用と考えられた。

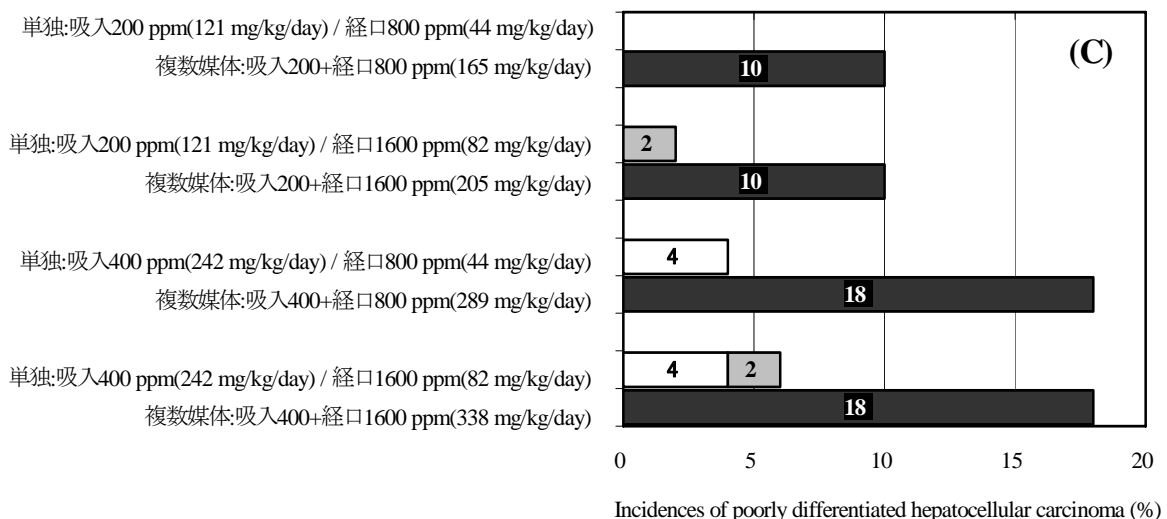
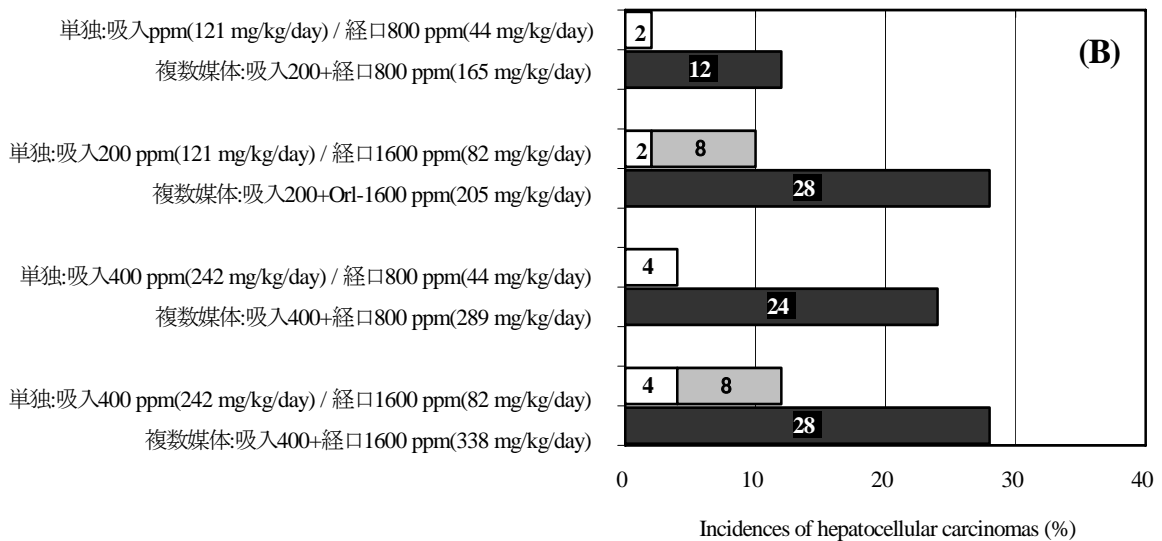
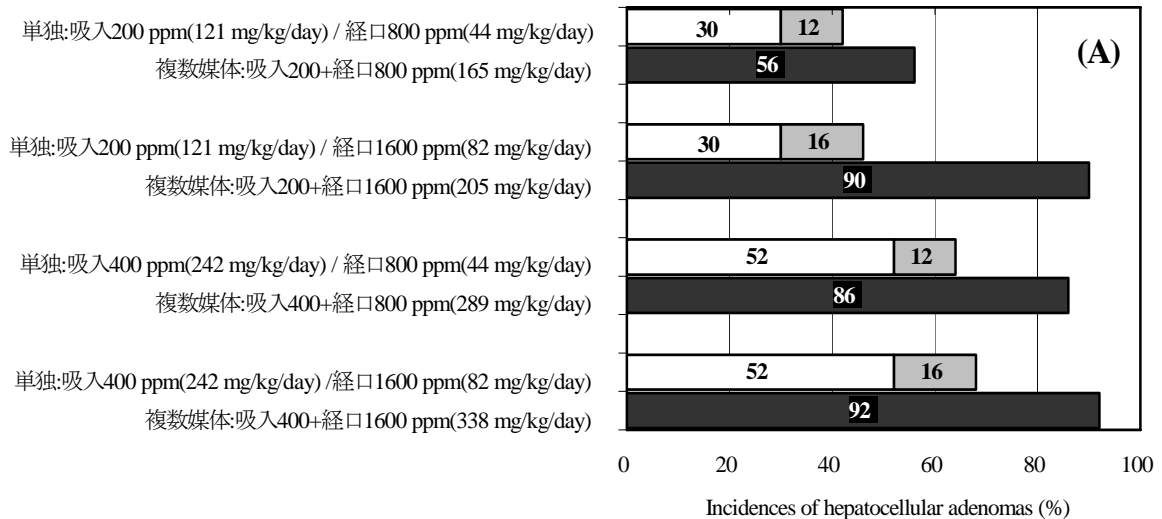


