

平成 15 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 16 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	3
(1) <i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド	3
(2) ベンゼン	15
2 . 複数媒体影響の発生メカニズムに関する研究	24
(1) <i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド	24
(2) ベンゼン	46
(3) トルエン	54
3 . 文献調査	66
(1) 調査対象化学物質の選定	66
(2) EPA; Framework for Cumulative Risk Assessment	74
総括	76

調査概要

1 調査目的

P R T R 制度の導入や環境汚染の実態調査（黒本調査）により、化学物質が大気や水、土壌等に排出され、一般環境中から広範囲に検出される現状が把握されつつある。特に大気系、水系等にまたがって存在している有害化学物質については、単一の媒体からの曝露よりも人の健康により大きな影響（複数媒体影響）を与えることが懸念されている。本調査における平成 14 年度までに得られた成果によると、クロロホルムは複数媒体曝露により腫瘍の発生が顕著に増加することが確認された。このため、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る化学物質については、引き続き複数媒体影響に関する調査を実施するとともに、発生メカニズムに関する研究を推進することにより、リスク評価を行うために必要なスクリーニング方法の開発に取り組み、複数媒体影響に関する調査研究を推進することを目的とした。

2 調査内容

（1）動物実験

水系、大気系のいずれの環境中においても検出される化学物質、*N,N*-ジメチルホルムアミドおよびベンゼンについて、長期毒性試験（2 年間）の予備的な調査として、ラットを用いて 28 日間に亘り複数媒体（吸入及び経口）曝露し、一般状態観察、体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査及び病理組織学的検査等を実施した。

（2）複数媒体影響の発生メカニズムに関する研究

平成 14 年度より、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、複数媒体曝露による各組織への蓄積性を明らかにしてきた。平成 15 年度は、さらに *N,N*-ジメチルホルムアミド、ベンゼンおよびトルエンについて、血液や標的臓器における投与物質や代謝物の濃度を測定することにより、複数媒体曝露による健康影響の発生メカニズムを体内動態の面から研究した。

（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い、これらの研究の動向を把握するとともに、複数媒体により影響が増強される化学物質を選定するための基礎資料を作成した。

3 調査結果

（1）動物実験

N,N-ジメチルホルムアミドの 28 日間に亘る吸入曝露と経口（飲水）曝露を組合わせた曝露（複数媒体曝露）により、複数媒体曝露群の肝臓に単細胞壊死および肝細胞増殖が認められた。そこで、P C N A 陽性細胞を測定したところ、その出現率に複数媒体影響（吸入曝露と経口曝露の相加あるいはそれ以上の影響）が認められた。また、血液学的検査、血液生化学的検査および臓器重量においても曝露の影響がみられたが、それは主として吸入曝露の影響が大きかった。この結果より、予定しているがん原性試験の最高曝露濃度は、投与後 4 週の吸入 400+経口 3200ppm 群での体重抑制率が 20%と高かつ

たことと吸入曝露による毒性影響が強く出ていることから、吸入濃度を 400ppm より低くする必要が有ると考えられた。

ベンゼンでは、血液学的検査、血液生化学的検査および臓器重量に毒性影響がみられたが、その影響は主として吸入曝露による影響が大きく、複数媒体影響を受けた項目は見出せなかった。予定しているがん原性試験の最高曝露濃度は、投与後 4 週の吸入 600+ 経口 500ppm 群での体重抑制率が 10% であることより、この濃度付近が適切と考えられた。

(2) 複数媒体影響の発生メカニズムに関する研究

N,N-ジメチルホルムアミド、ベンゼンおよびトルエンについて、吸入曝露、経口曝露（強制経口投与）および吸入曝露と経口曝露を組合わせた複数媒体曝露し、血液や標的臓器における投与物質の未変化体およびその代謝物（*N,N*-ジメチルホルムアミドのみ実施）の濃度を測定し、複数媒体曝露による健康影響の発生メカニズムを体内動態の面から研究した。

N,N-ジメチルホルムアミドについては、血液中未変化体濃度は、各採血時間とも単独経路曝露群の加算値（単独吸入曝露群値+単独経口曝露群値）に比べ複数媒体曝露群が高かった。一方、血液中代謝物（*N*-メチルホルムアミド）濃度は、各採血時間とも単独経路曝露群の加算値に比べ複数媒体曝露群が低かった。また、組織中未変化体濃度は、肝臓および腎臓ともに採取期間後期（600 および 1440 分）において単独経路曝露群の加算値に比べ複数媒体曝露群が高かった。一方、組織中代謝物濃度は、腎臓でのみ最終採取時（1440 分）において単独経路曝露群の加算値に比べ複数媒体曝露群が高かった。従って、血液中および組織中の未変化体濃度に高い加算値がみられ、*N,N*-ジメチルホルムアミドの複数媒体影響の可能性が示唆された。

ベンゼン（未変化体）については、血液中未変化体濃度は、各採血時間とも単独経路曝露群の加算値に比べ複数媒体曝露群が若干高かった。従って、血液中未変化体濃度に関しては僅かながら複数媒体曝露の影響がみられた。

トルエン（未変化体）の血液・組織（脳、肝臓、脂肪）中濃度は、各採血・採取時間とも単独経路曝露群の加算値と複数媒体曝露群でほぼ同じ値であった。従って血液・各組織中濃度に関しては、複数媒体曝露の影響がみられなかった。

(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。

被験物質選定に関しては、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、大気および水系からの検出率、大気および公共水域への排出量の上位物質について「ヒトへの健康影響（発がん性を含む）が疑われる化学物質、体内作用量（キネティクス）への複数媒体投与による影響、物性等を考慮して大気及び水系から曝露の可能性が予測される化学物質」を考慮して、*N,N*-ジメチルホルムアミド、ベンゼンおよびトルエンを選定した。

また、複合媒体影響研究の動向を把握するために、EPA の Framework for Cumulative Risk Assessment を抄訳、検討した。

調査方法と結果

1. 動物実験

(1) *N,N*-ジメチルホルムアミド

【材料および方法】

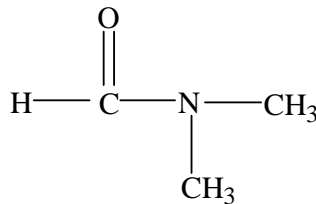
1) 被験物質

使用被験物質の名称および物性等

名 称 : *N,N*-ジメチルホルムアミド (*N,N*-Dimethylformamide)

CAS No. : 68-12-2

構造式及び分子量 (文献 1):



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

使用ロット番号 : WTL5167

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

グレード : 試薬特級

純 度 : 99.5%以上

性 状 : 微アミン臭をもつ揮発性の無色透明の液体

沸 点 : 153

融 点 : < - 61

比 重 : 0.95(20)

蒸 気 圧 : 356Pa(20)

溶 解 性 : 水には溶解、各種有機溶剤に可溶

保管条件 : 室温、遮光条件下で気密容器に保管

保管場所 : 日本バイオアッセイ研究センター被験物質保管場所

曝露方法、曝露期間、曝露時間及び曝露濃度の設定

被験物質の曝露は、吸入チャンバー内に収容した動物に被験物質混合空気を全身曝露する吸入曝露と被験物質混合飲水の自由摂取による経口曝露を組み合わせた複数経路による複数媒体曝露とした。

吸入曝露は、動物を収容した吸入チャンバー内に設定濃度 (ppm:v/v) に調整した *N,N*-ジメチルホルムアミドを含む空気を送り込み、動物に全身曝露した。経口曝露は、設定濃度 (ppm:wt/wt) に希釈調製した *N,N*-ジメチルホルムアミド混合飲水を加圧式自動給水装置にて動物に自由摂取させることにより行った。ただし、吸入対照群には、新鮮空気のみを全身曝露し、また、経口対照群には、脱イオン水のみを自由摂取させた。

曝露期間は、吸入曝露は群構成日の翌日から解剖日前日まで (祝祭日をのぞく 19 回 ; 1 週 5 日、1 日 6 時間) とし、また、経口曝露は群構成日から解剖日の解剖直前まで (29 日間連続) とした。

¹ National Library of Medicine (2003) Hazardous Substances Databank (HSDB),
(インターネット検索) NLM, Bethesda, MD

吸入曝露濃度は、400 ppm、200 ppm、0 ppm の 3 段階、経口曝露濃度は 3200 ppm、1600 ppm、800 ppm、0 ppm の 4 段階とし、合わせて 12 段階の曝露濃度を設定した。

曝露方法、曝露期間、曝露時間及び曝露濃度の設定理由は、次のとおりである。

曝露方法は、生活環境における化学物質の曝露形態に近いと考えられる全身曝露による吸入曝露と飲水自由摂取による経口曝露を組み合わせた複数媒体曝露とした。曝露期間は、がん原性試験の曝露濃度を決定するための予備的な調査として、28 日間とした。吸入曝露の曝露時間は、OECD 化学品テストガイドライン 412²に従い、1 日 6 時間とし、経口曝露は同ガイドライン 407³に従い 24 時間とした。

曝露濃度は、当センターで実施した 2 週間吸入試験（試験番号 0263）及び 13 週間吸入試験（試験番号 0275）の結果をもとに決定した⁴。すなわち、2 週間吸入試験は 1600～100 ppm（公比 2）の濃度で行った。その結果、1600 ppm 群で動物の死亡がみられたが、800 ppm 以下の群では死亡はみられなかった。800 ppm 群では体重増加の抑制及び肝臓に単細胞壊死がみられた。400 ppm 以下の群にはそれらの変化はみられなかった。また、13 週間吸入試験は 800～50 ppm（公比 2）の濃度で行った。その結果、400 ppm 以上の群では体重増加の抑制がみられ、また、100 ppm 以上の群で肝重量の増加、200 ppm 以上の群で肝臓に単細胞壊死と小葉中心性の肝細胞の腫脹がみられた。これらの結果より、吸入曝露による最高濃度は、肝臓への影響が予測される 400 ppm を最高濃度とし、以下 200ppm（公比 2）と決定した。経口曝露の濃度は、経口試験データが少ないため、吸入曝露のデータをもとにして 3 段階の曝露濃度を設定した。すなわち、吸入曝露濃度の最高用量（400 ppm）に相当する用量を動物の呼吸量に基づいた換算式⁵から算出した。この値を中間用量とし、この値の 1/2 を最低用量に、2 倍を最高用量とした。その結果、吸入濃度の 400ppm に相当する経口飲水濃度を 1600ppm とし、最低用量を 800ppm、最高用量を 3200ppm に設定した。

被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質供給装置（柴田科学株式会社 特注）の発生容器内の *N,N*-ジメチルホルムアミド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 *N,N*-ジメチルホルムアミド蒸気を清浄空気（搬送空気）と混合しながら一定温度に冷却し、次に再加温し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を吸入チャンパー上部のラインミキサーに供給した。吸入チャンパー内の *N,N*-ジメチルホルムアミド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、*N,N*-ジメチルホルムアミドの吸入チャンパーへの供給量を調節した。

² Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (1981) OECD Guideline for Testing of Chemicals 413; Subchronic Inhalation Toxicity : 90 day Study. OECD, Paris

³ Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (1995) OECD Guideline for Testing of Chemicals 407; Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. OECD, Paris

⁴ Senoh,H., Katagiri,T., Arito,H., Nisizawa,T., Nagano,K., Yamamoto,S. and Matsusima,T. (2003) Toxicity due to 2- and 13-wk inhalation exposures of rats and mice to *N,N*-dimethylformamide J. Occup. Health 45 (in press)

⁵ 環境省環境保健部環境リスク評価室（2003）化学物質の環境リスク評価 第 2 巻 pp27-31 環境省環境保健部環境リスク評価室、東京

被験物質混合飲水の調製方法

加圧式給水タンク内に設定量の脱イオン水と *N,N*-ジメチルホルムアミドを加え、密閉後、ボールミルポット回転台で回転混合し、各設定濃度の被験物質混合飲水を調製した。

なお、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。

被験物質混合飲水中の被験物質の濃度測定

各設定濃度に調製した被験物質混合飲水中の被験物質の濃度は、初回調製時にガスクロマトグラフ(Hewlett Packard 5890A)を用いて分析し、設定濃度に調製されていることを確認した。なお、被験物質混合飲水中の被験物質の安定性は、本試験に先だって、5600 ppm と 100 ppm の被験物質混合飲水について、室温保存の 8 日間における安定性をガスクロマトグラフ(Hewlett Packard 5890A)を用いて分析し、安定であることを確認した。

2) 試験動物

試験には、F344/DuCrj ラット (SPF) 雄を使用した。動物は、日本チャールス・リバー ((株) 厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795) より 4 週齢で導入し、一週間の検疫および一週間の馴化後、一般状態の観察及び体重測定から健康であると判断した動物について、適正層別方式 (群間の体重の偏りを小さくする方法)⁶ により群分けし、試験に使用した。

動物の飼育環境条件及び使用した動物ケージは下記表のとおりとした。

【動物の飼育環境条件及び使用した動物ケージ】

	検疫室	吸入試験室	吸入チャンバー内	
			馴化期間	曝露期間
温度	23 ± 2	21 ± 2	20 ~ 24	
湿度	55 ± 15 %	55 ± 15 %	30 ~ 70 %	
明暗サイクル	12 時間点灯 (8 : 00 ~ 20 : 00) / 12 時間消灯 (20 : 00 ~ 8 : 00)			
換気回数	15 ~ 17 回 / 時		12 ± 1 回 / 時	
圧力	-	-	0 ~ - 15 × 10Pa	
ケージへの動物の収容方法	単飼	-	単飼	単飼
ケージの材質・形状	ステンレス製 2 連網ケージ	-	ステンレス製 5 連網ケージ	ステンレス製 5 連網ケージ
ケージ寸法：1 匹当り (mm)	W170 D294 H176	-	W150 D216 H176	W150 D216 H176

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)千葉工場 (千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1 固型飼料 (30KGy- 線照射滅菌飼料) を固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖日前日の夕方からは絶食した。

飲水は、検疫及び馴化期間は市水 (秦野市水道局供給) をフィルターろ過し、紫外線照射した飲料水を自動給水装置により給水し、自由摂取させた。曝露期間は、脱イオン水で所定の濃度に調製した被験物質混合飲水を加圧式自動給水装置により自由摂取させた。

3) 試験の群構成および使用動物数

群の構成は、対照群 1 群、経口曝露群 3 群、吸入曝露群 2 群および経口と吸入を組み合わせた複数媒体曝露群 6 群を設け、全群で 12 群とし、各群ともに動物は 5 匹の雄性ラットを割り当てた。また、各群の曝露濃度、群名称(群番号)、使用動物数及び動物番号は下表のとおりとした。

【 各群の曝露濃度、群名称、使用動物数 (動物番号) 】

曝露濃度		吸入曝露 (ppm)		
		0	200	400
経口 曝露 (ppm)	0	対照群(吸入 0+経口 0 群) 5 匹 (1001-1005)	吸入 200 +経口 0 群 5 匹 (1006-1010)	吸入 400 +経口 0 群 5 匹 (1011-1015)
	800	吸入 0 +経口 800 群 5 匹 (1101-1105)	吸入 200 +経口 800 群 5 匹 (1106-1110)	吸入 400 +経口 800 群 5 匹 (1111-1115)
	1600	吸入 0 +経口 1600 群 5 匹 (1201-1205)	吸入 200 +経口 1600 群 5 匹 (1206-1210)	吸入 400 +経口 1600 群 5 匹 (1211-1215)
	3200	吸入 0 +経口 3200 群 5 匹 (1301-1305)	吸入 200 +経口 3200 群 5 匹 (1306-1310)	吸入 400 +経口 3200 群 5 匹 (1311-1315)

4) 観察・検査項目及び方法

動物の生死及び一般状態の観察

検査及び馴化期間は、全動物について、生死及び瀕死の確認を毎日 1 回、一般状態の詳細な観察は検査開始日(導入時)、馴化開始日及び馴化最終日(群構成時)に行った。また、曝露期間は、全動物について、曝露開始前に生死及び瀕死の確認を毎日 1 回、一般状態の詳細な観察は週 1 回行った。

体重測定

検査及び馴化期間は、全動物について、検査開始日(導入時)及び馴化開始日及び馴化最終日(群構成時)に体重を測定した。また、曝露期間は、全動物について、毎週 1 回、曝露開始前に体重を測定した。なお、定期解剖動物の搬出時にも測定を行った。

摂餌量測定

全動物について、毎週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から一日当たりの摂餌量 (給餌量 - 残餌量) ÷ 給餌日数) を算出した。

摂水量の測定

全群について、毎週 1 回、給水量及び残水量を測定し、その値から一日当たりの摂水量 (給水量 - 残水量) ÷ 給水日数) を算出した。

被験物質摂取量

摂水量及び設定濃度より、動物体重 1 kg 当りの 1 日の経口曝露による被験物質摂取量 (g/kg/day) を算出した。また、呼吸量及び設定濃度より算出した、被験物質摂取量を加えた複数媒体曝露による動物体重 1 kg 当りの 1 日の吸入曝露による被験物質摂取量 (g/kg/day) を合わせて算出した。

⁶ 阿部正信(1986) 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立。薬理と治療, 14:7285-7302

尿検査

曝露期間後期まで生存し、採尿可能であった動物について、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、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血およびウロビリノーゲンについて検査を行った。

血液学的検査

定期解剖時に生存し、採血可能であった動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採取し、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）、血小板数、網赤血球比、白血球数および白血球百分率を検査した。検査方法等は次頁の表に示した。なお、検査対象動物は、解剖日前日夕方より絶食させた。

血液生化学的検査

定期解剖時に生存し、採血可能であった動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より、ヘパリンリチウム入り採血管に採血し、遠心分離して得られた血漿について、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、GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、CPK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウムおよび無機リンを検査した。検査方法等は下表に示した。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食させた。

病理学的検査

イ) 剖検

全動物について肉眼的観察により、剖検を行った。

ロ) 臓器重量

全解剖動物について、胸腺、副腎、精巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓および脳の湿重量（実重量）を測定した。また、これらの湿重量と解剖時体重（搬出時体重）をもとに臓器重量体重比（体重に対する百分率）を算出した。

ハ) 臓器の採取保存

全解剖動物について、皮膚、鼻腔、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、精嚢、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）およびその他（肉眼的に変化のみられた器官、組織）を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。

ニ) 病理組織学的検査

全解剖動物について、鼻腔（3箇所を横断）、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、脾臓、心臓、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、腎臓、副腎、その他（肉眼的に変化のみられた器官、組織または臓器重量測定などから標的器官と認められた器官、組織）を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡により検査した。

【血液学的検査および血液生化学的検査の方法・単位・小数点以下桁数】

項目	検査方法	単位	小数点以下桁数
血液学的検査			
赤血球数(RBC)	光学的散乱法 ¹⁾	× 10 ⁶ /μL	2
ヘモグロビン濃度(Hgb)	シアマトヘグロビン法 ¹⁾	g/dL	1
ヘマトクリット値(Hct)	計算法(RBC × MCV/10) ¹⁾	%	1
平均赤血球容積(MCV)	光学的散乱法 ¹⁾	fL	1
平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)	計算法(Hgb/RBC × 10) ¹⁾	pg	1
平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)	計算法(Hgb/Hct × 100) ¹⁾	g/dL	1
血小板数	光学的散乱法 ¹⁾	× 10 ³ /μL	0
網赤血球比	光学的散乱法 ¹⁾	%	1
白血球数	光学的散乱法 ¹⁾	× 10 ³ /μL	2
白血球分類	パターン認識法 ²⁾ (ワイト染色)	%	0
血液生化学的検査			
総蛋白(TP)	ビュレット法 ³⁾	g/dL	1
アルブミン(Alb)	BCG法 ³⁾	g/dL	1
A/G比	計算法(Alb/(TP-Alb)) ³⁾	-	1
総ビリルビン	アルカリフスフィン法 ³⁾	mg/dL	2
グルコース	GlcK・G-6-PDH法 ³⁾	mg/dL	0
総コレステロール	CE・COD・POD法 ³⁾	mg/dL	0
トリグリセライド	LPL・GK・GPO・POD法 ³⁾	mg/dL	0
リン脂質	PLD・ChOD・POD法 ³⁾	mg/dL	0
GOT	JSCC法 ³⁾	IU/L	0
GPT	JSCC法 ³⁾	IU/L	0
LDH	SFBC法 ³⁾	IU/L	0
ALP	GSCC法 ³⁾	IU/L	0
-GTP	JSCC法 ³⁾	IU/L	0
CPK	JSCC法 ³⁾	IU/L	0
尿素窒素	ウリアゼ・GLDH法 ³⁾	mg/dL	1
クレアチニン	Jaffe法 ³⁾	mg/dL	1
ナトリウム	イオン選択電極法 ³⁾	mEq/L	0
カリウム	イオン選択電極法 ³⁾	mEq/L	1
クロール	イオン選択電極法 ³⁾	mEq/L	0
カルシウム	OCPC法 ³⁾	mg/dL	1
無機リン	PNP・XOD・POD法 ³⁾	mg/dL	1

1) 総合血液学検査装置 (ADVIA 120 : パイエル社) により測定した。

2) 血液細胞自動分類装置 (MICROX HEG-120NA : オムロン(株)) により測定した。

3) 自動分析装置 (日立 7070 : (株)日立製作所) により測定した。

また、肝臓については、単細胞壊死および細胞分裂像増加が見られたため、増殖細胞核抗原 (PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen) 免疫染色標本を作製⁷⁾し、肝細胞の PCNA 染色陽性細胞の出現率を画像解析装置を用いて測定⁸⁾した。

⁷⁾ 染色は、抗 PCNA マウスモノクローナル抗体 クローン PC10 (DAC0, USA) を用いて行った。

古川文夫等 (1992) 増殖細胞核抗原 (PCNA) 免疫染色における抗原性の復活法. 臨床検査, 36(12), 1275-1278.