図 肝細胞腫瘍の発生比較

(A) : 肝細胞線維腫、(B) : 肝細胞癌、(C) : 低分化型の肝細胞癌

■ : 複数媒体ばく露群の各腫瘍の発生率

■ : 吸入単独ばく露群の各腫瘍の発生率

□ : 経口単独ばく露群の各腫瘍の発生率

グラフ各棒中の数字 : 各腫瘍の発生率

括弧内の数字 : DMF推定総摂取量

平成 15 年度に本試験の予備試験として実施した、DMF を 28 日間にわたり吸入と経口の複数媒体ばく露した実験において、肝細胞の核内増殖抗原 (PCNA) 陽性細胞の出現率は、吸入或いは経口単独ばく露それぞれの合計とくらべ複数媒体ばく露でより大きいこと (相加以上の変化) を見出した(Ohbayashi ら、2008)。DMF の遺伝毒性に関しては、広範囲な *in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験結果の報告から、遺伝毒性が陰性であると考えられている(IARC、1999)。DMF によって誘発された肝細胞発がんの作用メカニズムは、非遺伝毒性或いはその活性代謝物による肝細胞の死と肝細胞の再生増殖の増加が、DMF によって誘発される肝発がんにおいては重要な役割を担っていると考えられた。

DMF は体内で *N*-methylformamide(NMF) に代謝され、さらに *N*(hydroxymethyl)-*N*-methylformamide(HMMF)或いはメチルイソシアネートに変化する。NMF やメチルイソシアネートは、強力な肝臓毒性物質であると報告され (Kestell et al., 1987; Gescher, 1993; Mráz et al., 1989 and 1993)、これらの代謝物質が肝細胞傷害と細胞増殖の原因となり、肝発がんに関与している可能性がある。従って、肝臓腫瘍に関する DMF の吸入と経口の複数媒体ばく露による相乗効果を説明するために、肝臓中の DMF 及びその有毒代謝物の両者についての体内負荷を考慮した生理学的薬物動態モデル (physiologically based pharmacokinetic model) などの定量的研究が必要と思われる。