⁸⁾ 画像解析測定方法: 測定する視野は、10 倍対物レンズにより中心静脈から周辺域に向かう間の肝細胞索を中心に選んだ。肝臓中央葉で 3 視野 (1 視野の面積は 176,000 μm²であった) を測定した。PCNA 染色陽性細胞は光学顕微鏡で確認しながら手でカウントし、また正常細胞は二値化による自動測定を行った。二値化の 0 ~ 225 までの濃淡比率については、数値の下限は 0、上限は 170 ~ 201 で行った。

5) 数値の取り扱いと表示および統計方法

数値の取り扱いと表示

各数値データは計測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は、ppm を単位として、小数点以下第 3 位まで計測し、小数点以下第 2 位を四捨五入し、小数点以下第 1 位までを表示した。

体重は、g を単位とし、整数値の 1 の位まで計測し、表示した。

摂餌量は、g を単位とし、動物個体毎に給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで計測し、給餌量値から残餌量値を減じた値を給餌期間の日数で除して 1 日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

摂水量は、g を単位とし、群毎に給水量および残水量を整数値で計測し、給水量値から残水量値を減じた値を延べ匹数(給水日数×群動物数)で除して 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。

経口曝露による被験物質の体重 kg 当りの 1 日摂餌量は、群毎に摂水量値に被験物質の設定濃度を乗じた値をさらに体重で除して算出し、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。

臓器実重量は、g を単位とし、小数点以下第 3 位まで計測し、表示した。

臓器重量体重比は、臓器実重量値を解剖時体重(搬出時体重)で除した値にさらに 100 を乗じて算出し、パーセントを単位として、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。

血液学的検査および血液生化学的検査は、前頁に示した表中の単位と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、上記に示した桁数と同桁数になるように四捨五入を行い表示した。

統計方法

本試験で得られた測定値は、原則として、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には、各群を通して測定値を順位化して Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett (型) の多重比較を行った。

なお、予備検定については 95% の信頼限界で、最終検定については 95% 及び 99% の信頼限界で両側検定を行った。

【結果】

1) 生死状況

全ての群に、曝露期間を通して死亡は認められなかった。

2) 一般状態

曝露の影響と認められる所見はなかった。

3) 体重 (表 1)

曝露 1 週目に、対照群(吸入 0 ppm+経口 0 ppm)と比べて吸入単独曝露の吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群、経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 3200 ppm 群、複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 群、吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群で体重増加の抑制がみられた。曝露 2 週目以降曝露終了まで複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群で体重増加の抑制がみられた。

4) 摂水量 (表 2)

曝露期間を通して吸入曝露、経口曝露、複数媒体曝露とも低濃度群では対照群より高値を示したが、吸入曝露の 400 ppm 群、経口曝露の 1600 ppm 群、3200 ppm 群及びその濃度を組み合わせた群では濃度に応じて低値を示した。

5) 摂餌量 (表 3)

曝露 1 週目に、対照群(吸入 0 ppm+経口 0 ppm)と比べて吸入単独曝露の吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群、経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 3200 ppm 群、複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 群、吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 800 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群で摂餌量の低値がみられた。曝露 2 週目以降曝露終了まで複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群で体重増加の抑制がみられた。曝露 2 週目には、複数媒体曝露の吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群と吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群で摂餌量の低値がみられた。曝露 3 週目以降曝露終了まで複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群で摂餌量の低値がみられた。

6) 被験物質摂取量 (表 4)

経口曝露による被験物質の摂取量は、設定濃度に対応していた。吸入曝露 200 ppm と経口曝露 800 ppm、吸入曝露 400 ppm と経口曝露 1600 ppm の被験物質摂取量がそれぞれほぼ等しい値であった。

7) 血液学的検査 (表 5)

ヘモグロビン濃度と MCV の減少と、血小板数の増加が吸入単独曝露、経口単独曝露、複数媒体曝露すべての曝露群でみられた。ヘマトクリットが吸入単独曝露の吸入 200 ppm+経口 0 ppm 群と吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群、経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 1600 ppm 群と吸入 0 ppm+経口 3200 ppm 群、複数媒体曝露のすべての群で減少した。MCH が経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 1600 ppm 群と吸入 0 ppm+経口 3200 ppm 群、複数媒体曝露のすべての群で減少した。白血球数が複数媒体曝露の吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群で減少した。この他、MCHC が経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 3200 ppm 群と複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 800 ppm 群で減少した。

8) 血液生化学的検査 (表 6)

吸入、経口両方の影響が見られた項目：リン脂質の増加と ALP の減少が吸入単独曝露、

経口単独曝露、複数媒体曝露すべての曝露群でみられた。総コレステロールの増加が吸入単独曝露の吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群、経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 1600 ppm 群と吸入 0 ppm+経口 3200 ppm 群、複数媒体曝露のすべての群で、GPT の上昇が吸入単独曝露の吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群、経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 3200 ppm 群、複数媒体曝露のすべての群で、CPK の上昇が吸入単独曝露の吸入 4000 ppm+経口 0 ppm 群、経口単独曝露のすべての群、複数媒体曝露の吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群を除くすべての群でみられた。カルシウムの増加が吸入単独曝露の吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群、経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 800 ppm 群と吸入 0 ppm+経口 1600 ppm 群、複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 群、吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 800 ppm 群でみられた。

吸入の影響がよりみられた項目：総ビリルビンの増加が吸入単独曝露の吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群と複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群で、グルコースの増加が吸入単独曝露の吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群と複数媒体曝露の吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群で、GOT の上昇が複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 群と吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群でみられた。

経口の影響がよりみられた項目：総蛋白質とアルブミンの増加が経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 800 ppm 群と吸入 0 ppm+経口 1600 ppm 群でみられた。

その他、A/G 比の低下が吸入単独曝露の吸入 200 ppm+経口 0 ppm 群と経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 800 ppm 群で、トリグリセライドの低下が複数媒体曝露の吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群でみられた。

9) 尿検査 (表 7)

pH の低下が経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 800 ppm 群、複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群で、蛋白の陽性度の増加が吸入単独曝露の吸入 200 ppm+経口 0 ppm 群と吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群、経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 1600 ppm 群と吸入 0 ppm+経口 3200 ppm 群及び複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群で、ケトン体の陽性度の増加が経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 3200 ppm 群でみられた。

10) 剖検

曝露の影響と認められる所見はなかった。

11) 臓器重量 (表 8)

肝臓では実重量の高値が吸入単独曝露の吸入 200 ppm+経口 0 ppm 群と吸入 400 ppm+経口 0 ppm 群、経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 800 ppm 群、吸入 0 ppm+経口 1600 ppm 群と吸入 0 ppm+経口 3200 ppm 群、複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 800 ppm 群、吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 800 ppm 群でみられたが、複数媒体曝露でもより高濃度の吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群では認められなかった。肝臓の体重比では吸入単

独曝露の吸入 200 ppm+経口 0 ppm 群と複数媒体曝露の吸入 200 ppm+経口 800 ppm 群を除くすべての曝露群で高値が認められた。その他解剖時体重の低値に伴う実重量の低値と、体重比の高値が認められる臓器がみられた。

12) 病理組織学的検査 (表 9、表 10)

肝臓に単細胞壊死、細胞分裂像の増加、肝細胞の肥大がみられた(表 9 参照)。これらの変化は肝臓の小葉中心域に観察された。

単細胞壊死は、吸入単独曝露、経口単独曝露及び複数媒体曝露のすべての群に発生した。吸入単独曝露では、200 ppm 群、400 ppm 群とも全例に発生し、その程度は 200 ppm 群では軽度から中等度、400 ppm 群では中等度であった。経口単独曝露では、800 ppm 群の 3 匹に軽度な発生、1600 ppm 群の 4 匹に軽度(3 匹)から中等度(1 匹)な発生、3200 ppm 群の 5 匹に軽度(1 匹)から中等度(4 匹)の発生がみられた。複数媒体曝露では、吸入 200 ppm+経口 800 ppm 群と吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 群は吸入単独曝露の 200 ppm 群及び経口単独曝露の各濃度群に比較して発生がやや強かった。しかし、吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群は経口単独曝露の 3200 ppm 群と同程度、吸入 400 ppm+経口 800 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群は吸入単独曝露の 400 ppm 群と同程度の発生であった。

細胞分裂像の増加は、吸入単独曝露、経口単独曝露及び複数媒体曝露群に発生した。吸入単独曝露では、200 ppm 群の 1 匹に軽度な増加、400 ppm 群の 5 匹に軽度から中等度な増加がみられた。経口単独曝露では、3200 ppm 群にのみ 3 匹に軽度(2 匹)から中等度(1 匹)の増加がみられた。複数媒体曝露では、吸入 200 ppm+経口 800 ppm 群、吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 群及び吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群は吸入単独曝露の 200 ppm 群及び経口単独曝露の各濃度群に比較して発生がやや強かった。しかし、吸入 400 ppm+経口 800 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群は吸入単独曝露の 400 ppm 群と同程度の発生であった。

肝細胞の肥大は、吸入単独曝露、経口単独曝露及び複数媒体曝露のすべての群に発生した。吸入単独曝露では、200 ppm 群の 2 匹に軽度な発生、400 ppm 群の 5 匹に中等度の発生がみられた。経口単独曝露では、800 ppm 群、1600 ppm 群及び 3200 ppm 群ともほぼ全例に軽度な発生があった。複数媒体曝露では、吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 群と吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群は吸入単独曝露の 200 ppm 群及び経口単独曝露の各濃度群に比較して発生がやや強かった。しかし、吸入 200 ppm+経口 800 ppm 群は経口単独曝露の 800 ppm 群と同程度、吸入 400 ppm+経口 800 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群及び吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群は吸入単独曝露の 400 ppm 群と同程度の発生であった。

また、肝臓では、増殖細胞核抗原(PCNA)染色陽性細胞の出現率の増加が見られた(表 10 参照)。吸入 200ppm+経口 800ppm 群、吸入 200ppm+経口 1600ppm 群および吸入 200ppm+経口 3200ppm 群の出現率は、1.9%、3.6%および 5.8%であり、吸入 200ppm 単独群と各経口単独群の出現率の合計の 1.6%、2.2%および 3.2%と比較していずれも高く、また、吸入 400ppm+経口 800ppm 群、吸入 400ppm+経口 1600ppm 群および吸入 400ppm+

経口 3200ppm 群の出現率は、2.6%、3.6%および 4.4%であり、吸入 400ppm 単独群と各経口単独群の出現率の合計の 2.4%、3.0%および 4.0%と比較していずれも高かった。

腎臓には好酸体の発生低下がみられた（表 9 参照）。この変化は、吸入単独曝露では、400 ppm 群、経口単独曝露では 3200 ppm 群にみられた。複数媒体曝露では、全ての群（吸入 200 ppm+経口 800 ppm 群、吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 群、吸入 200 ppm+経口 3200 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 800 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 1600 ppm 群、吸入 400 ppm+経口 3200 ppm 群）に発生低下がみられた。

【考 察】

体重増加抑制、摂餌量の減少（低濃度群では増加）、摂水量の減少がみられたが、複数媒体曝露の影響ではなく吸入曝露依存と考えられた。

ヘモグロビン濃度の軽度減少、ヘマトクリット値の軽度減少がみられたが、複数媒体曝露の影響とは考えられなかった。MCV の減少および MCH の減少では、複数媒体曝露の影響が僅かながら認められた。血小板数の増加もみられたが、複数媒体曝露の影響とは考えられなかった。

総ビリルビンの増加、GPT の上昇は吸入曝露依存であった。総コレステロール、リン脂質およびカルシウムの増加と ALP の低下がみられたが、吸入、経口曝露を合わせた変化は僅かであり複数媒体曝露の影響とは思われなかった。CPK の低下は経口曝露依存であった。

肝臓の実重量の高値が複数媒体曝露高用量群を除く曝露群にみられたが、その影響は経口曝露が大きく、かつ高用量になるとその影響は抑制されていた。また、体重比の増加がほとんどの曝露群にみられた。これらの変化は高用量群では肝臓重量増加を体重増加の抑制が上回ったためと考えられた。その他解剖時体重の低値に伴う実重量の低値と、体重比の高値が認められる臓器がみられた。

複数媒体曝露曝露群とそれぞれの濃度の吸入単独曝露及び経口単独曝露を比較すると、単細胞壊死は吸入 200 ppm+経口 800 ppm 群と吸入 200 ppm+経口 1600 ppm、細胞分裂像の増加は吸入 200 ppm+経口 800 ppm 群、吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 及び吸入 200 ppm+経口 1600 ppm、肝細胞の肥大は吸入 200 ppm+経口 1600 ppm と吸入 200 ppm+経口 1600 ppm に発生増加がみられた。増殖細胞核抗原（PCNA）染色陽性細胞の出現率の増加には、明らかな複数媒体影響が認められた。

吸入 200 ppm+経口 800 ppm 群と吸入 200 ppm+経口 1600 ppm 群は、それぞれの濃度の吸入単独曝露及び経口単独曝露では腎臓の好酸体の発生低下が示されなかったが、複数媒体曝露によって発生低下が現れた。

試みとして、前述の試験結果において、対照群（経口 0ppm+吸入 0ppm 群）と各群間、吸入各濃度群とその経口対照群（経口 0ppm 群）間および経口各濃度群とその吸入対照群（吸入 0ppm 群）間で行ったダネット検定において、統計的に有意な変化が見られた測定・検査項目について、対照群（経口 0ppm+吸入 0ppm 群）と比較した各群の増減率（対照

群値と各群値との差、すなわち増加値あるいは減少値の対照群値に対するそれらの百分率；増減率(%) = (各群平均値 - 対照群平均値) ÷ 対照群平均値 × 100) を算出し、それらを 3D グラフに表した(図 1 ~ 4 参照)。また、病理組織所見については、P C N A 陽性細胞出現率(前述の増減率と出現率実数の両方を表した)を除き、所見にグレードを持っているため、評点(評点=[+の動物数]x1+[++の動物数]x2+[+++の動物数]x4+[++++の動物数]x8)を算出し、それらを 3D グラフに表した(図 5 参照)。

N,N-ジメチルホルムアミドの複数媒体曝露影響(吸入曝露と経口曝露の相加あるいはそれ以上の影響)は、病理組織学的検査における P C N A 陽性細胞出現率にのみ認められた(図 5 参照)。一方、血液学的パラメーター(図 2 参照)、血液生化学的パラメーター(図 3 参照)、臓器重量(図 4 参照)の多くの項目および P C N A 陽性細胞出現率以外の組織変化(図 5 参照)については主として吸入曝露の影響を大きく受けていることが伺われ、複合媒体曝露影響は見出せなかった。

その他、網赤血球数、白血球数、L D H 等は、視覚的に複数媒体影響を伺わせる変化を示したが、相加的影響とするにはその増減率の群間差は小さかった。

予定しているがん原性試験の適正曝露濃度の設定の観点より、図 1 を見てみると、曝露後 4 週の吸入 400+経口 3200ppm 群での体重抑制率は 20% になり、がん原性試験では濃度を低く設定する必要があると考えられた。特に、この試験では吸入曝露による毒性影響が強く出ていることから、がん原性試験の吸入濃度を低くすることを提案する。

【まとめ】

N,N-ジメチルホルムアミドの 28 日間に亘る吸入曝露と経口(飲水)曝露を組合わせた曝露(複数媒体曝露)により、複数媒体曝露群の肝臓に単細胞壊死および肝細胞増殖が認められた。そこで、P C N A 陽性細胞を測定したところ、その出現率に複数媒体影響(吸入曝露と経口曝露の相加あるいはそれ以上の影響)が認められた。また、血液学的検査、血液生化学的検査および臓器重量においても曝露の影響がみられたが、それは主として吸入曝露の影響が大きかった。

この結果より、予定しているがん原性試験の最高曝露濃度は、投与後 4 週の吸入 400+経口 3200ppm 群での体重抑制率が 20% と高かったことと吸入曝露による毒性影響が強く出ていることから、吸入濃度を 400ppm より低くする必要があると考えられた。

(2) ベンゼン

【材料および方法】

1 被験物質

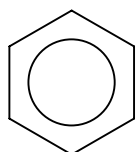
1) 被験物質

使用被験物質の名称および物性等

名 称 : ベンゼン(Benzene)

CAS No. : 71-43-2

構造式及び分子量¹ :



C₆H₆ (分子量 : 78.11)

使用ロット番号 : ASG7159

製造元 : 和光純薬工業株式会社

グレード : 試薬特級

純 度 : 99.5%以上

性 状 : 無色の液体

沸 点 : 80.1

融 点 : 5.5

比 重 : 0.8786(20)

蒸 気 圧 : 13.33kPa(26.9)

溶 解 性 : 水に 700mg/L (22) 溶解

エタノール、クロロホルム、エーテル、二硫化炭素、四塩化炭素、氷

酢酸、アセトンなどの溶媒に可溶

保管条件 : 室温、遮光条件下で気密容器に保管 (SOP NO. STR-0001)

保管場所 : 日本バイオアッセイ研究センター被験物質保管場所

曝露方法、曝露期間、曝露時間及び曝露濃度の設定

被験物質の曝露は、吸入チャンバー内に収容した動物に被験物質混合空気を全身曝露する吸入曝露と被験物質混合飲水の自由摂取による経口曝露を組み合わせた複数経路による複数媒体曝露とした。

吸入曝露は、動物を収容した吸入チャンバー内に設定濃度 (ppm:v/v) に調整したベンゼンを含む空気を送り込み、動物に全身曝露した。経口曝露は、設定濃度 (ppm:wt/wt) に希釈調製したベンゼン混合飲水を加圧式自動給水装置にて動物に自由摂取させることにより行った。ただし、吸入対照群には、新鮮空気のみを全身曝露し、また、経口対照群には、脱イオン水のみを自由摂取させた。

曝露期間は、吸入曝露は、群構成日の翌日から解剖日前日まで (祝祭日をのぞく 19 回 ; 1 週 5 日、1 日 6 時間) とし、また、経口曝露は群構成日から解剖日の解剖直前まで (29 日間連続) とした。

¹ 既存化学物質安全性 (ハザード) 評価シート. 1997. (財) 化学物質評価研究機構.
(インターネット検索). http://qsar.cerij.or.jp/SHEET/F96_01.pdf [アクセス日. 2004 年 1 月 5 日].

吸入曝露濃度は、600 ppm、300 ppm、0 ppm の 3 段階、経口曝露濃度は 500 ppm、250 ppm、0 ppm の 3 段階とし、合わせて 9 段階の曝露濃度を設定した。

曝露方法、曝露期間、曝露時間及び曝露濃度の設定理由は、次のとおりである。曝露方法は、生活環境における化学物質の曝露形態に近いと考えられる全身曝露による吸入曝露と飲水自由摂取による経口曝露を組み合わせた複数媒体曝露とした。曝露期間は、がん原性試験の曝露濃度を決定するための予備的な調査として、28 日間とした。吸入曝露の曝露時間は、OECD 化学品テストガイドライン 412²に従い、1 日 6 時間とし、経口曝露は同ガイドライン 407³に従い 24 時間とした。曝露濃度は、ラットにベンゼンを 1、10、30、300 ppm の濃度で 6 時間 / 日、5 日 / 週、13 週間に亘り曝露した試験では、300 ppm 群で白血球の減少及び骨髄細胞の減少が報告⁴されている。この試験とくらべて実施予定の試験期間は、28 日間と短期間であるため、最高用量を 300 ppm とした場合、動物にほとんど影響を及ぼさないことも考えられるため、高用量を 600 ppm とし、低用量を 300 ppm とした。経口曝露の濃度は、経口曝露のデータがないため、10 日間の予備試験を実施し、その結果をもとに決定した。すなわち、予備試験ではベンゼンを飲水に 50、250、500 ppm (ベンゼンの水への溶解度が 700 mg/L であることにより、試験実施可能な 500 ppm を最高用量とした)の濃度で混合し、10 日間、動物に自由摂取させた。その結果は、500 ppm 群に僅かな体重増加抑制が認められたのみであった。この予備試験結果を元に、本試験での経口曝露高用量を 500 ppm とし、この値の 1/2 の 250 ppm を低用量に設定した。

被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質供給装置 (柴田科学株式会社 特注) の発生容器内のベンゼン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。このベンゼン蒸気を清浄空気 (搬送空気) と混合しながら一定温度に冷却し、次に再加温し、一定濃度にした後、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ベンゼン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、ベンゼンの吸入チャンバーへの供給量を調節した。

吸入チャンバー内被験物質の濃度測定

吸入チャンバー内のベンゼンの濃度は、自動サンプリング装置付のガスクロマトグラフ (Shimadzu GC-14B) により、曝露開始前から曝露終了後まで 15 分毎に測定した。

被験物質混合飲水の調製方法

加圧式給水タンク内に設定量の脱イオン水とベンゼンを加え、密閉後、ボールミルポット回転台で回転混合し、各設定濃度の被験物質混合飲水を調製した。なお、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。

² Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (1981) OECD Guideline for Testing of Chemicals 413; Subchronic Inhalation Toxicity : 90 day Study. OECD, Paris

³ Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (1995) OECD Guideline for Testing of Chemicals 407; Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. OECD, Paris

⁴ Ward C. O. et al. 1985. Subchronic inhalation toxicity of Benzene in rats and mice Am J Ind Med. 7. 457-473.

被験物質混合飲水中の被験物質の濃度測定

各設定濃度に調製した被験物質混合飲水中の被験物質の濃度を初回調製時にヘッドスペース(Hewlett Packard 7694) - ガスクロマトグラフ(Hewlett Packard 5890A)を用いて分析し、設定濃度に調製されていることを確認した。なお、被験物質混合飲水中の被験物質の安定性は、本試験に先だって、500 ppm と 50 ppm の被験物質混合飲水について、室温保存の 10 日間における安定性をヘッドスペース(Hewlett Packard 7694) - ガスクロマトグラフ(Hewlett Packard 5890A)を用いて分析し、安定であることを確認した。

2) 試験動物

試験には、F344/DuCrj ラット(SPF)雄を使用した。動物は、日本チャールス・リバー((株)厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795)より4週齢で導入し、一週間の検疫および一週間の馴化後、一般状態の観察及び体重測定から健康であると判断した動物について、適正層別方式(群間の体重の偏りを小さくする方法)⁵により群分けし、試験に使用した。

動物の飼育環境条件及び使用する動物ケージは下記表のとおりとした。

【動物の飼育環境条件及び使用した動物ケージ】

	検疫室	吸入試験室	吸入チャンバー内	
			馴化期間	曝露期間
温度	23 ± 2	21 ± 2	20 ~ 24	
湿度	55 ± 15%	55 ± 15%	30 ~ 70%	
明暗サイクル	12 時間点灯 (8 : 00 ~ 20 : 00) / 12 時間消灯 (20 : 00 ~ 8 : 00)			
換気回数	15 ~ 17 回 / 時		12 ± 1 回 / 時	
圧力	-	-	0 ~ -15 × 10Pa	
ケージへの動物の収容方法	単飼	-	単飼	単飼
ケージの材質・形状	ステンレス製 2 連網ケージ	-	ステンレス製 5 連網ケージ	ステンレス製 5 連網ケージ
ケージ寸法：1 匹当り (mm)	W170 D294 H176	-	W150 D216 H176	W150 D216 H176

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)千葉工場(千葉県千葉市美浜区新港 8-2)の CRF-1 固型飼料(30KGy- 線照射滅菌飼料)を固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖日前日の夕方からは絶食した。

飲水は、検疫及び馴化期間は市水(秦野市水道局供給)をフィルターろ過し、紫外線照射した飲料水を自動給水装置により給水し、自由摂取させた。曝露期間は、脱イオン水で所定の濃度に調製した被験物質混合飲水を加圧式自動給水装置により自由摂取させた。

⁵ 阿部正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療 14: 7285-7302.

3) 試験の群構成および使用動物数

群の構成は、対照群 1 群、経口曝露群 2 群、吸入曝露群 3 群および経口と吸入を組み合わせた複数媒体曝露群 6 群を設け、全群で 9 群とし、各群ともに動物は 5 匹の雄性ラットを割り当てた。また、各群の曝露濃度、群名称(群番号)、使用動物数及び動物番号は下表のとおりとした。

【 各群の曝露濃度、群名称、使用動物数(動物番号) 】

曝露濃度		吸入曝露 (ppm)		
		0	300	600
経口 暴露 (ppm)	0	対照群 (吸入 0+経口 0 群) 5 匹 (1001-1005)	吸入 300 +経口 0 群 5 匹 (1301-1305)	吸入 600 +経口 0 群 5 匹 (1601-1605)
	250	吸入 0 +経口 250 群 5 匹 (1101-1105)	吸入 300 +経口 250 群 5 匹 (1401-1405)	吸入 600 +経口 250 群 5 匹 (1701-1705)
	500	吸入 0 +経口 1600 群 5 匹 (1201-1205)	吸入 300 +経口 500 群 5 匹 (1501-1505)	吸入 600 +経口 500 群 5 匹 (1801-1805)

4) 観察・検査項目及び方法

動物の生死及び一般状態の観察

検疫及び馴化期間は、全動物について、生死及び瀕死の確認を毎日 1 回、一般状態の詳細な観察は検疫開始日(導入時)、馴化開始日及び馴化最終日(群構成時)に行った。また、曝露期間は、全動物について、曝露開始前に生死及び瀕死の確認を毎日 1 回、一般状態の詳細な観察は週 1 回行った。

体重測定

検疫及び馴化期間は、全動物について、検疫開始日 (導入時) 及び馴化開始日及び馴化最終日(群構成時)に体重を測定した。また、曝露期間は、全動物について、毎週 1 回、曝露開始前に体重を測定した。なお、定期解剖動物の搬出時にも測定を行った。

摂餌量測定

全動物について、毎週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から一日当たりの摂餌量 (給餌量 - 残餌量) ÷ 給餌日数) を算出した。

摂水量の測定

全群について、毎週 1 回、給水量及び残水量を測定し、その値から一日当たりの摂水量 (給水量 - 残水量) ÷ 給水日数) を算出した。

被験物質摂取量

摂水量及び設定濃度より、動物体重 1 kg 当りの 1 日の経口暴露による被験物質摂取量 (g/kg/day) を算出した。また、呼吸量及び設定濃度より算出した、被験物質摂取量を加えた複数媒体暴露による動物体重 1 kg 当りの 1 日の吸入暴露による被験物質摂取量 (g/kg/day) を合わせて算出した。

尿検査

曝露期間後期まで生存し、採尿可能であった動物について、新鮮尿を採取し、尿試験紙 (マルティ ステックス、バイエル社製) を用いて、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血およびウロビリノーゲンについて検査を行った。

血液学的検査

定期解剖時に生存し、採血可能であった動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採取し、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 (M C V)、平均赤血球ヘモグロビン量 (M C H)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (M C H C)、血小板数、網赤血球比、白血球数および白血球百分率を検査した。検査方法等は下表に示した。なお、検査対象動物は、解剖日前日夕方より絶食させた。

血液生化学的検査

定期解剖時に生存し、採血可能であった動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より、ヘパリンリチウム入り採血管に採血し、遠心分離して得られた血漿について、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、GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、CPK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウムおよび無機リンを検査した。検査方法等は次頁の表に示した。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食させた。

病理学的検査

イ) 剖検

全動物について肉眼的観察により、剖検を行った。

ロ) 臓器重量

全解剖動物について、胸腺、副腎、精巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓および脳の湿重量 (実重量) を測定した。また、これらの湿重量と解剖時体重 (搬出時体重) をもとに臓器重量体重比 (体重に対する百分率) を算出した。

ハ) 臓器の採取保存

全解剖動物について、皮膚、鼻腔、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) およびその他 (肉眼的に変化のみられた器官、組織) を摘出し、10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。

二) 病理組織学的検査

全解剖動物について、鼻腔 (3 箇所を横断)、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、脾臓、心臓、食道、胃、小腸 (十二指腸を含む)、大腸、肝臓、腎臓、副腎、その他 (肉眼的に変化のみられた器官、組織または臓器重量測定などから標的器官と認められた器官、組織) を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡により検査した。

【血液学的検査および血液生化学的検査の方法・単位・小数点以下桁数】

項目	検査方法	単位	小数点以下桁数
血液学的検査			
赤血球数(RBC)	光学的散乱法 ¹⁾	× 10 ⁶ /μL	2
ヘモグロビン濃度(Hgb)	シアメトヘム比 ¹⁾	g/dL	1
ヘマトクリット値(Hct)	計算法(RBC × MCV/10) ¹⁾	%	1
平均赤血球容積(MCV)	光学的散乱法 ¹⁾	fL	1
平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)	計算法(Hgb/RBC × 10) ¹⁾	pg	1
平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)	計算法(Hgb/Hct × 100) ¹⁾	g/dL	1
血小板数	光学的散乱法 ¹⁾	× 10 ³ /μL	0
網赤血球比	光学的散乱法 ¹⁾	%	1
白血球数	光学的散乱法 ¹⁾	× 10 ³ /μL	2
白血球分類	パターン認識法 ²⁾ (ライト染色)	%	0
血液生化学的検査			
総蛋白(TP)	ビュレット法 ³⁾	g/dL	1
アルブミン(Alb)	BCG法 ³⁾	g/dL	1
A/G比	計算法(Alb/(TP-Alb)) ³⁾	-	1
総ビリルビン	アルカリピロリチン法 ³⁾	mg/dL	2
グルコース	GlcK・G-6-PDH法 ³⁾	mg/dL	0
総コレステロール	CE・COD・POD法 ³⁾	mg/dL	0
トリグリセライド	LPL・GK・GPO・POD法 ³⁾	mg/dL	0
リン脂質	PLD・ChOD・POD法 ³⁾	mg/dL	0
GOT	JSCC法 ³⁾	IU/L	0
GPT	JSCC法 ³⁾	IU/L	0
LDH	SFBC法 ³⁾	IU/L	0
ALP	GSCC法 ³⁾	IU/L	0
- GTP	JSCC法 ³⁾	IU/L	0
CPK	JSCC法 ³⁾	IU/L	0
尿素窒素	ウレアゼ・GLDH法 ³⁾	mg/dL	1
クレアチニン	Jaffe法 ³⁾	mg/dL	1
ナトリウム	イオン選択電極法 ³⁾	mEq/L	0
カリウム	イオン選択電極法 ³⁾	mEq/L	1
クロール	イオン選択電極法 ³⁾	mEq/L	0
カルシウム	OCPC法 ³⁾	mg/dL	1
無機リン	PNP・XOD・POD法 ³⁾	mg/dL	1

1) 総合血液学検査装置 (ADVIA 120 : パイエル社) により測定した。

2) 血液細胞自動分類装置 (MICROX HEG-120NA : オムロン(株)) により測定した。

3) 自動分析装置 (日立 7070 : (株)日立製作所) により測定した。

5) 数値の取り扱いと表示および統計方法

数値の取り扱いと表示

各数値データは計測機器の精度に合わせて表示した。

チャンパー内の被験物質濃度は、ppm を単位として、小数点以下第 3 位まで計測し、小数点以下第 2 位を四捨五入し、小数点以下第 1 位までを表示した。

体重は、g を単位とし、整数値の 1 の位まで計測し、表示した。

摂餌量は、g を単位とし、動物個体毎に給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで計測し、給餌量値から残餌量値を減じた値を給餌期間の日数で除して 1 日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

摂水量は、g を単位とし、群毎に給水量および残水量を整数値で計測し、給水量値から残水量値を減じた値を延べ匹数 (給水日数 × 群動物数) で除して 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。

経口曝露による被験物質の体重 kg 当りの 1 日摂取量は、群毎に摂水量値に被験物質の
設定濃度を乗じた値をさらに体重で除して算出し、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。

臓器実重量は、g を単位とし、小数点以下第 3 位まで計測し、表示した。

臓器重量体重比は、臓器実重量値を解剖時体重（搬出時体重）で除した値にさらに 100
を乗じて算出し、パーセントを単位として、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。

血液学的検査は前頁に示した表中の単位と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、上記に示した桁数と同桁数になるように
四捨五入を行い表示した。

統計方法

本試験で得られた測定値は、原則として、対照群を基準群として、まず Bartlett 法に
より等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群
間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、
分散の等しくない場合には、各群を通して測定値を順位化して Kruskal-Wallis の順位検
定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett（型）の多重比較を行った。

なお、予備検定については 95% の信頼限界で、最終検定については 95% 及び 99% の信
頼限界で両側検定を行った。

【結 果】

1) 生死状況

全ての群に、曝露期間を通して死亡は認められなかった。

2) 一般状態

曝露の影響と認められる所見はなかった。

3) 体重 (表 1)

曝露 4 週目に複数媒体曝露の吸入 600 ppm+経口 500 ppm で体重増加の抑制がみられた。

4) 摂水量 (表 2)

吸入曝露、経口曝露とも低濃度群では対照群より高値を示したが、吸入曝露の 600 ppm
群(1, 2 週目)、経口曝露の 500 ppm 群及び複数媒体曝露群では濃度に応じて低値を示した。

5) 摂餌量 (表 3)

曝露 3、4 週目に複数媒体曝露の吸入 600 ppm+経口 500 ppm 群で体重増加の抑制がみ
られた。

6) 被験物質摂取量 (表 4)

経口曝露による被験物質の摂取量は、設定濃度に対応していたが、吸入曝露の濃度に従
って抑制傾向がみられた。ベンゼンの水への溶解度のため経口曝露高濃度群は 500 ppm で
あり、その被験物質摂取量は吸入曝露 300 ppm の 36% となった。

7) 血液学的検査 (表 5)

白血球数が吸入単独曝露の吸入 600 ppm+経口 0 ppm 群と複数媒体曝露の吸入 600 ppm+経口 500 ppm 群で減少した。

8) 血液生化学的検査 (表 6)

ALP が吸入単独曝露の吸入 600 ppm+経口 0 ppm 群と複数媒体曝露のすべての群(吸入 300 ppm+経口 250 ppm 群、吸入 300 ppm+経口 500 ppm 群、吸入 600 ppm+経口 250 ppm 群、吸入 600 ppm+経口 500 ppm 群)で低下した。尿素窒素が複数媒体曝露の吸入 600 ppm+経口 500 ppm 群で増加した。

9) 尿検査 (表 7)

ケトン体の陽性度が複数媒体曝露の吸入 300 ppm+経口 500 ppm 群と吸入 600 ppm+経口 500 ppm 群で増加した。その他、蛋白の陽性度が吸入単独曝露の吸入 300 ppm+経口 0 ppm と経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 250 ppm 群で低下した。

10) 剖検

曝露の影響と認められる所見はなかった。

11) 臓器重量 (表 8)

脾臓の実重量の低値が吸入単独曝露の吸入 300 ppm+経口 0 ppm 群、吸入 600 ppm+経口 0 ppm 群、経口単独曝露の吸入 0 ppm+経口 500 ppm 群、複数媒体曝露のすべての群(吸入 300 ppm+経口 250 ppm 群、吸入 300 ppm+経口 500 ppm 群、吸入 600 ppm+経口 250 ppm 群、吸入 600 ppm+経口 500 ppm 群)でみられ、体重比でも低値が複数媒体曝露のすべての群(吸入 300 ppm+経口 250 ppm 群、吸入 300 ppm+経口 500 ppm 群、吸入 600 ppm+経口 250 ppm 群、吸入 600 ppm+経口 500 ppm 群)でみられた。

12) 病理組織学的検査

曝露の影響と認められる所見はなかった。

【考 察】

吸入曝露、経口曝露とも低濃度群では対照群より高値を示したが、吸入単独曝露と経口単独曝露の高用量群及び複数媒体曝露群では濃度に応じて低値を示した。

白血球数が吸入単独曝露と複数媒体曝露の最高用量群で減少した。

ALP が吸入単独曝露の最高用量群と複数媒体曝露のすべての群で低下した。尿素窒素が複数媒体曝露の最高用量群で増加した。

ケトン体の陽性度が複数媒体曝露の経口高用量群で増加した。その他、蛋白の陽性度の低下が一部の群でみられた。

脾臓の実重量の低値が経口単独曝露の低濃度群を除くすべての群でみられ、体重比でも低値が複数媒体曝露のすべての群でみられた。被験物質摂取量で比較すると、経口曝露の影響が大きくみられた。その他解剖時体重の低値に伴う実重量の低値と、体重比の高値が認められる臓器がみられた。

試みとして、前述の試験結果において、対照群（経口 0ppm+吸入 0ppm 群）と各群間、吸入各濃度群とその経口対照群（経口 0ppm 群）間および経口各濃度群とその吸入対照群（吸入 0ppm 群）間で行ったダネット検定において、統計的に有意な変化が見られた測定・検査項目について、対照群（経口 0ppm+吸入 0ppm 群）と比較した各群の増減率（対照群値と各群値との差、すなわち増加値あるいは減少値の対照群値に対するそれらの百分率；増減率（%）= 各群平均値 - 対照群平均値）÷ 対照群平均値 × 100）を算出し、それらを 3 D グラフに表した（図 1 ~ 4 参照）。

ベンゼンの顕著な複数媒体曝露影響（吸入曝露と経口曝露の相加あるいはそれ以上の影響）は、全ての項目で認められなかった。また血液学的パラメーター（図 2 参照）、血液生化学的パラメーター（図 3 参照）および臓器重量（図 4 参照）の多くの項目については主として吸入曝露の影響を大きく受けていることが伺われた。

その他、LDH および尿素窒素は、視覚的に複数媒体影響を伺わせる変化を示したが、相加的影響とするにはその増減率の群間差は小さかった。

予定しているがん原性試験の適正曝露濃度の設定の観点より、図 1 を見てみると、投与後 4 週の吸入 600+経口 500ppm 群での体重抑制率は 10% になり、がん原性試験ではこの濃度付近を最高投与濃度とすることを提案する。

【まとめ】

ベンゼンの 28 日間に亘る吸入曝露と経口（飲水）曝露を組合わせた曝露（複数媒体曝露）により、血液学的検査、血液生化学的検査および臓器重量に毒性影響がみられたが、その影響は主として吸入曝露による影響が大きく、複数媒体影響を受けた項目は見出せなかった。

予定しているがん原性試験の最高曝露濃度は、投与後 4 週の吸入 600+経口 500ppm 群での体重抑制率が 10% であることより、この濃度付近が適切と考えられた。

2. 複数媒体影響の発生メカニズムに関する研究

(1) *N,N*-ジメチルホルムアミド

1. 試験目的

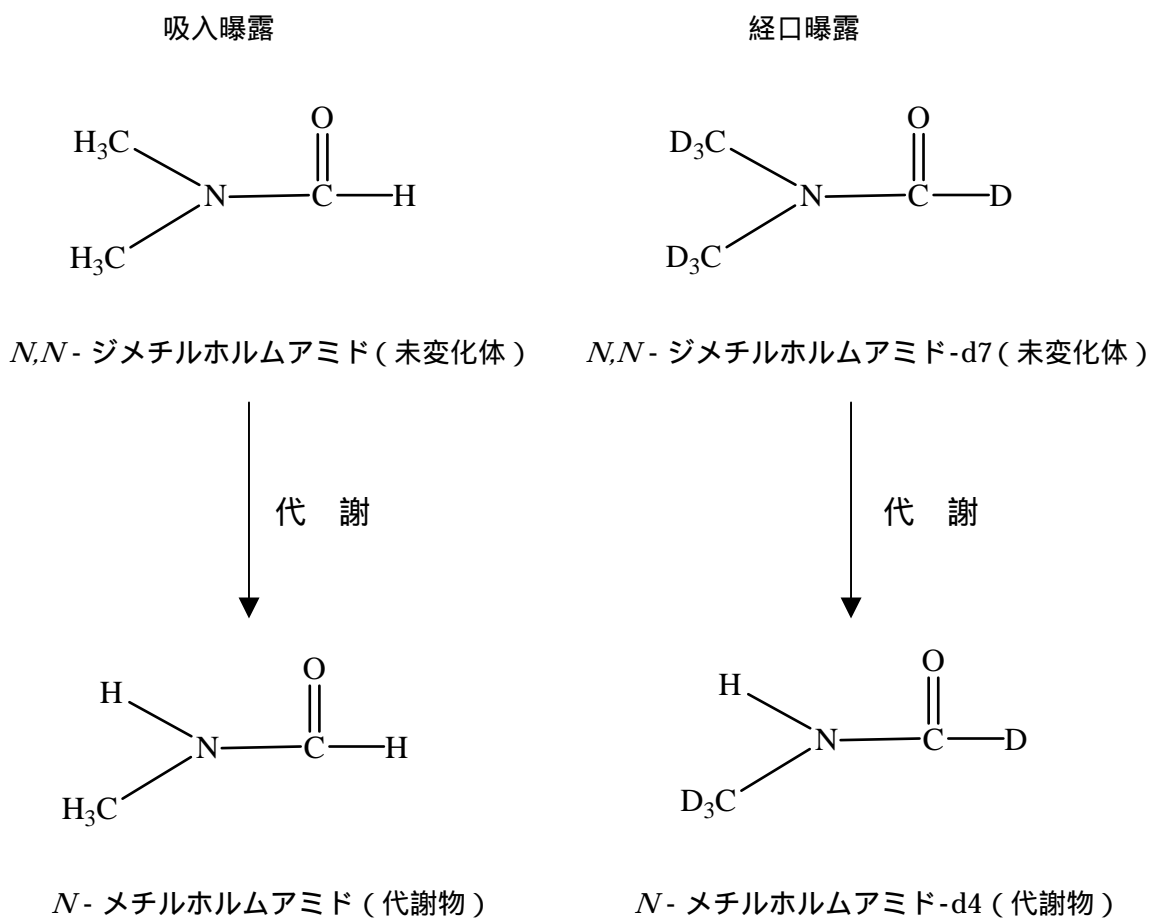
複数媒体曝露による生体影響のメカニズムを明らかにすることを目的として、ラットに *N,N*-ジメチルホルムアミドを吸入曝露及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 を経口曝露し、血液及び組織中の未変化体・代謝物の濃度を経時的に測定した。