大気系及び水系にまたがって存在するクロロホルムを雄ラットに 2 年間にわたり吸入と経口の複数媒体ばく露により腎臓腫瘍が相加を超えて発生増加することが報告された(長野ら、2006)。従って、大気系、水系にまたがって存在し、複数の媒体 (経口、吸入) からばく露を受ける可能性のある DMF やクロロホルムのリスクアセスメントは複数媒体影響を考慮する必要があることを提言する。

【結論】

雄ラットに 104 週間にわたり DMF を複数媒体 (吸入及び経口) ばく露し、動物の生死確認及び一般状態の観察、体重測定、尿検査、剖検、臓器重量測定、血液学的検査、血液生化学的検査及び病理組織学的検査を行った。その結果、DMF の複数媒体ばく露は肝発がんに対して相加以上の相乗作用があると結論した。

【参考文献】

Butterworth BE, Popp JA, Conolly RB, Goldsworthy TL. 1992. Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. In: Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification (Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ, eds), IARC Scientific Publication, Number 116, 279-305.

Gescher A. 1993. Metabolism of N,N-dimethylformamide: Key to the understanding of its toxicity. *Chem Res Toxicol* 6: 245 – 251.

IARC. 1999. Dimethylformamide. In: IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Vol. 71 (Part Two), pp.545–574, International Agency for Research on Cancer, Lyon.

IPCS. 1991. Environmental Health Criteria 114, Dimethylformamide. Geneva:International Programme on Chemical Safety, World Health Organization.

Japan Ministry of the Environment. (2006.): Chemicals in the Environment, Fiscal Year 2005. Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Japan Ministry of the Environment, <http://www.env.go.jp/chemi/kurohon/2006/shosai.html> (in Japanese).

Kestell P, Threadgill MD, Gescher A, Gledhill AP, Shaw AJ, Farmer PB. 1987. An investigation of the relationship between the hepatotoxicity and the metabolism of N-alkylformamides. *J Pharmacol Exp Ther* 240: 265 – 270.

Malley LA, Slone Jr TW, Van Pelt C, Elliott GS, Ross PE, Stadler JC, Kennedy Jr GLet al. 1994. Chronic toxicity/oncogenicity of dimethylformamide in rats and mice following inhalation exposure. *Fundam Appl Toxicol* 23: 268 – 279.

Mauderly JL, Tesarek JE, Sifford LJ, Sifford LJ. 1979. Respiratory measurements of unsedated small laboratory mammals using nonrebreathing valves. *Lab Anim Sci* 29: 323-329.

Mráz J, Cross H, Gescher A, Threadgill M, Flek J. 1989. Differences between rodents and humans in the metabolic toxification of N,N-dimethylformamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 98: 507 – 516.

Mráz J, Jheeta P, Gescher A, Hyland R, Thummel K, Threadgill M. 1993. Investigation of the mechanistic basis of N,N-dimethylformamide Toxicity. Metabolism of N,N-dimethylformamide and its deuterated isotomers by cytochrome P450 2E1. *Chem Res Toxicol* 6: 197 – 207.

Nagano K, Kano H, Arito H, Yamamoto S, Matsushima T. 2006. Enhancement of renal carcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to chloroform in male rats. *J Toxicol Environ Health, Part A* 69, 1827 – 1842.

Ohbayashi H, Yamazaki K, Aiso S, Nagano K, Fukushima S, Ohta H. 2008. Enhanced proliferative response of hepatocytes to combined inhalation and oral exposures to N,N-dimethylformamide in male rats. *J Toxicol Sci* (In press).