2. 試験方法

2.1 被験物質

吸入曝露に用いた被験物質は(株)和光純薬工業製の *N,N*-ジメチルホルムアミド(純度 99.5%) を使用した。

経口曝露に用いた被験物質は Cambridge Isotope Laboratories, Inc.製の *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 (純度 98%以上) を使用した。



2.2 曝露方法

2.2.1 吸入曝露

被験物質の曝露はラットに吸入曝露装置（（株）柴田科学製）により吸入曝露を行った。吸入曝露装置の構図を Figure 1 に示した。被験物質供給装置（（株）柴田科学製）の発生器内の *N,N*-ジメチルホルムアミドを一定温度下で空気のバブリングにより蒸発させ、空気と混合して、吸入曝露装置内に送気し、ラットに吸入曝露による経気道曝露を行った。曝露期間は 1 日最高 6 時間 / 1 回曝露し、曝露濃度は 400ppm の曝露濃度を設定した。曝露中の吸入曝露装置内空気を曝露開始 10、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 60 、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 経口曝露

被験物質の曝露はラットに経口曝露（単回曝露）を行った。

曝露用量は 300mg/kg・BW とした。動物に与える曝露量は *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 を 30mg/mL になるようにコ - ン油に溶解しラットに体重 1kg 当たり 10mL 強制経口した。

2.2.3 複数媒体曝露

上記の吸入曝露と経口曝露を同条件下において、同時に曝露した。

2.3 使用動物

Crj:CD(SD)IGS の SPF 雄（10 週齢）ラット（日本チャールス・リバー厚木飼育センター）を使用した。

2.4 群の構成及び各群の使用動物数

群の構成は血液中濃度測定群と組織中濃度測定群の2群に分けた。更に血液中濃度測定群と組織中濃度測定群は対照群と単独吸入曝露群、単独経口曝露群及び複数媒体曝露群の4群の合計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	3匹	3匹
単独吸入曝露群	B-I	T-I
使用動物数	3匹	18匹
単独経口曝露群	B-G	T-G
使用動物数	3匹	18匹
複数媒体曝露群	B-G+I	T-G+I
使用動物数	3匹	18匹

* 群名称は B：血液中濃度測定群、T：組織中濃度測定群、
C：対照群、I：単独吸入曝露群、G：単独経口曝露群、
G+I：複数媒体曝露群

2.5 *N,N*-ジメチルホルムアミド(未変化体)、*N*-メチルホルムアミド(代謝物)及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7(未変化体)、*N*-メチルホルムアミド-d4(代謝物)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 120、240、1080 分で、B-G 群は経口曝露後 30、60、180、360、480、600、1440 分で、B-G+I 群は吸入曝露開始 30、60、180、360、吸入曝露終了後 120、240、1080 分(経口曝露後 30、60、180、360、480、600、1440 分)で採血した。採血した血液は直ちに前処理を行い、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、肝臓、腎臓を採取した。T-C 群は動物搬出後、T-I 群は吸入曝露開始 60、180、360、吸入曝露終了後 120、240、1080 分で、T-G 群は経口曝露後 60、180、360、480、600、1440 分で、T-G+I 群は吸入曝露開始 60、180、360、吸入曝露終了後 120、240、1080 分(経口曝露後 60、180、360、

480、600、1440分)で採取した。採取した組織は直ちに前処理を行い、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 GC/MS 分析条件

GC/MS (ヒューレットパッカード社 HP5989B) を用いて *N,N*-ジメチルホルムアミド (未変化体)、*N*-メチルホルムアミド (代謝物) 及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-*d*7 (未変化体)、*N*-メチルホルムアミド-*d*4 (代謝物) の血液及び組織中濃度を測定した。

GC/MS の分析条件として、カラムは J&W DB-WAX (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 (1min) (10 /min) 220、流量は 1mL/min、注入口温度は 250、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 とした。なお、血液及び組織中濃度の定量は *N,N*-ジメチルホルムアミド (未変化体) の分子イオンを示す 73m/z、*N*-メチルホルムアミド (代謝物) の分子イオンを示す 59m/z 及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-*d*7 (未変化体) の分子イオンを示す 80m/z、*N*-メチルホルムアミド-*d*4 (代謝物) の分子イオンを示す 63m/z のそれぞれのピークによる SIM 法により実施した。

3 . 結果

3 . 1 生死状況

全動物とも、曝露の影響による死亡はみられなかった。

3 . 2 体重

曝露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。

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 400 ± 12 ppm であり、被験物質濃度は設定濃度 (400ppm) にきわめて近い値でラットに曝露されたことを確認した。

3 . 4 *N,N*-ジメチルホルムアミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 の血液中濃度測定結果

各群における *N,N*-ジメチルホルムアミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 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、*N,N*-ジメチルホルムアミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 を曝露していない対照群のラットの血液中では *N,N*-ジメチルホルムアミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 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 分からラットの血液中に *N,N*-ジメチルホルムアミドが認められ、吸入曝露中は曝露時間の経過に伴って血液中濃度が増加した。更に吸入曝露終了後 120 分まで血液中濃度が増加した後、吸入曝露終了後 1080 分まで血液中の *N,N*-ジメチルホルムアミドの濃度が減衰した。

3 . 4 . 2 単独経口曝露群

Figure 2-2 に示したように、経口曝露後 30 分からラットの血液中に *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 が認められ、経口曝露後 180 ~ 600 分 (最高濃度 : 経口曝露後 360 分) で、血液中濃度は高濃度で推移した後、経口曝露後 1440 分まで血液中の *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 の濃度が減衰した。

3.4.3 複数媒体曝露群

Figure 2-3 に示したように、

<吸入曝露由来> 吸入曝露開始 30 分からラットの血液中に *N,N*-ジメチルホルムアミドが認められ、吸入曝露中は曝露時間の経過に伴って血液中濃度が増加した。更に吸入曝露終了後 120 分まで血液中濃度が増加した後、吸入曝露終了後 1080 分まで血液中の *N,N*-ジメチルホルムアミドの濃度が減衰した。

<経口曝露由来> 経口曝露後 30 分からラットの血液中に *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 が認められ、経口曝露後 30~1440 分（最高濃度：経口曝露後 480 分）で、血液中濃度は高濃度で推移した。

3.4.4 血液中濃度の加算値及び加算値の比較

Figure 2-4 に血液中濃度の加算値（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群及び複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来））を示した。各採血時間とも単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度の加算値が高かった。また、Table 2 に血液中濃度の加算値の比率（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群を 1 とした時の複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来）の比率）を示した。特に採血時間 30、1440 分において、単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度の加算値の比率が高かった。

3.4.5 血液中濃度のまとめ

単独吸入曝露群と複数媒体曝露群の吸入曝露由来における血液中濃度の経時的変化は吸入曝露中及び吸入曝露終了後 240 分までほぼ同じ推移であったが、吸入曝露終了後 1080 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度が高かった。単独経口曝露群と複数媒体曝露群の経口曝露由来における血液中濃度の経時的変化は特に経口曝露後 30、1440 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度が高かった。

3.5 *N*-メチルホルムアミド及び *N*-メチルホルムアミド-d4 の血液中濃度測定結果

各群における *N*-メチルホルムアミド及び *N*-メチルホルムアミド-d4 の血液中濃度測定結果を Figure 3-1~3-4 及び Table 3 に示した。なお、*N,N*-ジメチルホルムアミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 を曝露していない対照群のラットの血液中では *N*-メチルホルムアミド及び *N*-メチルホルムアミド-d4 は認められなかった。

3.5.1 単独吸入曝露群

Figure 3-1 に示したように、吸入曝露開始 30 分からラットの血液中に *N*-メチルホルムアミドが認められ、吸入曝露中は曝露時間の経過に伴って血液中濃度が増加した。更に吸入曝露終了後 1080 分まで血液中の *N*-メチルホルムアミドの濃度が増加した。

3.5.2 単独経口曝露群

Figure 3-2 に示したように、経口曝露後 30、60 分ではラットの血液中に *N*-メチルホルムアミド-d4 が認められなかったが、経口曝露後 180 分からラットの血液中に *N*-メチルホルムアミド-d4 が認められ、以後、血液中濃度が増加した。

3.5.3 複数媒体曝露群

Figure 3-3 に示したように、

<吸入曝露由来> 吸入曝露開始 30、60 分ではラットの血液中に *N*-メチルホルムアミドが認められなかったが、吸入曝露開始 180 分からラットの血液中に *N*-メチルホルムアミドが認められた後、吸入曝露中は曝露時間の経過に伴って血液中濃度が増加した。更に吸入曝露終了後 1080 分まで血液中の *N*-メチルホルムアミドの濃度が増加した。

<経口曝露由来> 経口曝露後 30 分ではラットの血液中に *N*-メチルホルムアミド-d4 が認められなかったが、経口曝露後 60 分からラットの血液中に *N*-メチルホルムアミド-d4 が認められ、以後、血液中濃度が増加した。

3.5.4 血液中濃度の加算値及び加算値の比率

Figure 3-4 に血液中濃度の加算値（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群及び複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来））を示した。各採血時間とも単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度の加算値が低かった。また、Table 3 に血液中濃度の加算値の比率（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群を 1 とした時の複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来）の比率）を示した。各採血時間とも単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度の加算値の比率が高かった。

3.5.5 血液中濃度のまとめ

単独吸入曝露群と複数媒体曝露群の吸入曝露由来における血液中濃度の経時的変化は各採血時間とも単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度が低かった。同様に単独経口曝露群と複数媒体曝露群の経口曝露由来における血液中濃

度の経時的变化は各採血時間とも単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度が低かった。

3.6 *N,N*-ジメチルホルムアミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 の組織中濃度測定結果

各群における *N,N*-ジメチルホルムアミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 の組織中濃度測定結果を Figure 4-1 ~ 4-4 及び Table 4 に示した。なお、*N,N*-ジメチルホルムアミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 を曝露していない対照群のラットの組織中では *N,N*-ジメチルホルムアミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 は認められなかった。

3.6.1 単独吸入曝露群

Figure 4-1 に単独吸入曝露群の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的变化

吸入曝露開始 60 分からラットの各組織（肝臓、腎臓）中に *N,N*-ジメチルホルムアミドが認められ、吸入曝露開始 60、180 分での各組織中濃度はほぼ同じ濃度であったが、吸入曝露開始 360 分では各組織中濃度は増加した。吸入曝露終了後は各組織中濃度が減衰したが、吸入曝露終了後 120、240 分での各組織中濃度はほぼ同じ濃度であり、吸入曝露終了後 240 分まで各組織中の *N,N*-ジメチルホルムアミドが認められた。

(イ) 組織分布

各組織（肝臓、腎臓）中の濃度は各採取時間において、ほぼ同じ濃度で分布した。

3.6.2 単独経口曝露群

Figure 4-2 に単独経口曝露群の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的变化

経口曝露後 60 分からラットの各組織（肝臓、腎臓）中に *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 が認められ、経口曝露後 60 ~ 600 分（最高濃度：肝臓-経口曝露後 600 分、腎臓-経口曝露後 180 分）で各組織中濃度は高濃度で推移した後、経口曝露後 1440 分まで各組織中の *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 の濃度が減衰した。

(イ) 組織分布

各組織（肝臓、腎臓）中の濃度は各採取時間において、ほぼ同じ濃度で分布した。

3.6.3 複数媒体曝露群

3.6.3.1 複数媒体曝露群の吸入曝露由来

Figure 4-3-1 に複数媒体曝露群の吸入曝露由来の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的变化

吸入曝露開始 60 分からラットの各組織（肝臓、腎臓）中に *N,N*-ジメチルホルムアミドが認められ、吸入曝露中の経過に伴って各組織中濃度が増加した。更に吸入曝露終了後 240 分まで各組織中濃度が増加した後、吸入曝露終了後 1080 分まで各組織中の *N,N*-ジメチルホルムアミドの濃度が減衰した。

(イ) 組織分布

各組織（肝臓、腎臓）中の濃度は各採取時間において、ほぼ同じ濃度で分布した。

3.6.3.2 複数媒体曝露群の経口曝露由来

Figure 4-3-2 に複数媒体曝露群の経口曝露由来の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的变化

経口曝露後 60 分からラットの各組織（肝臓、腎臓）中に *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 が認められ、経口曝露後 60～1440 分（最高濃度：肝臓-経口曝露後 600 分、腎臓-経口曝露後 480 分）で各組織中濃度は高濃度で推移した。

(イ) 組織分布

各組織（肝臓、腎臓）中の濃度は各採取時間において、ほぼ同じ濃度で分布した。

3.6.4 組織中濃度の加算値及び加算値の比率

Figure 4-4 に各組織中濃度の加算値（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群及び複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来））を示した。各組織の採取時間 60、180、360 分ではとも単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度の加算値が低く、採取時間 480 分では単独で曝露した群と複数媒体で曝露した群の加算値がほぼ同じで、採取時間 600、1440 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群

の加算値が高かった。また、Table 3 に各組織中濃度の加算値の比率（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群を 1 とした時の複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来）の比率）を示した。各組織の採取時間 60、180、360 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度の加算値の比率が低く、採取時間 480 分では単独で曝露した群と複数媒体で曝露した群の加算値の比率がほぼ同じで、採取時間 600、1440 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の加算値の比率が高かった。

3.6.5 組織中濃度のまとめ

単独吸入曝露群と複数媒体曝露群の吸入曝露由来における各組織中濃度の経時的変化は、吸入曝露中で吸入曝露開始 30、360 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の組織中濃度の加算値が低く、吸入曝露開始 180 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の組織中濃度の加算値が高かった。また、吸入曝露終了後で単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の各組織中濃度が高かった。単独経口曝露群と複数媒体曝露群における経口曝露由来の各組織中濃度の経時的変化は、経口曝露後 60～600 分では複数媒体で単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の組織中濃度の加算値が低く、経口曝露後 1440 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の各組織中濃度が高かった。

3.7 *N*-メチルホルムアミド及び *N*-メチルホルムアミド-d4 の組織中濃度測定結果

各群における *N*-ジメチルホルムアミド及び *N*-ジメチルホルムアミド-d4 の組織中濃度測定結果を Figure 5-1～5-4 及び Table 5 に示した。なお、*N,N*-ジメチルホルムアミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミド-d7 を曝露していない対照群のラットの組織中では *N*-メチルホルムアミド及び *N*-メチルホルムアミド-d4 は認められなかった。

3.7.1 単独吸入曝露群

Figure 5-1 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 60 分からラットの各組織（肝臓、腎臓）中に *N*-メチルホルムアミドが認められ、吸入曝露中の経過に伴って各組織中濃度が増加した。吸入曝露終了後は吸入曝露終了後 120 分では各組織中濃度が減衰したが、再度、吸入曝露終了後 240、1080 分では各組織中の *N*-メチルホルムアミドの濃度が増加した。

(イ) 組織分布

各組織（肝臓、腎臓）中の濃度は各採取時間において、ほぼ同じ濃度で分布した。

3.7.2 単独経口曝露群

Figure 5-2 に単独経口曝露群の組織中濃度を示した。

（ア）経時的変化

経口曝露後 60 分からラットの各組織（肝臓、腎臓）中に *N*-メチルホルムアミド-d4 が認められ、経口曝露後以降、各組織濃度が増加した。

（イ）組織分布

各組織（肝臓、腎臓）中の濃度は各採取時間において、ほぼ同じ濃度で分布した。

3.7.3 複数媒体曝露群

3.7.3.1 複数媒体曝露群の吸入曝露由来

Figure 5-3-1 に複数媒体曝露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 60 分ではラットの各組織（肝臓、腎臓）中に *N*-メチルホルムアミドが認められなかったが、吸入曝露開始 180 分からラットの各組織中に *N*-メチルホルムアミドが認められた後、吸入曝露中は曝露時間の経過に伴って各組織中濃度が増加した。更に吸入曝露終了後 1080 分まで各組織中の *N*-メチルホルムアミドが増加した。

（イ）組織分布

各組織（肝臓、腎臓）中の濃度は吸入曝露中及び吸入曝露終了後 240 分までほぼ同じ濃度で分布したが、吸入曝露終了後 1080 分では肝臓の組織中濃度に比べ腎臓の組織中濃度が高かった。

3.7.3.2 複数媒体曝露群の経口曝露由来

Figure 5-3-2 に複数媒体曝露群の経口曝露由来の組織中濃度を示した。

（ア）経時的変化

経口曝露後 60 分からラットの各組織（肝臓、腎臓）中に *N*-メチルホルムアミド-d4 が認められ、経口曝露後 600 分まで各組織中濃度の顕著な増加がみられなかったが、経口曝露後 1440 分では各組織中濃度は増加した。

（イ）組織分布

各組織（肝臓、腎臓）中の濃度は経口曝露後 600 分まではほぼ同じ濃度で分布したが、経口曝露後 1440 分では肝臓に比べ腎臓の組織中濃度が高かった。

3.7.4 組織中濃度の加算値及び加算値の比率

Figure 4-4 に各組織中濃度の加算値（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群及び複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来））を示した。肝臓は各採取時間とも単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の組織中濃度の加算値が低かった。腎臓は採取時間 60、180、360、480、600 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の組織中濃度の加算値が低く、採取時間 1440 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の加算値が高かった。また、Table 5 に各組織中濃度の加算値の比率（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群を 1 とした時の複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来）の比率）を示した。肝臓は各採取時間とも単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の組織中濃度の加算値の比率が低かった。腎臓は採取時間 60、180、360、480、600 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の組織中濃度の加算値の比率が低く、採取時間 1440 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の加算値の比率が高かった。

3.7.5 組織中濃度のまとめ

単独吸入曝露群と複数媒体曝露群の吸入曝露由来における各組織中濃度の経時的变化は肝臓では吸入曝露中において単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の組織中濃度が低く、吸入曝露終了後 120、240 分では組織中濃度はほぼ同じ濃度であったが、吸入曝露終了後 1080 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の組織中濃度が高かった。腎臓では吸入曝露中及び吸入曝露終了後 240 分まで単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の組織中濃度が低かったが、吸入曝露終了後 1080 分では単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の組織中濃度が高かった。単独経口曝露群と複数媒体曝露群の経口曝露由来における各組織中濃度の経時的变化は各組織において、単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の組織中濃度が低かった。

3.8 全体のまとめ

N,N-ジメチルホルムアミドについては、血液中未変化体濃度は、各採血時間とも単独経路曝露群の加算値（単独吸入曝露群値+単独経口曝露群値）に比べ複数媒体曝露群が高かった。一方、血液中代謝物（*N*-メチルホルムアミド）濃度は、各採血時

間とも単独経路曝露群の加算値に比べ複数媒体曝露群が低かった。また、組織中未変化体濃度は、肝臓および腎臓ともに採取期間後期（600 および 1440 分）において単独経路曝露群の加算値に比べ複数媒体曝露群が高かった。一方、組織中代謝物濃度は、腎臓でのみ最終採取時（1440 分）において単独経路曝露群の加算値に比べ複数媒体曝露群が高かった。従って、血液中および組織中の未変化体濃度に高い加算値がみられ、*N,N*-ジメチルホルムアミドの複数媒体影響の可能性が示唆された。

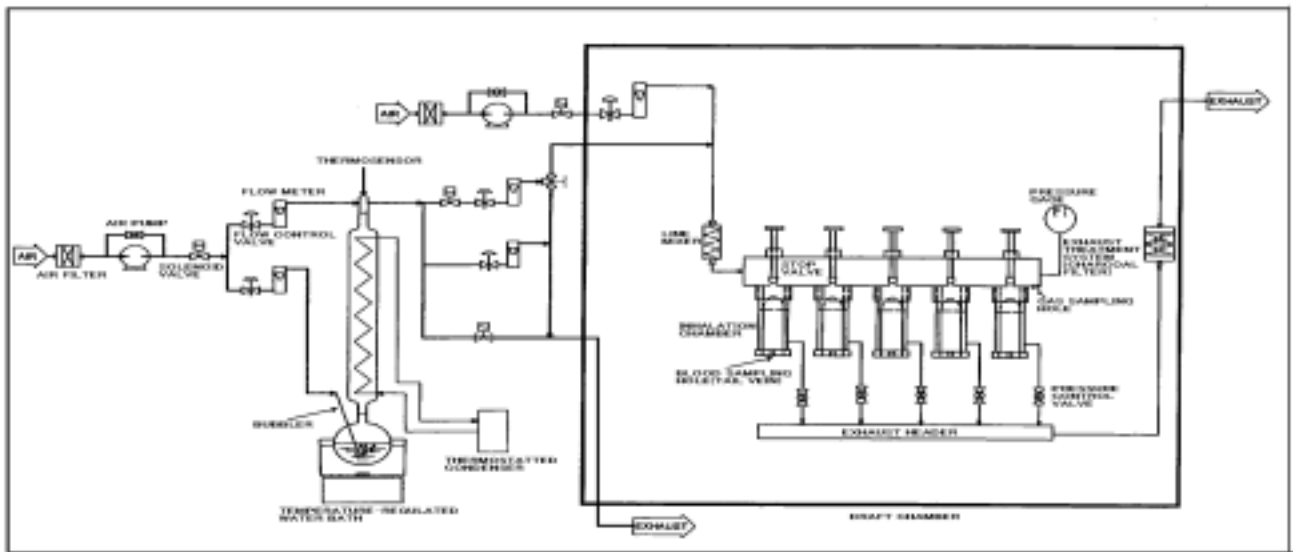


Figure 1. 吸入曝露装置

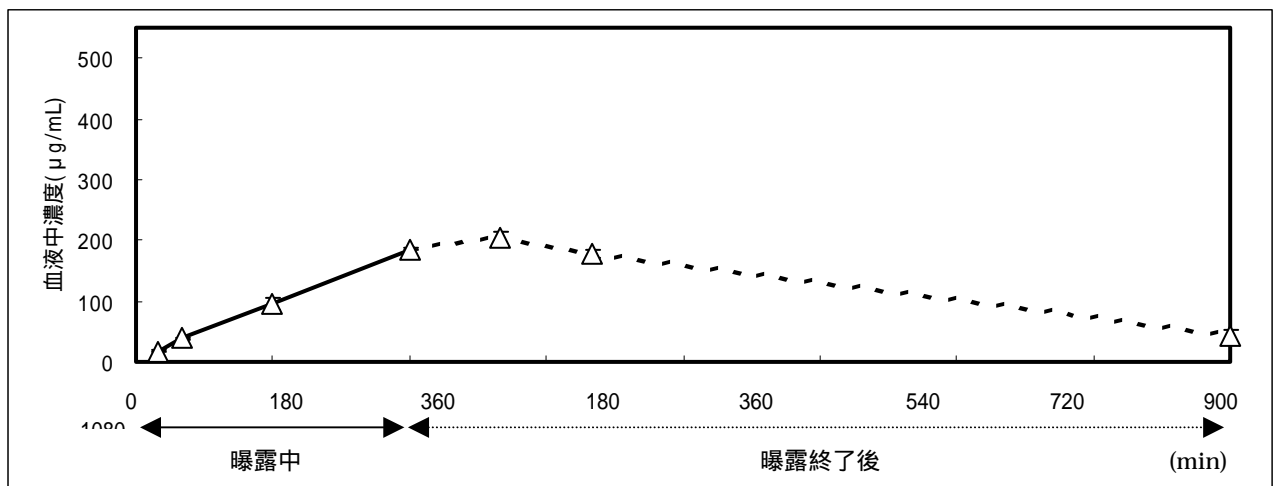


Figure 2-1. 単独吸入曝露群の血液中濃度（未変化体）

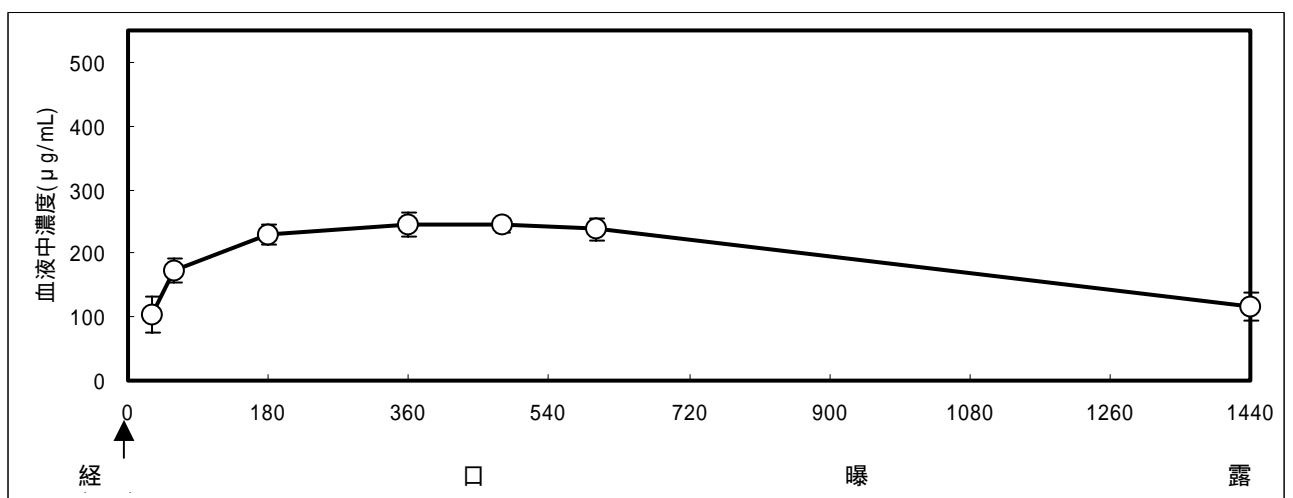


Figure 2-2. 単独経口曝露群の血液中濃度（未変化体）

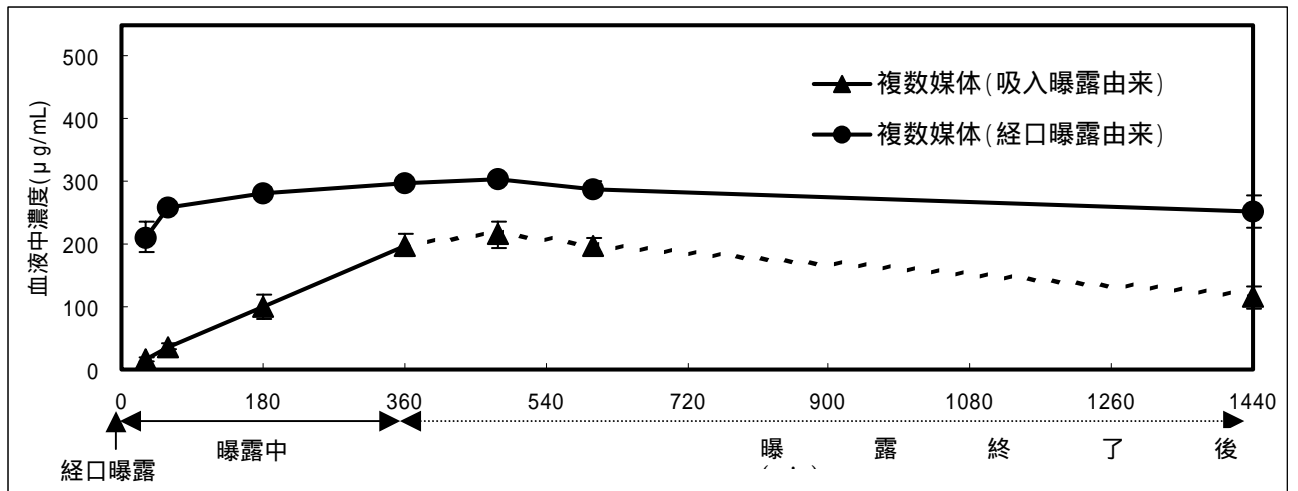


Figure 2-3. 複数媒体曝露群の血液中濃度 (未変化体)

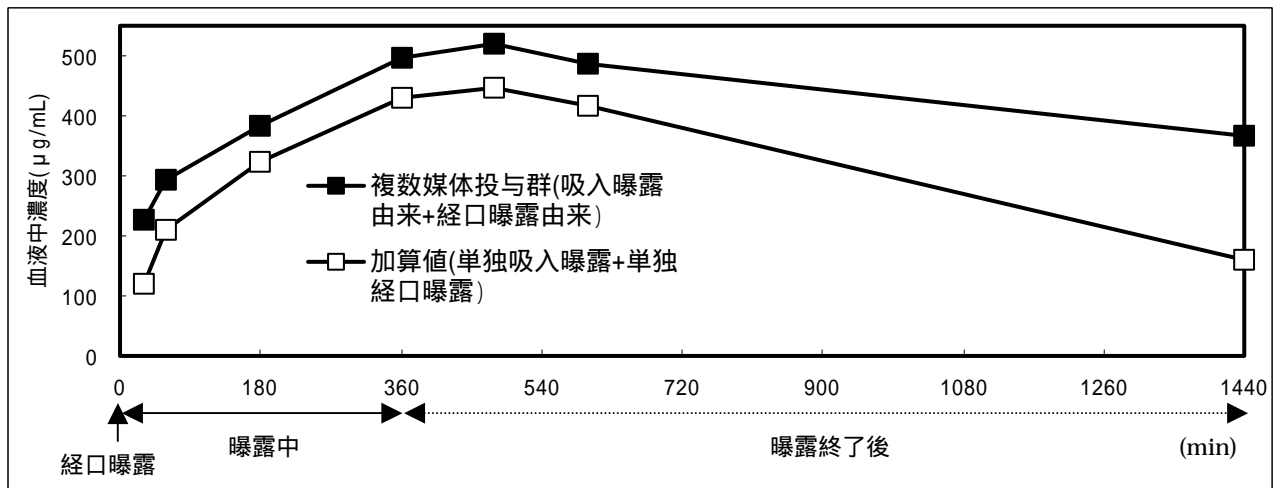


Figure 2-4. 血液中濃度の加算値 (未変化体)

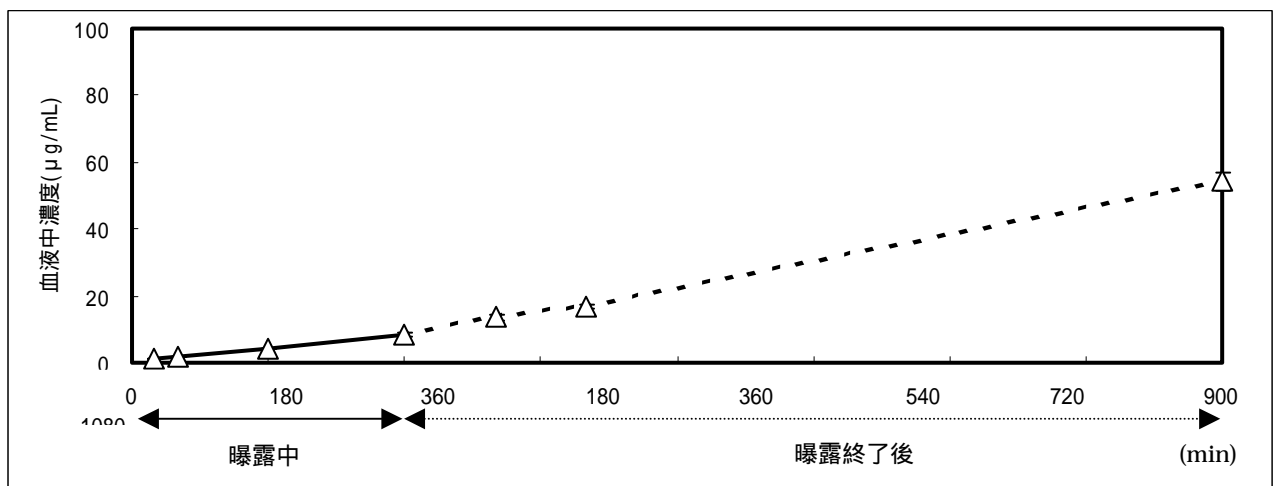


Figure 3-1. 単独吸入曝露群の血液中濃度 (代謝物)