Senoh H, Aiso S, Arito H, Nishizawa T, Nagano K, Yamamoto S, et al 2004. Carcinogenicity and chronic toxicity after inhalation exposure of rats and mice to N,N-dimethylformamide. *J Occup Health* 46: 429 – 439.

U.S. Environmental Protection Agency. 2000. Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures. EPA/630/R-00/002. Washington, DC: Risk Assessment Forum, U.S. EPA.

2. 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究

【方法と結果】

(1) 平成 16 年度

クロロホルムを 5 日間繰り返し複数媒体ばく露させたラットの血液及び臓器組織（腎臓、肝臓、脳、肺、脂肪）におけるクロロホルムの濃度を経時的に測定し、単回（1 日間）ばく露した場合と比較し、以下の結果を得た。なお、投与した被験物質は経口ばく露では安定同意体であるクロロホルム-d を用い、経口ばく露由来と吸入ばく露由来のクロロホルムを分離して測定した。

①血液中クロロホルムの蓄積性

イ)吸入ばく露由来のクロロホルム

1 日間複数媒体ばく露の吸入ばく露由来のクロロホルムの濃度の推移を Fig1-1 に、5 日間複数媒体ばく露の吸入ばく露由来のクロロホルムの濃度の推移を Fig1-2 に示した。6 時間ばく露中の各採血時間における 1 日間ばく露の濃度に対する 5 日間ばく露の濃度の比率は 1.0~1.1 (Fig1-2) であり、1 日間と 5 日間の複数媒体ばく露におけるクロロホルムの血液中濃度の推移はほぼ等しかった。

ロ)経口ばく露由来のクロロホルム

1 日間複数媒体ばく露の経口ばく露由来のクロロホルムの濃度の由来を Fig1-1 に、5 日間複数媒体ばく露の経口ばく露由来のクロロホルム濃度の推移を Fig1-2 に示した。6 時間ばく露中の各採血時間における 1 日間ばく露の濃度に対する 5 日間ばく露の濃度の比率は各時間とも 1.0 (Fig1-2) であり、1 日間と 5 日間の複数媒体ばく露におけるクロロホルムの血液中濃度の推移はほぼ等しかった。以上の結果から、反復ばく露によるクロロホルムの血液中への蓄積性はないと判断した。

②組織中クロロホルムの蓄積性

イ)吸入ばく露由来のクロロホルム

1 日間複数媒体ばく露由来のクロロホルムの濃度の推移を Fig2-1 に、5 日間複数媒体ばく露動物の吸入ばく露由来のクロロホルムの濃度の推移を Fig2-2 に示した。各採取時間における 1 日間ばく露動物の濃度に対する 5 日間ばく露動物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 の範囲にあり (Fig.2-2)、クロロホルムの肝臓、腎臓、脂肪における組織中濃度の推移は 1 日間と 5 日間の複数媒体ばく露の間に差がみられなかった。

ロ)経口ばく露由来のクロロホルム

1 日間複数媒体ばく露動物の経口ばく露由来のクロロホルムの濃度の推移を Fig3-1 に、5 日間複数媒体ばく露動物の経口ばく露由来の推移を Fig3-2 に示した。各採取時間における 1 日間ばく露動物の濃度に対する 5 日間ばく露動物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 の範囲にあり(Fig.3-2)、クロロホルムの肝臓、腎臓、脂肪における組織中濃度の推移は 1 日間と 5 日間の複数媒体ばく露の間に差がみられなかった。以上の結果から、反復ばく露によるクロロホルムの各組織への蓄積性はみられなかった

(2) 平成 17 年度

①吸入ばく露動物における胆汁採取方法の確立

クロロホルムの複数媒体ばく露による複数媒体メカニズムを胆汁中のクロロホルム代謝物の面から解明するために、吸入ばく露動物における胆汁採取方法の確立及び胆汁中のクロロホルム代謝物の測定方法について検討した。吸入ばく露動物における胆汁採取方法は、以下のような状況で吸入ばく露しながら胆汁を採取することが可能となった。