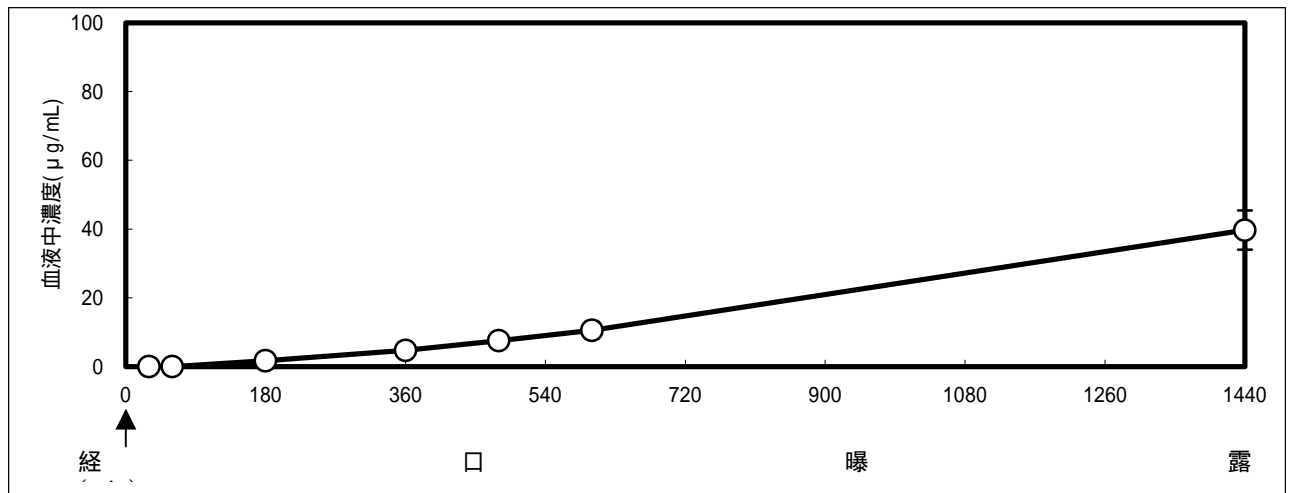


Figure 3-2. 単独経口曝露群の血液中濃度（代謝物）

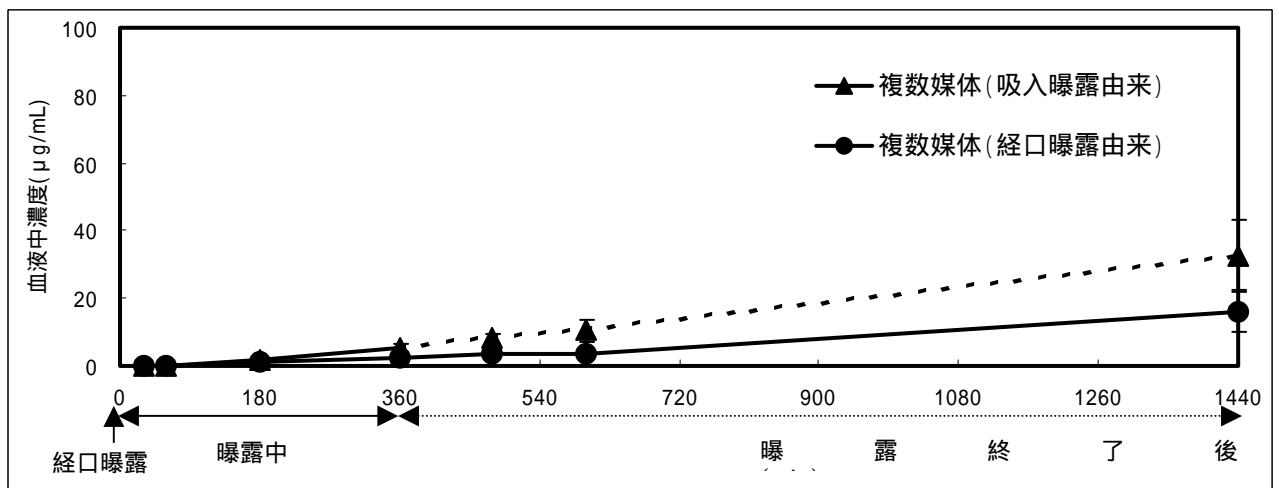


Figure 3-3. 複数媒体曝露群の血液中濃度（代謝物）

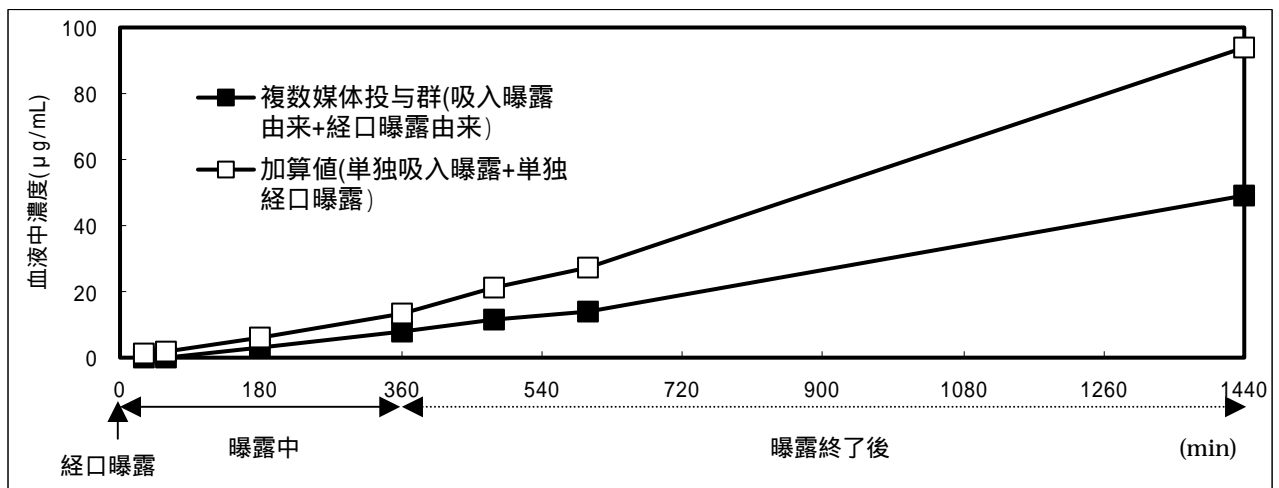


Figure 3-4. 血液中濃度の加算値（代謝物）

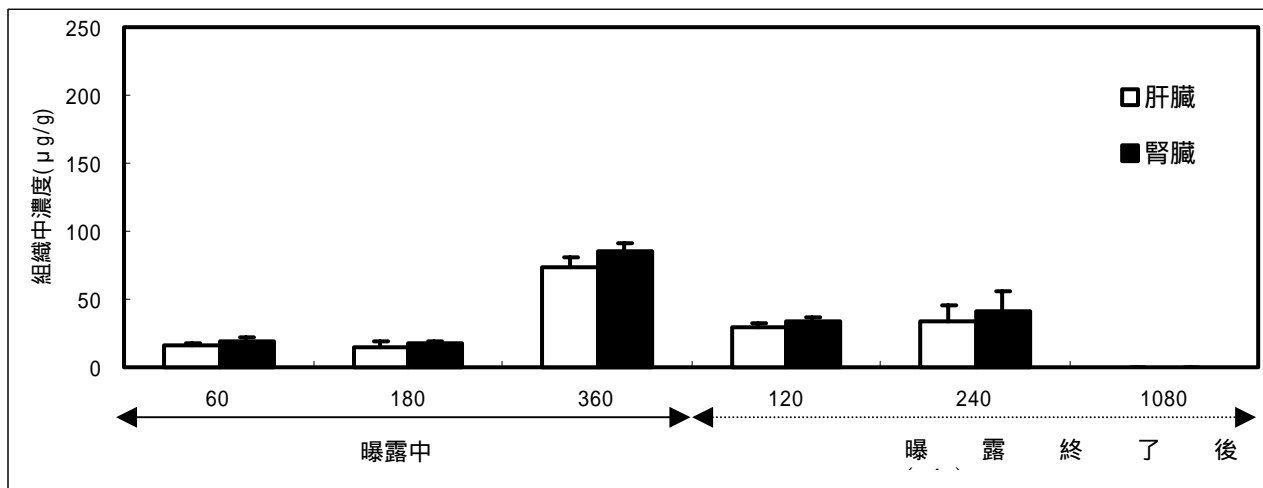


Figure 4-1. 単独吸入曝露群の組織中濃度（未変化体）

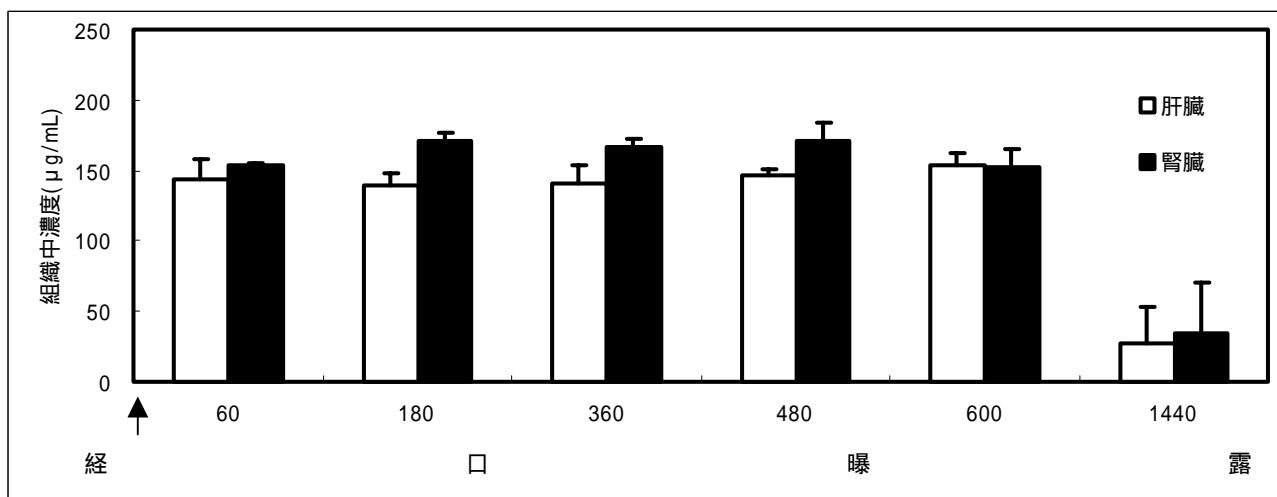


Figure 4-2. 単独経口曝露群の組織中濃度（未変化体）

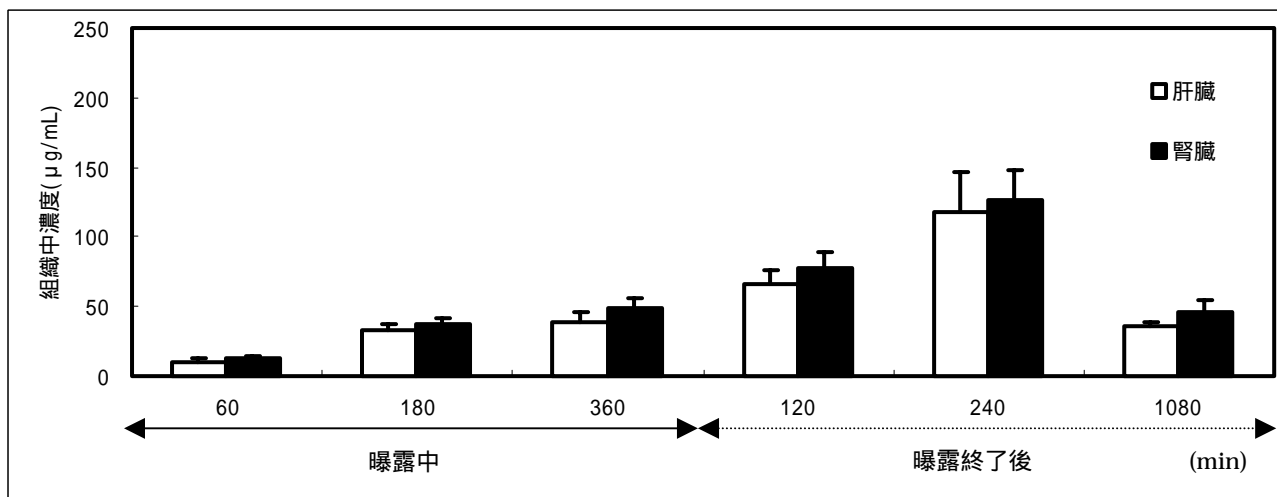


Figure 4-3-1. 複数媒体曝露群の吸入曝露由来の組織中濃度（未変化体）

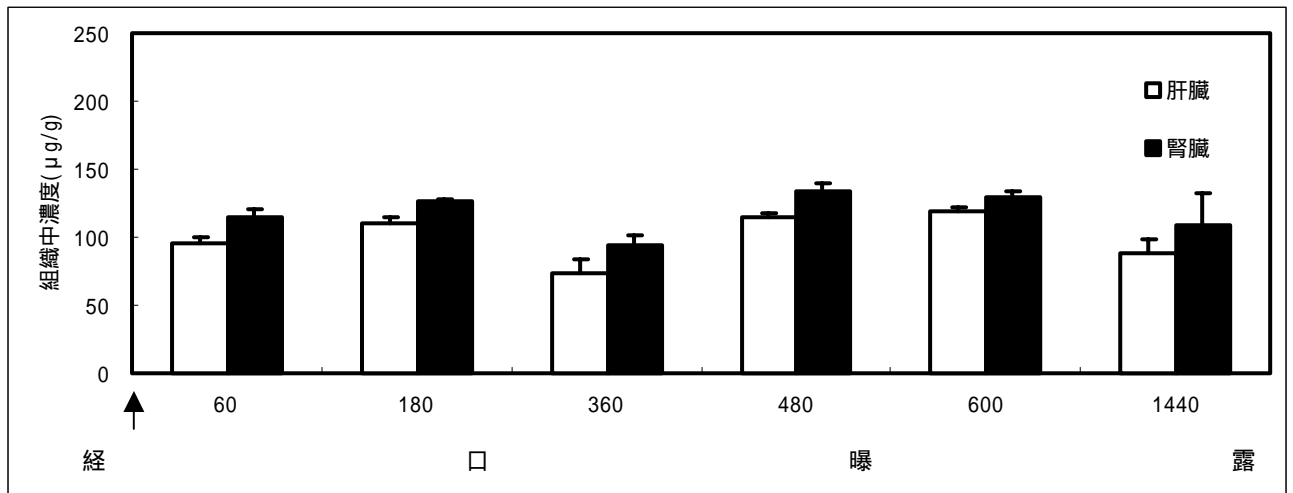


Figure 4-3-2. 複数媒体投与群の経口曝露由来の組織中濃度 (未変化体)

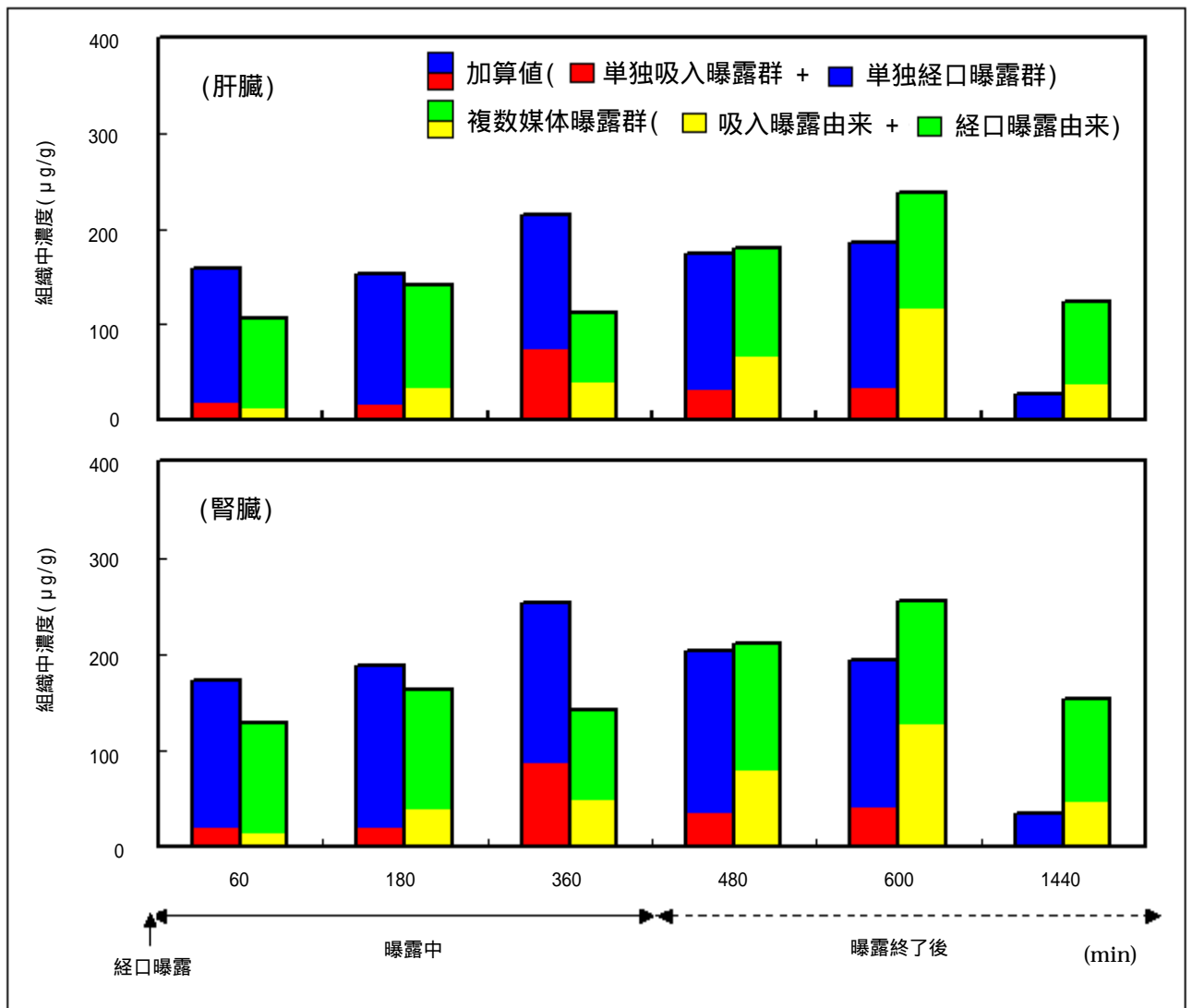


Figure 4-4. 組織中濃度の加算値 (未変化体)

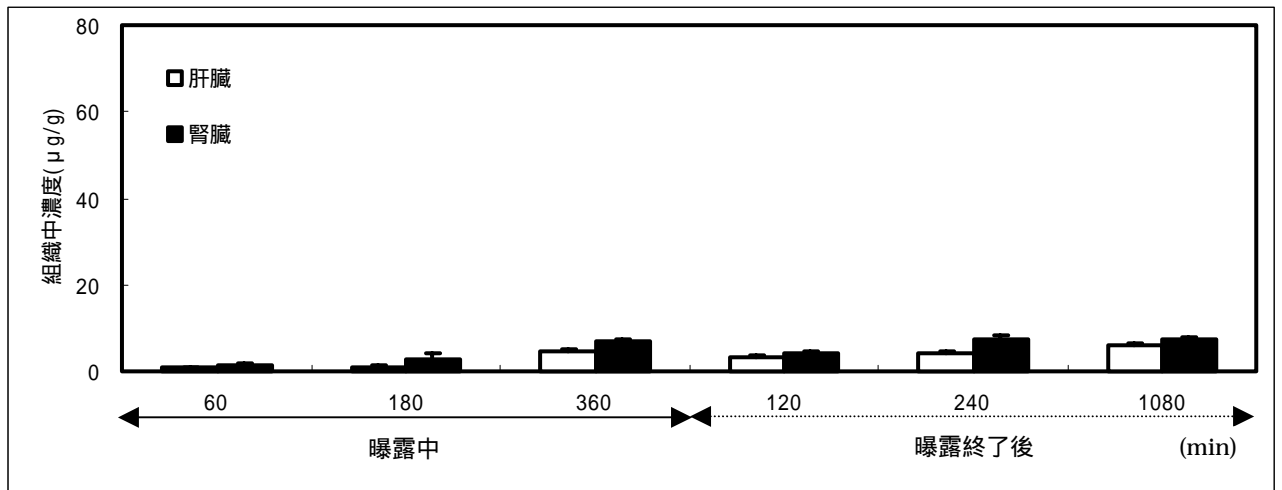


Figure 5-1. 単独吸入曝露群の組織中濃度 (代謝物)

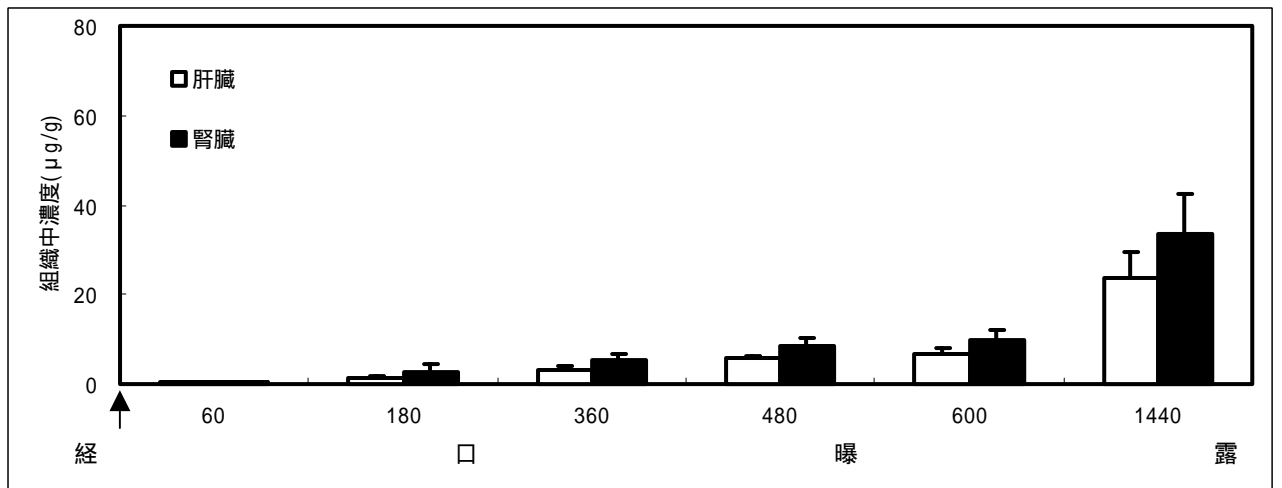


Figure 5-2. 単独経口曝露群の組織中濃度 (代謝物)

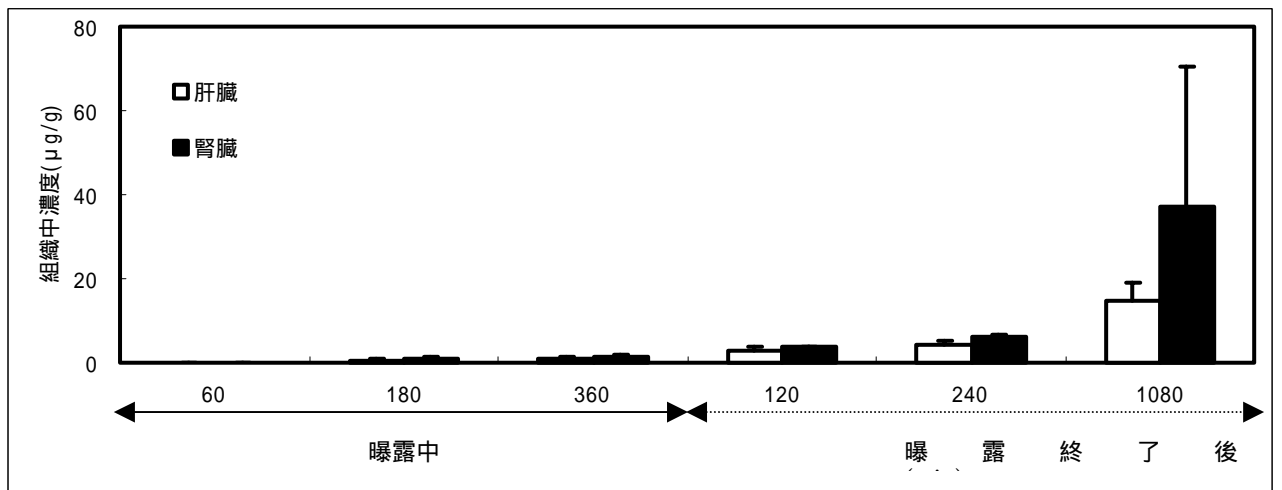


Figure 5-3-1. 複数媒体曝露群の吸入曝露由来の組織中濃度 (代謝物)

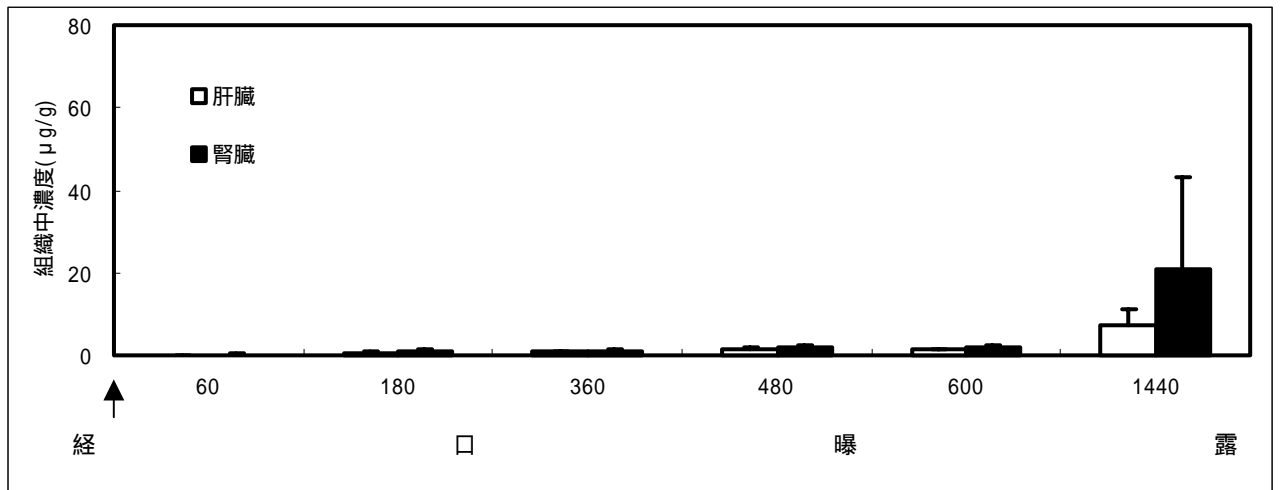


Figure 5-3-2. 複数媒体投与群の経口曝露由来の組織中濃度 (代謝物)

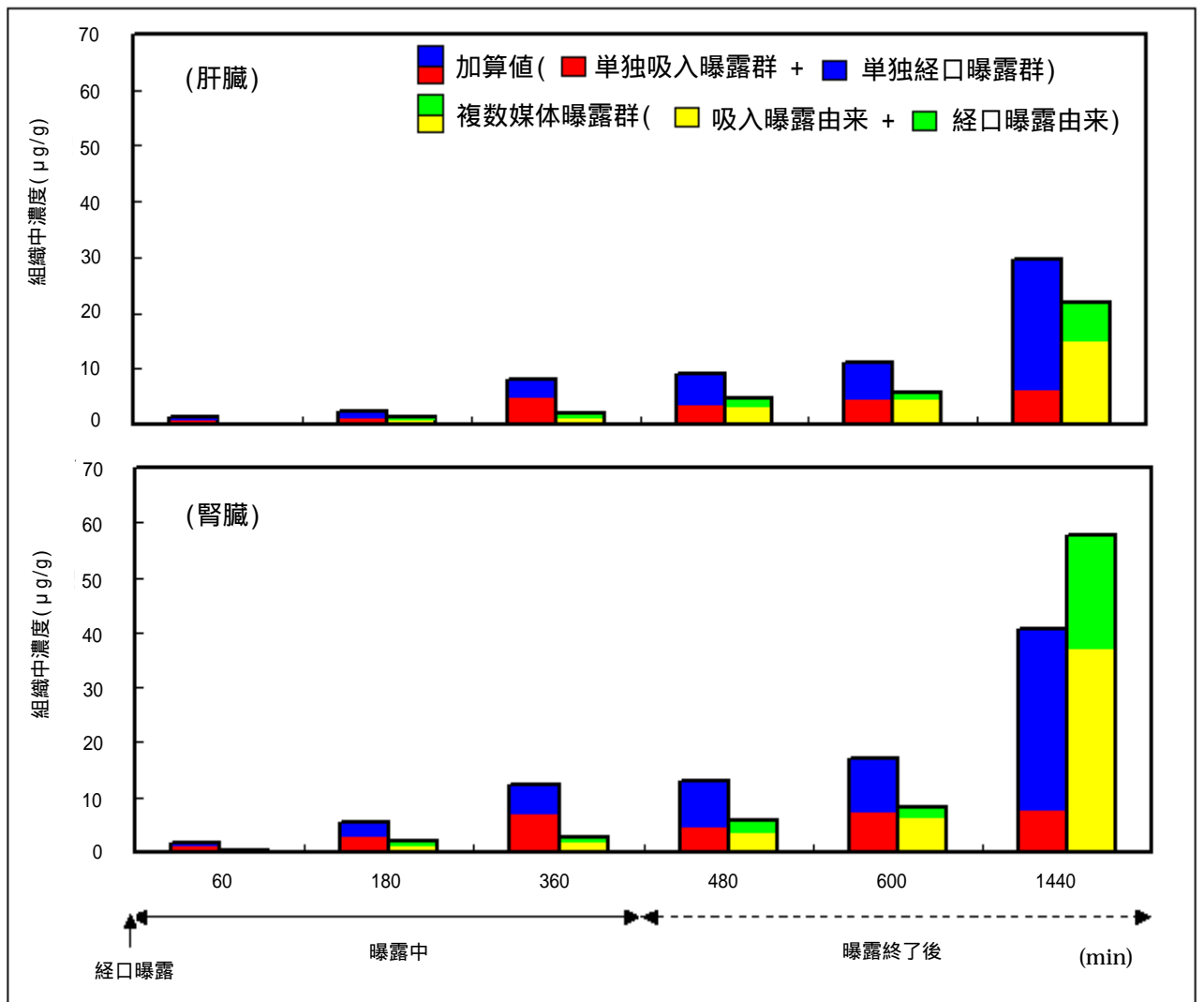


Figure 5-4. 組織中濃度の加算値 (代謝物)

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	単独経口曝露群	複数媒体曝露群
血液中濃度測定群	B-C 群	B-I 群	B-G 群	B-G+I 群
	344 ± 3 ^a	354 ± 6	346 ± 4	355 ± 4
組織中濃度測定群	T-C 群	T-I 群	T-G 群	T-G+I 群
	343 ± 6	342 ± 11	338 ± 10	346 ± 7

^a 体重値の平均値(g) ± 標準偏差(g)

Table 2. 血液中濃度の加算値の比率 (未変化体)

	30分	60分	180分	360分	480分	600分	1440分
単独 ^a	1	1	1	1	1	1	1
複数 ^b	1.88 ^c	1.39	1.18	1.15	1.17	1.17	2.31

Table 3. 血液中濃度の加算値の比率 (代謝物)

	30分	60分	180分	360分	480分	600分	1440分
単独 ^a	-	1	1	1	1	1	1
複数 ^b	-	0.15 ^c	0.49	0.59	0.54	0.52	0.52

^a: 単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群の血液中濃度の加算値

^b: 複数媒体曝露群 (吸入曝露由来 + 経口曝露由来) の血液中濃度

^c: 単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群の血液中濃度の加算値を 1 とした時の複数媒体曝露群 (吸入曝露由来 + 経口曝露由来) の血液中濃度の比率

Table 4. 組織中濃度の加算値の比率 (未変化体)

	60分	180分	360分	480分	600分	1440分
肝臓 単独	1	1	1	1	1	1
複数	0.66 ^c	0.92	0.52	1.03	1.27	4.56
腎臓 単独	1	1	1	1	1	1
複数	0.74	0.86	0.57	1.03	1.32	4.42

Table 5. 組織中濃度の加算値の比率（代謝物）

		60分	180分	360分	480分	600分	1440分
肝臓	単独	1	1	1	1	1	1
	複数	0.05 ^c	0.53	0.23	0.51	0.52	0.74
腎臓	単独	1	1	1	1	1	1
	複数	0.10	0.41	0.23	0.46	0.47	1.42

^a：単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群の組織中濃度の加算値

^b：複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来）の組織中濃度

^c：単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群の組織中濃度の加算値を 1 とした時の複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来）の組織中濃度の比率

(2) ベンゼン

1. 試験目的

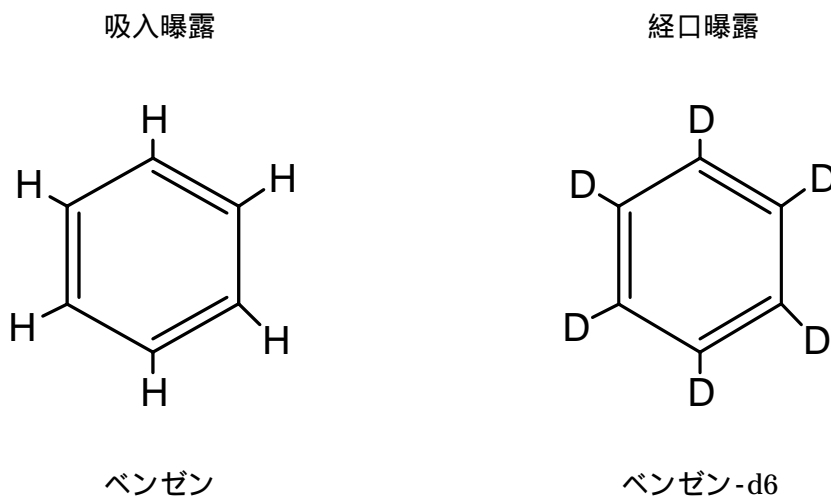
複数媒体曝露による生体影響のメカニズムを明らかにすることを目的として、ラットにベンゼンを吸入曝露及びベンゼン-d6 を経口曝露し、血液中の未変化体の濃度を経時的に測定した。

2. 試験方法

2.1 被験物質

吸入曝露に用いた被験物質は(株)和光純薬工業製のベンゼン(純度 99.5%)を使用した。

経口曝露に用いた被験物質は Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 製のベンゼン-d6 (純度 98%以上)を使用した。



2.2 曝露方法

2.2.1 吸入曝露

被験物質の曝露はラットに吸入曝露装置(株)柴田科学製)により吸入曝露を行った。吸入曝露装置の構図を Figure 1 に示した。被験物質供給装置(株)柴田科学製)の発生源内のベンゼンを一定温度下で空気のパブリングにより蒸発させ、空気と混合して、吸入曝露装置内に送気し、ラットに吸入曝露による経気道曝露を行った。曝露期間は1日最高6時間/1回曝露し、曝露濃度は600ppmの曝露濃度を設定した。曝露中の吸入曝露装置内空気を曝露開始10、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 経口曝露

被験物質の曝露はラットに経口曝露（単回曝露）を行った。

曝露用量は 40mg/kg・BW とした。動物に与える曝露量はベンゼン-d6 を 4mg/mL になるようにコ-ン油に溶解しラットに体重 1kg 当たり 10mL 強制経口した。

2.2.3 複数媒体曝露

上記の吸入曝露と経口曝露を同条件下において、同時に曝露した。

2.3 使用動物

Crj:CD(SD)IGS の SPF 雄（10 週齢）ラット（日本チャールス・リバー厚木飼育センター）を使用した。

2.4 群の構成及び各群の使用動物数

群の構成は血液中濃度測定群を対照群と単独吸入曝露群、単独経口曝露群及び複数媒体曝露群の 4 群に分けた。（表参照）

群名称	血液中濃度測定群
対照群	B-C
使用動物数	3 匹
単独吸入曝露群	B-I
使用動物数	3 匹
単独経口曝露群	B-G
使用動物数	3 匹
複数媒体曝露群	B-G+I
使用動物数	3 匹

* 群名称は B：血液中濃度測定群、

C：対照群、I：単独吸入曝露群、G：単独経口曝露群、

G+I：複数媒体曝露群

2.5 ベンゼン及びベンゼン-d6の血液中濃度測定

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 120、240、1080 分で、B-G 群は経口曝露後 30、60、180、360、480、600、1440 分で、B-G+I 群は吸入曝露開始 30、60、180、360、吸入曝露終了後 120、240、1080 分（経口曝露後 30、60、180、360、480、600、1440 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 ヘッドスペース-GC/MS 分析条件

ヘッドスペース (Agilent Technologies 7694) -GC/MS (Agilent Technologies 5973N) を用いてベンゼン及びベンゼン-d6 の血液中濃度を測定した。

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 110 、バイアル加温時間は 10min とした。GC/MS の分析条件として、カラムは Agilent Technologies Ultra-1 (0.2mmφ × 50m)、キャリアーガスはヘリウムを用い、カラム温度は 130 、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 230 、インターフェイス温度は 230 とした。なお、血液中濃度の定量はベンゼンの分子イオンを示す 78m/z、ベンゼン-d6 の分子イオンを示す 84m/z のそれぞれのピークによる SIM 法により実施した。

3. 結果

3.1 生死状況

全動物とも、曝露の影響による死亡はみられなかった。

3.2 体重

曝露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。

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 603 ± 13 ppm であり、被験物質濃度は設定濃度 (600 ppm) にきわめて近い値でラットに曝露されたことを確認した。

3.4 ベンゼン及びベンゼン-d6 の血液中濃度測定結果

各群におけるベンゼン及びベンゼン-d6 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、ベンゼン及びベンゼン-d6 を曝露していない対照群のラットの血液中ではベンゼン及びベンゼン-d6 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 分からラットの血液中にベンゼンが認められ、吸入曝露中は曝露時間の経過に伴って血液中濃度が増加した。吸入曝露終了後は血液中濃度が減衰し、吸入曝露終了後 240 分まで血液中のベンゼンが認められた。

3.4.2 単独経口曝露群

Figure 2-2 に示したように、経口曝露後 30 分からラットの血液中にベンゼン-d6 が認められ、経口曝露後 60 分で最高濃度に達した後、血液中濃度が減衰し、経口曝露後 600 分まで血液中のベンゼン-d6 が認められた。

3.4.3 複数媒体曝露群

Figure 2-3 に示したように、

<吸入曝露由来> 吸入曝露開始 30 分からラットの血液中にベンゼンが認められ、吸入曝露中は曝露時間の経過に伴って血液中濃度が増加した。吸入曝露終了後は血液中濃度が減衰し、吸入曝露終了後 240 分まで血液中のベンゼンが認められた。

<経口曝露由来> 経口曝露後 30 分からラットの血液中にベンゼン-d6 が認められ、

経口曝露後 30 分で最高濃度に達した後、血液中濃度が減衰し、経口曝露後 600 分まで血液中のベンゼン-d6 が認められた。

3.4.4 血液中濃度の加算値及び加算値の比率

Figure 2-4 に血液中濃度の加算値（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群及び複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来））を示した。各採血時間とも単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度の加算値が若干、高かった。また、Table 2 に血液中濃度の加算値の比率（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群を 1 とした時の複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来）の比率）を示した。各採血時間とも単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度の加算値の比率が若干、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曝露群の吸入曝露由来における血液中濃度の経時的変化はほぼ同じ推移であった。単独経口曝露群と複数媒体曝露群の経口曝露由来における血液中濃度の経時的変化は各採血時間とも単独で曝露した群に比べ複数媒体で曝露した群の血液中濃度が若干、高かった。

3.5 全体のまとめ

ベンゼン（未変化体）については、血液中未変化体濃度は、各採血時間とも単独経路曝露群の加算値に比べ複数媒体曝露群が若干高かった。従って、血液中未変化体濃度に関しては僅かながら複数媒体曝露の影響がみられた。

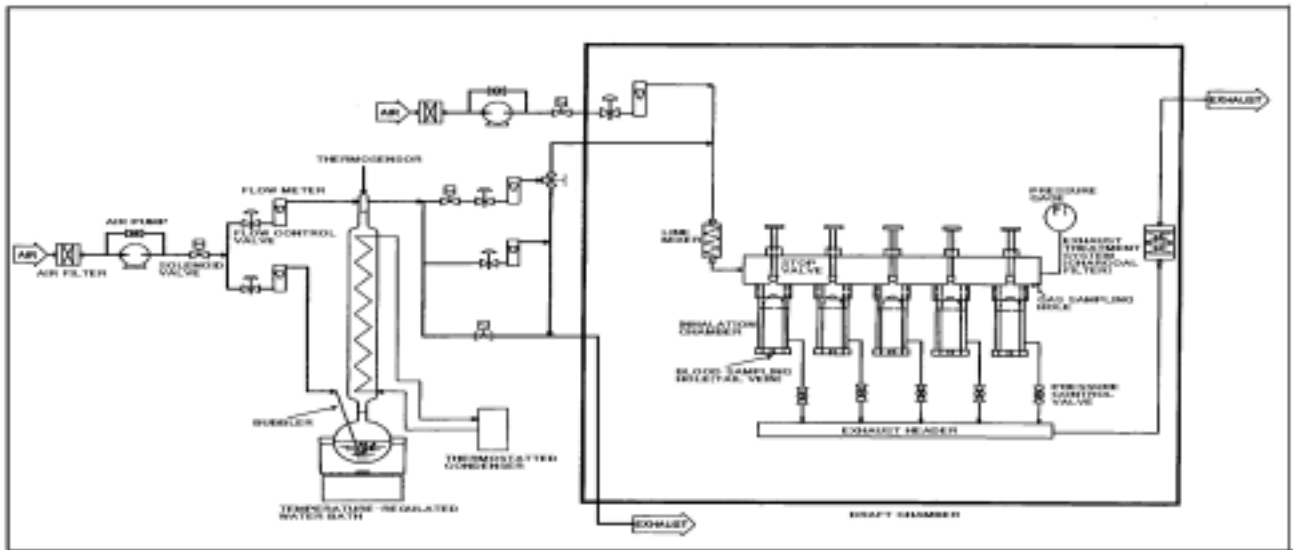


Figure 1. 吸入曝露装置

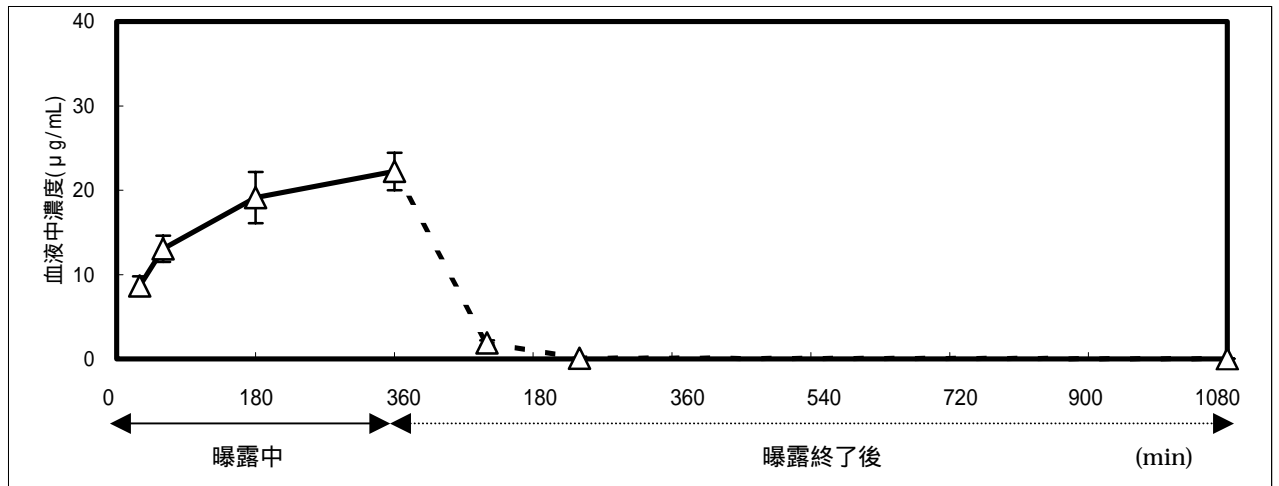


Figure 2-1. 単独吸入曝露群の血液中濃度

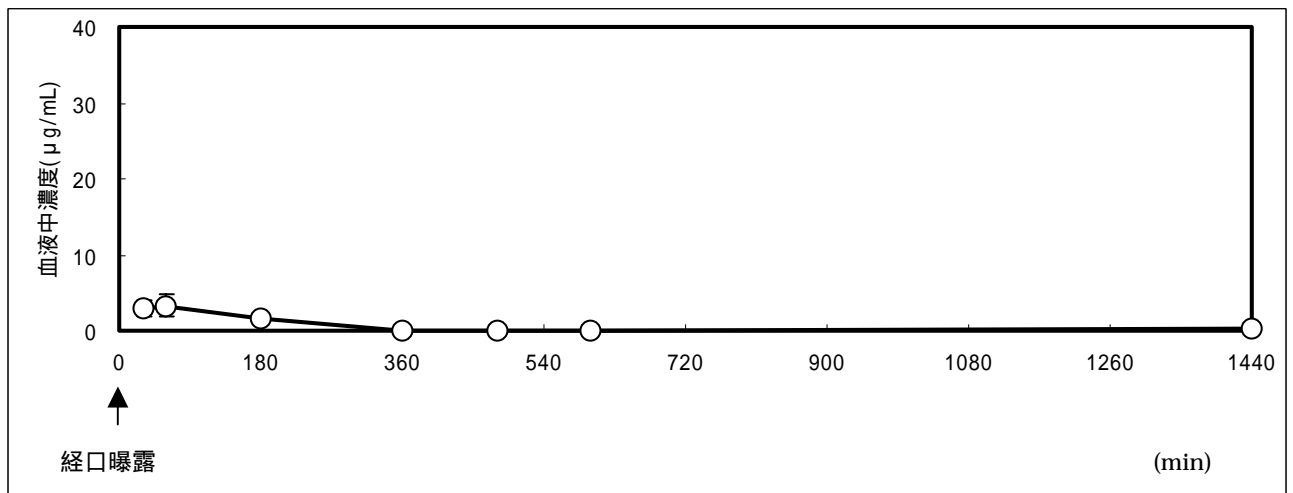


Figure 2-2. 単独経口曝露群の血液中濃度

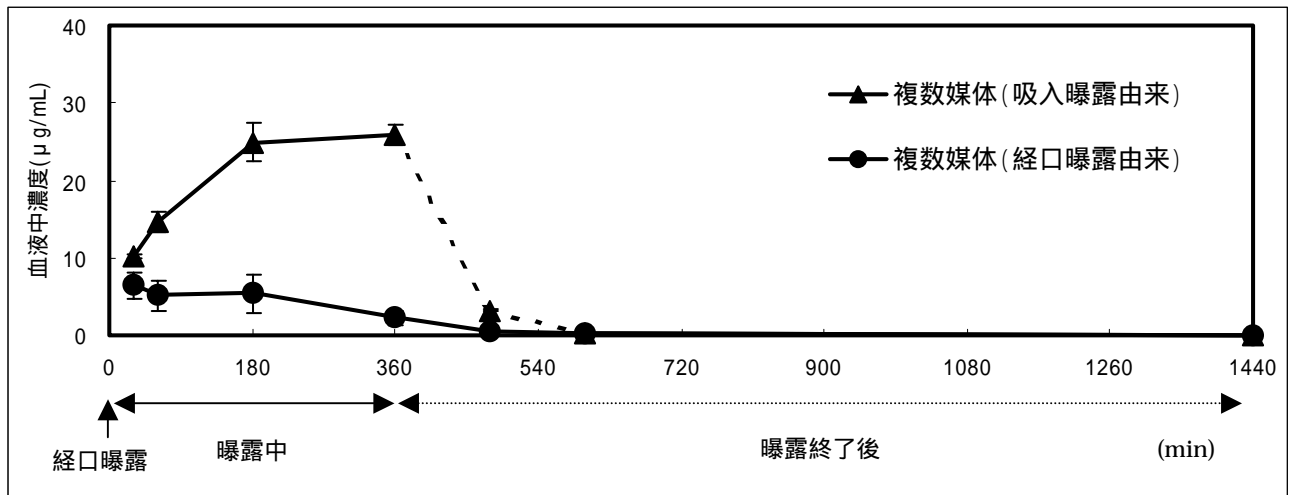


Figure 2-3. 複数媒体曝露群の血液中濃度

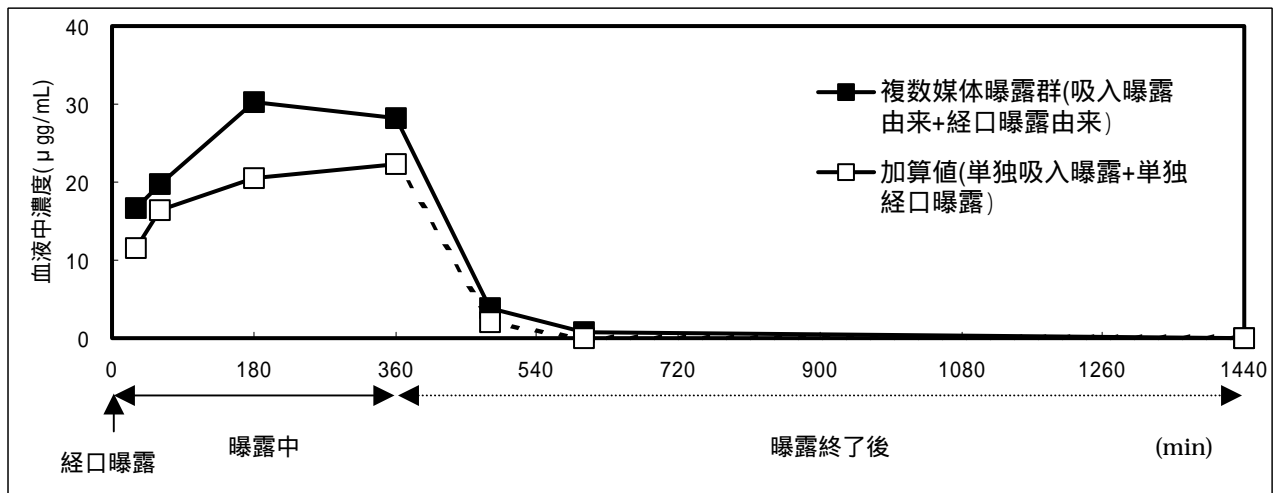


Figure 2-4. 血液中濃度の加算値

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	単独経口曝露群	複数媒体曝露群
血液中濃度測定群	B-C 群	B-I 群	B-G 群	B-G+I 群
	341 ± 2 ^a	332 ± 5	341 ± 2	339 ± 1