イ) 動物を吸入ばく露用ホルダーに固定し、吸入ばく露をしながら胆汁を採取した

ロ) 胆汁が一定の流量（1 分間に約 1 mL）で排出し、良好な再現性が得られた

ハ) 動物に負担をかけることなく、1 匹の動物から連続に胆汁を採取した

②胆汁中のクロロホルム代謝物の定性及び安定性

クロロホルム代謝物標準品及びクロロホルムをばく露して採取した胆汁のマススペクトルから認められた 639m/z のピークはクロロホルム代謝物の分子量 640 から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った(Fig.4)。また、¹³C 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 640m/z のピークは、投与したクロロホルムの ¹³C の炭素がグルタチオン代謝物として認められた(Fig.5)ことから、クロロホルムがホスゲン由来して、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。

胆汁中のクロロホルム代謝物の安定性に関して、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(Fig.6)。そこでクロロホルムをばく露して採取した直後の胆汁を、LC-MS で測定するために蒸留水で 50 倍希釈した溶液の安定性は、60 分以上経過しても初期濃度をほぼ維持していた(Fig.7)。このことから、クロロホルム代謝物は上記のしたように胆汁中の溶液では不

安定であるが、蒸留水に 50 倍以上に希釈することにより安定であることがわかった。

(3) 平成 18 年度

平成 17 年度に確立した分析法により、クロロホルムをラットに複数媒体ばく露し、胆汁中のクロロホルム代謝物の濃度を測定し、単独ばく露した測定結果と比較し、以下の結果を得た。

①単独吸入ばく露による胆汁中クロロホルム代謝物及びグルタチオンの分析

クロロホルム代謝物の濃度は、ばく露開始 1 時間目からばく露時間の経過にともなって上昇し、ばく露 5 時間で最高濃度に達した。ばく露を終了すると、ばく露終了後 1 時間で急速に濃度が減衰し、ばく露終了後 3 時間目ではほぼ消失した。胆汁中のグルタチオン濃度は、クロロホルム代謝物の濃度上昇より遅れて上昇し、ばく露終了後 2 時間目に最高濃度に達した(Fig.8)。

②単独経口投与による胆汁中クロロホルム代謝物及びグルタチオンの分析

クロロホルム代謝物の濃度は、投与開始 1 時間目から緩やかに上昇し、投与 6 時間後に約 200 μ g/mL の最高濃度に達し、その後、緩やかに濃度が減衰した。胆汁中のグルタチオン濃度は、クロロホルム代謝物の濃度上昇より遅れて上昇し、クロロホルムを投与してから 8 時間後に約 400 μ g/mL に達した(Fig.9)。

③複数媒体ばく露による胆汁中クロロホルム代謝物及びグルタチオンの分析

経口投与由来のクロロホルム代謝物の濃度は、投与開始 1 時間目から緩やかに上昇し、投与 4 時間後に約 200 μ g/mL の濃度に達し、その後、緩やかに濃度が減衰した。また、吸入ばく露由来では、クロロホルム代謝物の濃度は、ばく露開始 1 時間目からばく露時間の経過にともなって上昇し、ばく露 6 時間で最高濃度に達した。ばく露を終了すると、ばく露終了後 1 時間で急速に濃度が減衰し、ばく露終了後 3 時間目ではほぼ消失した。胆汁中のグルタチオン濃度は、クロロホルム代謝物の濃度上昇より遅れて上昇した(Fig.10)。

これらの結果から、複数媒体ばく露によるクロロホルムの胆汁中における代謝物の推移は、単独で経口投与あるいは単独で吸入ばく露したクロロホルムの胆汁中における代謝物の推移とよく類似した結果であり、クロロホルムの胆汁中における代謝物の推移の複数媒体ばく露による影響は認められなかった。

【まとめ】

平成 16 年度から 18 年度の結果を下記にまとめると、

イ) クロロホルム未変化体は、5 日間の複数媒体投与での繰返しばく露による体内への蓄積性は認められなかった。

ロ) クロロホルムをラットへばく露すると胆汁中に代謝物としてホスゲンのグルタチオン抱合体が認められた。この抱合体は胆汁中で不安定であり、そのままでは分析が困難であるが、クロロホルムをばく露して採取した胆汁を直ちに希釈処理するとホスゲンのグルタチオン抱合体は安定であり、正確に測定することが可能であった。

ハ) クロロホルムの複数媒体ばく露と単独の吸入ばく露及び経口投与の胆汁中クロロホルム代謝物の濃度推移を比較した結果、複数媒体ばく露による影響がないことがわかった。

【考察及び今後の課題】

平成 16 年度のクロロホルムの体内蓄積性に関する調査研究から、ばく露したクロロホルムが複数媒体の繰返しばく露により特定の組織に蓄積することがないことがわかった。このことは、クロロホルムの複数媒体による生体影響により、投与したクロロホルムの未変化体が組織に蓄積して、特に腎臓へ毒性影響を及ぼしたことは支持されなかった。このことを受けて、平成 17 年度及び平成 18 年度ではクロロホルムの代謝物であるホスゲンの体内での影響という面からクロロホルムの複数媒体影響のメカニズムを調査した。この研究から、肝臓においてクロロホルムから生成したホスゲンは、グルタチオン代謝により直ちに代謝解毒することが明らかであった。しかし、腎臓においては、肝臓のような胆汁へ解毒する代謝システムが存在しないため、同手法では腫瘍が発生している腎臓へのアプローチは困難であった。腎臓では、ホスゲンの毒性を強く受ける可能性があり、特に複数媒体ばく露のように、標的組織が吸入と経口の両面から同時にクロロホルムにばく露された場合、腎臓がより強くホスゲンの毒性影響を受けて尿細管上皮細胞が損傷し、その修復過程において細胞増殖を介して発がんが起こったことが示唆される。

クロロホルムの複数媒体ばく露による腫瘍発生の標的臓器は腎臓であるが、ホスゲンの体内における存在時間はきわめて短いため、ホスゲン自体をダイレクトにとらえることは現在の技術では困難である。従って、複数媒体影響の発生メカニズムの解明に関して、今後の検討項目としてクロロホルムをホスゲンに代謝する第一相代謝反応の酵素である CYP2E1 の活性について検討することが重要である。すなわち、クロロホルムを単独ばく露したラットの腎臓と、複数媒体ばく露

した肝臓中の薬物代謝酵素（CYP2E1）を比較すると、複数媒体ばく露した腎臓中ではその活性がより高く誘導された可能性が考えられる。従って、今後のクロロホルムのメカニズム影響の検討項目としては、複数媒体ばく露による腎臓中でのホスゲン生成と関連する薬物代謝酵素であるCYP2E1の挙動についてそのmRNAを測定し、腎臓内でのクロロホルムの複数媒体影響について検討することが必要であると考えられる。

III. 総括

1. 複数媒体ばく露による長期試験

DMF を 0 ppm、200 ppm 及び 400 ppm の濃度に調整した空気の吸入（全身ばく露）と DMF を 0 ppm、800 ppm 及び 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、すなわち複数媒体ばく露を 104 週間（2 年間）行った。ばく露期間中は、動物の生死確認及び一般状態の観察、体重測定、尿検査（ばく露期間終期）、また、ばく露終了後は、動物を解剖し、剖検、臓器重量測定、血液学的検査、血液生化学的検査及び病理組織学的検査を行い、DMF の長期複数媒体ばく露の影響を検索した。

各吸入チャンバーの DMF 濃度は、全ばく露期間を通じて、設定濃度の 200 ppm 及び 400 ppm とほぼ近似した値に制御され、飲水中の DMF 濃度も全投与期間を通じて、設定濃度の 800 ppm 及び 16000 ppm とほぼ近似した値に調製された。また、動物の飼育期間中の環境は、設定の環境基準で制御され、動物は良好な飼育環境で飼育された。

動物の生死状況に顕著な群間差は認められなかった。一般状態の観察では、DMF 複数媒体ばく露の影響と思われる特徴的な所見は認められなかった。体重の推移は、DMF 投与群にばく露開始直後より複数媒体ばく露濃度に依存した体重増加の抑制が見られ、その傾向は最終計測の 104 週まで継続した。摂餌量は、吸入 200+経口 800 ppm 群、吸入 200+経口 1600 ppm 群、吸入 400+経口 0 ppm 群、吸入 400+経口 800 ppm 群及び吸入 400+経口 1600 ppm 群で、ほぼ全投与期間を通じて低値を示し、体重の増加抑制との関連が示唆された。飲水量は、吸入 200+経口 1600 ppm 群と吸入 400+経口 1600 ppm 群で、ほぼ全投与期間を通じて低値で推移し、体重の増加抑制との関連が示唆された。

実施した検査においては、DMF ばく露による肝臓毒性及び肝腫瘍の発現と関連性の高いと思われる項目に顕著な変化が認められた。すなわち、総ビリルビン、総コレステロール、AST、ALT 及び γ -GTP の増加、剖検における肝臓の結節及び白色斑発生率の増加、肝臓の実重量及び体重比の増加がみられた。また、非腫瘍性病変では前腫瘍性病変である肝変異小増殖巣の発生増加、腫瘍性病変では DMF 投与群で肝細胞腺腫及び肝細胞癌の顕著な発生増加があった。

複数媒体ばく露群の肝臓腫瘍の発生は、吸入或いは経口の単独ばく露群と比較して有意に増加した。特に、複数媒体ばく露群の吸入 200+経口 800ppm 群（DMF 推定総摂取量：165mg/kg/day）と吸入 200+経口 1600ppm 群（DMF 推定総摂取量：205mg/kg/day）の発生率は、吸入 400+経口 0ppm の単独吸入ばく露群（DMF 摂取量 242 mg/kg/day）より DMF 推定総摂取量が少ないにもかかわらず

ず肝臓腫瘍の発生率が高かった。さらに、DMF 複数媒体ばく露群の肝細胞癌の発生率は、複数媒体ばく露群の吸入ばく露濃度と経口投与濃度に対応する単一吸入ばく露群と単一経口ばく露群の肝細胞癌の発生率の合計を大きく上回った。特に、複数媒体ばく露群における悪性度の高い低分化型の肝細胞癌の発生は、吸入或いは経口単独ばく露群と比較して顕著に増加した。

これらの結果から、DMF の複数媒体ばく露は、肝発がんに対して相加以上の相乗作用があると結論した。

2. 複数媒体影響の発生メカニズムに関する調査研究

平成 16 年度のクロロホルムの体内蓄積性に関する調査研究から、ばく露したクロロホルムが複数媒体の繰り返しばく露により特定の組織に蓄積することがないことがわかった。このことは、クロロホルムの複数媒体による生体影響により、投与したクロロホルムの未変化体が組織に蓄積して、特に腎臓へ毒性影響を及ぼしたことは支持されなかった。このことを受けて、平成 17 年度及び平成 18 年度ではクロロホルムの代謝物であるホスゲンの体内での影響という面からクロロホルムの複数媒体影響のメカニズムを調査した。この研究から、肝臓においてクロロホルムから生成したホスゲンは、グルタチオン代謝により直ちに代謝解毒することが明らかであった。しかし、腎臓においては、肝臓のような胆汁へ解毒する代謝システムが存在しないため、同手法では腫瘍が発生している腎臓へのアプローチは困難であった。腎臓では、ホスゲンの毒性を強く受ける可能性があり、特に複数媒体ばく露のように、標的組織が吸入と経口の両面から同時にクロロホルムにばく露された場合、腎臓がより強くホスゲンの毒性影響を受けて尿細管上皮細胞が損傷し、その修復過程において細胞増殖を介して発がんが起こったことが示唆された。