^a 体重値の平均値(g) ± 標準偏差(g)

Table 2. 血液中濃度の加算値の比率

	30 分	60 分	180 分	360 分	480 分	600 分	1440 分
単独 ^a	1	1	1	1	1	1	-
複数 ^b	1.44 ^c	1.21	1.47	1.26	1.96	6.64	-

^a : 単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群の血液中濃度の加算値

^b : 複数媒体曝露群 (吸入曝露由来 + 経口曝露由来) の血液中濃度

^c : 単独吸入曝露群+単独経口曝露群の血液中濃度の加算値を 1 とした時の複数媒体曝露群 (吸入曝露由来 + 経口曝露由来) の血液中濃度の比率

(3) トルエン

1. 試験目的

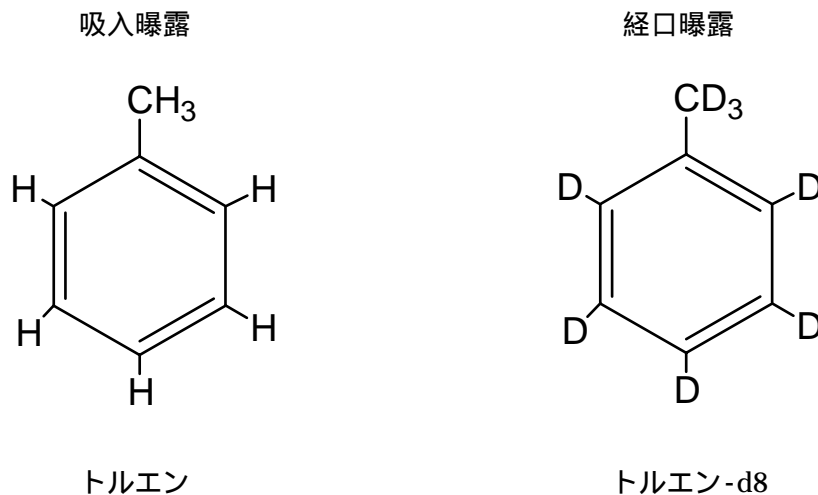
複数媒体曝露による生体影響のメカニズムを明らかにすることを目的として、ラットにトルエンを吸入曝露及びトルエン-d8 を経口曝露し、血液及び組織中の未変化体の濃度を経時的に測定した。

2. 試験方法

2.1 被験物質

吸入曝露に用いた被験物質は(株)和光純薬工業製のトルエン(純度 99.5%)を使用した。

経口曝露に用いた被験物質は Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 製のトルエン-d8 (純度 98%以上)を使用した。



2.2 曝露方法

2.2.1 吸入曝露

被験物質の曝露はラットに吸入曝露装置((株)柴田科学製)により吸入曝露を行った。吸入曝露装置の構図を Figure 1 に示した。被験物質供給装置((株)柴田科学製)の発生器内のトルエンを一定温度下で空気のパブリングにより蒸発させ、空気と混合して、吸入曝露装置内に送気し、ラットに吸入曝露による経気道曝露を行った。曝露期間は1日最高6時間/1回曝露し、曝露濃度は400ppmの曝露濃度を設定した。曝露中の吸入曝露装置内空気を曝露開始10、60、180、360分で採気し、被験物質濃度をガスクロマトグラフ(ヒューレットパッカード社 HP5890A)により測定した。

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

2.2.2 経口曝露

被験物質の曝露はラットに経口曝露（単回曝露）を行った。

曝露用量は 200mg/kg・BW とした。動物に与える曝露量はトルエン-d8 を 20mg/mL になるようにコ - ン油に溶解しラットに体重 1kg 当たり 10mL 強制経口した。

2.2.3 複数媒体曝露

上記の吸入曝露と経口曝露を同条件下において、同時に曝露した。

2.3 使用動物

Crj:CD(SD)IGS の SPF 雄（10 週齢）ラット（日本チャールス・リバー厚木飼育センター）を使用した。

2.4 群の構成及び各群の使用動物数

群の構成は血液中濃度測定群と組織中濃度測定群の 2 群に分けた。更に血液中濃度測定群と組織中濃度測定群は対照群と単独吸入曝露群、単独経口曝露群及び複数媒体曝露群の 4 群の合計 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	3 匹	3 匹
単独吸入曝露群	B-I	T-I
使用動物数	3 匹	18 匹
単独経口曝露群	B-G	T-G
使用動物数	3 匹	18 匹
複数媒体曝露群	B-G+I	T-G+I
使用動物数	3 匹	18 匹

* 群名称は B：血液中濃度測定群、T：組織中濃度測定群、
C：対照群、I：単独吸入曝露群、G：単独経口曝露群、
G+I：複数媒体曝露群

2.5 トルエン及びトルエン-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 120、240、1080 分で、B-G 群は経口曝露後 30、60、180、360、480、600、1440 分で、B-G+I 群は吸入曝露開始 30、60、180、360、吸入曝露終了後 120、240、1080 分（経口曝露後 30、60、180、360、480、600、1440 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、肝臓、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 60、180、360、吸入曝露終了後 120、240、1080 分で、T-G 群は経口曝露後 60、180、360、480、600、1440 分で、T-G+I 群は吸入曝露開始 60、180、360、吸入曝露終了後 120、240、1080 分（経口曝露後 60、180、360、480、600、1440 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 (Agilent Technologies 7694) -GC/MS (Agilent Technologies 5973N) を用いてトルエン及びトルエン-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 、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 Agilent Technologies Ultra-1 (0.2mmφ × 50m)、キャリアーガスはヘリウムを用い、カラム温度は 130 、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 230 、インターフェイス温度は 230 とした。なお、血液及び組織中濃度の定量はトルエンのフラグメントイオンを示す 91m/z、トルエン-d8 のフラグメントイオンを示す 98m/z のそれぞれのピークによる SIM 法により実施した。

3. 結果

3.1 生死状況

全動物とも、曝露の影響による死亡はみられなかった。

3.2 体重

曝露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。

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 198 ± 5 ppm であり、被験物質濃度は設定濃度 (200 ppm) にきわめて近い値でラットに曝露されたことを確認した。

3.4 トルエン及びトルエン-d8 の血液中濃度測定結果

各群におけるトルエン及びトルエン-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、トルエン及びトルエン-d8 を曝露していない対照群のラットの血液中ではトルエン及びトルエン-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 分からラットの血液中にトルエンが認められ、吸入曝露中は曝露時間の経過に伴って血液中濃度が増加した。吸入曝露終了後は吸入曝露終了後 1080 分まで血液中のトルエンの濃度が減衰した。

3.4.2 単独経口曝露群

Figure 2-2 に示したように、経口曝露後 30 分からラットの血液中にトルエン-d8 が認められ、経口曝露後 180 分で最高濃度に達した後、経口曝露後 1440 分まで血液中のトルエン-d8 の濃度が減衰した。

3.4.3 複数媒体曝露群

Figure 2-3 に示したように、

<吸入曝露由来> 吸入曝露開始 30 分からラットの血液中にトルエンが認められ、吸入曝露中は曝露時間の経過に伴って血液中濃度が増加した。吸入曝露終了後は吸入曝露終了後 1080 分まで血液中のトルエンの濃度が減衰した。

<経口曝露由来> 経口曝露後 30 分からラットの血液中にトルエン-d8 が認められ、経口曝露後 180 分で最高濃度に達した後、経口曝露後 1440 分まで血液中のトルエン

-d8 の濃度が減衰した。

3.4.4 血液中濃度の加算値及び加算値の比率

Figure 2-4 に血液中濃度の加算値（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群及び複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来））を示した。各採血時間とも単独で曝露した群と複数媒体で曝露した群の加算値はほぼ同じ値であった。また、Table 2 に各採血時間の血液中濃度の加算値の比率（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群を 1 とした時の複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来）の比率）を示した。各採血時間とも単独で曝露した群と複数媒体で曝露した群の加算値の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曝露群の吸入曝露由来における血液中濃度の経時的变化はほぼ同じ推移であった。同様に単独経口曝露群と複数媒体曝露群における経口曝露由来の血液中濃度の経時的变化はほぼ同じ推移であった。

3.5 トルエン及びトルエン-d8 の組織中濃度測定結果

各群におけるトルエン及びトルエン-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、トルエン及びトルエン-d8 を曝露していない対照群のラットの組織中ではトルエン及びトルエン-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）経時的变化

吸入曝露開始 60 分からラットの各組織（脳、肝臓、脂肪）中にトルエンが認められ、吸入曝露中は曝露時間の経過に伴って各組織中濃度が増加した。吸入曝露終了後は各組織中濃度が減衰し、吸入曝露終了後 240 分までトルエンが認められた。

（イ）組織分布

各組織（脳、肝臓、脂肪）中の濃度は脳、肝臓の組織中濃度では吸入曝露中はほぼ同じ濃度で分布したが、脂肪の組織中濃度においては他の組織に比べ高い濃度で分布した。また、各採取時間とも脂肪における含有量が他の組織に比べ、多

かった。このことに関してはトルエンの脂溶性が高いため、脂肪への分布が多いと考えられた。

3.5.2 単独経口曝露群

Figure 3-2 に単独経口曝露群の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化

経口曝露後 60 分からラットの各組織（脳、肝臓、脂肪）中にトルエン-d8 が認められ、経口曝露後 60 分で脳、肝臓、経口曝露後 360 分で脂肪が最高濃度に達した後、各組織中濃度は減衰し、経口曝露後 600 分まで脳、経口曝露後 1440 分まで肝臓、脂肪で各組織中にトルエン-d8 が認められた。

(イ) 組織分布

各組織（脳、肝臓、脂肪）中の濃度は経口曝露後の最高濃度で脳、肝臓の組織中濃度に対して、脂肪の組織中濃度は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。このことに関してはトルエンと同様の物理化学的性質を有するトルエン-d8 の脂溶性が高いため、脂肪への分布が多いと考えられた。

3.5.3 複数媒体曝露群

3.5.3.1 複数媒体群の吸入曝露由来

Figure 3-3-1 に複数媒体曝露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 60 分からラットの各組織（脳、肝臓、脂肪）中にトルエンが認められ、吸入曝露中は曝露時間の経過に伴って各組織中濃度が増加した。吸入曝露終了後は各組織中濃度が減衰し、吸入曝露終了後 240 分まで脳、肝臓、吸入曝露終了後 1080 分まで脂肪でトルエンが認められた。

(イ) 組織分布

各組織（脳、肝臓、脂肪）中の濃度は脳、肝臓の組織中濃度においては各組織とも吸入曝露中はほぼ同じ濃度で分布したが脂肪の組織中濃度においては他の組織に比べ高い濃度で分布した。また、各採取時間とも脂肪における含有量が他の組織に比べ、多かった。

3.5.3.2 複数媒体群の経口曝露由来

Figure 3-3-2 に複数媒体曝露群の経口曝露由来の組織中濃度を示した。

(ア) 経時的変化

経口曝露後 60 分からラットの各組織（脳、肝臓、脂肪）中にトルエン-d8 が認められ、経口曝露後 60 分で脳、肝臓、経口曝露後 360 分で脂肪が最高濃度に達した後、経口曝露後 1440 分まで各組織中のトルエン-d8 の濃度が減衰した。

(イ) 組織分布

各組織（脳、肝臓、脂肪）中の濃度を比べると、経口曝露後の最高濃度で脳、肝臓の組織中濃度に対して、脂肪の組織中濃度は高く、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 組織中濃度の加算値及び加算値の比率

Figure 3-4 に各組織中濃度の加算値（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群及び複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来））を示した。各組織の採取時間とも単独で曝露した群と複数媒体で曝露した群の加算値はほぼ同じ値であった。また、Table 3 に各組織中濃度の加算値の比率（単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群を 1 とした時の複数媒体曝露群（吸入曝露由来 + 経口曝露由来）の比率）を示した。各組織の採取時間とも単独で曝露した群と複数媒体で曝露した群の加算値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曝露群の吸入曝露由来における各組織中濃度の経時的変化は、ほぼ同じ推移であった。同様に単独経口曝露群と複数媒体曝露群の経口曝露由来における各組織中濃度の経時的変化はほぼ同じ推移であった。

3.6 全体のまとめ

トルエン（未変化体）の血液・組織（脳、肝臓、脂肪）中濃度は、各採血・採取時間とも単独経路曝露群の加算値と複数媒体曝露群でほぼ同じ値であった。従って血液・各組織中濃度に関しては、複数媒体曝露の影響がみられなかった。

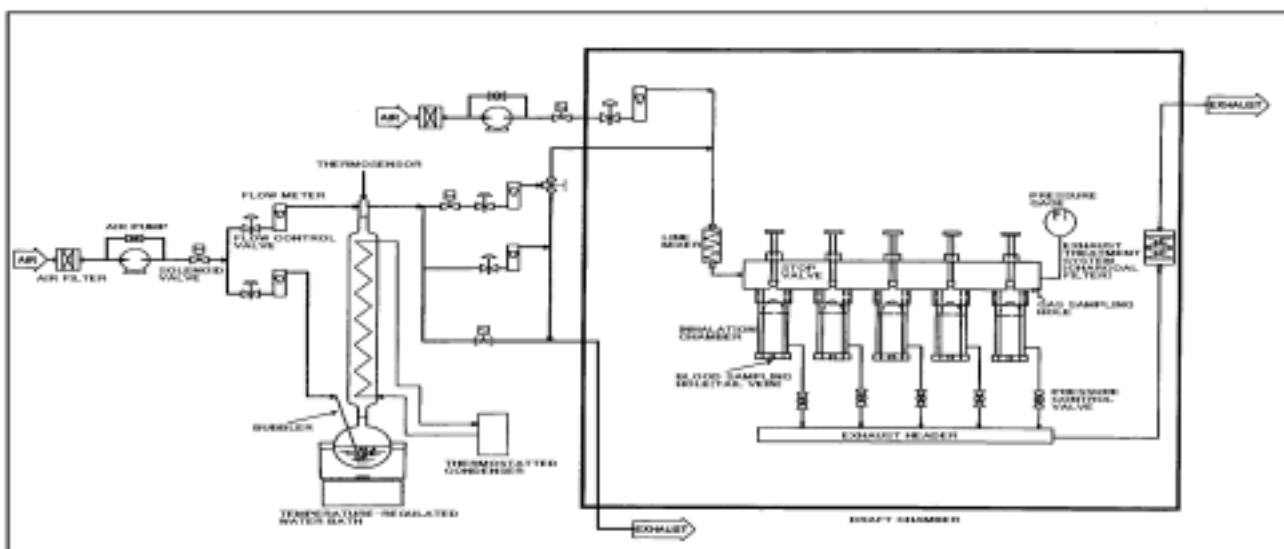


Figure 1. 吸入曝露装置

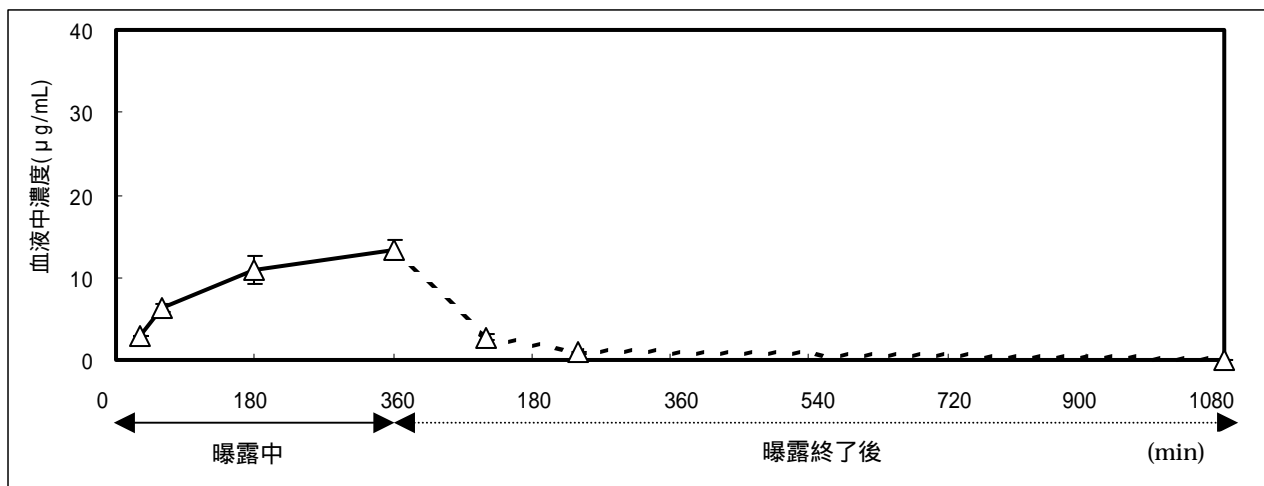


Figure 2-1. 单独吸入曝露群の血液中濃度

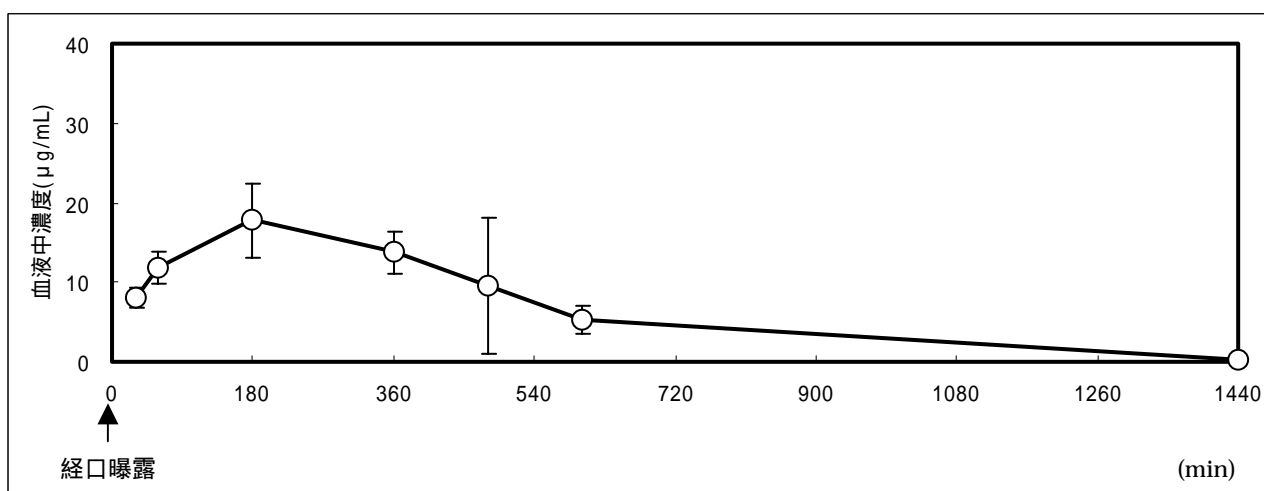


Figure 2-2. 单独経口曝露群の血液中濃度

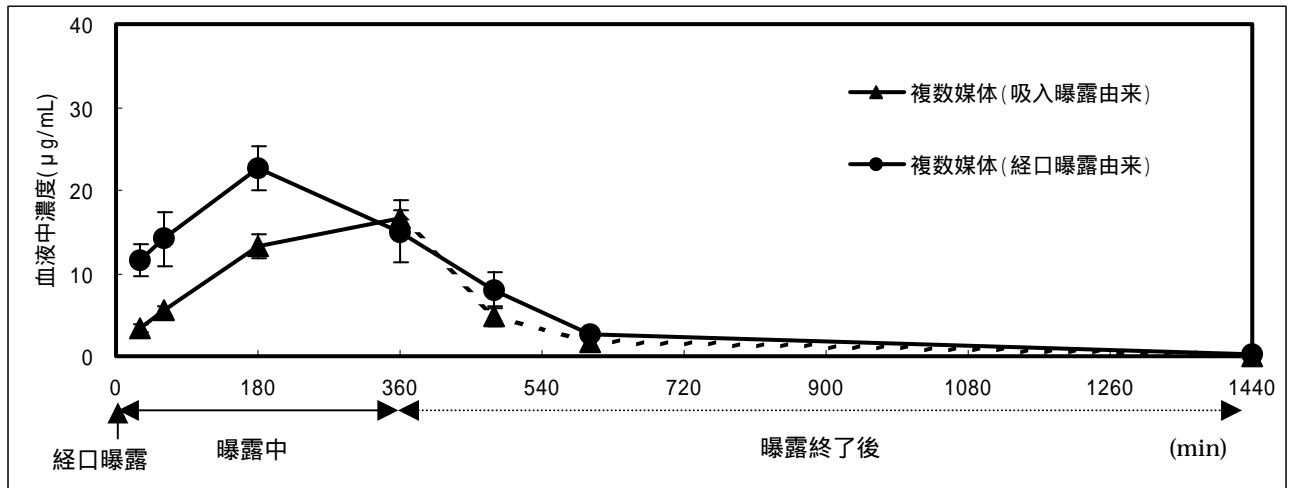


Figure 2-3. 複数媒体曝露群の血液中濃度

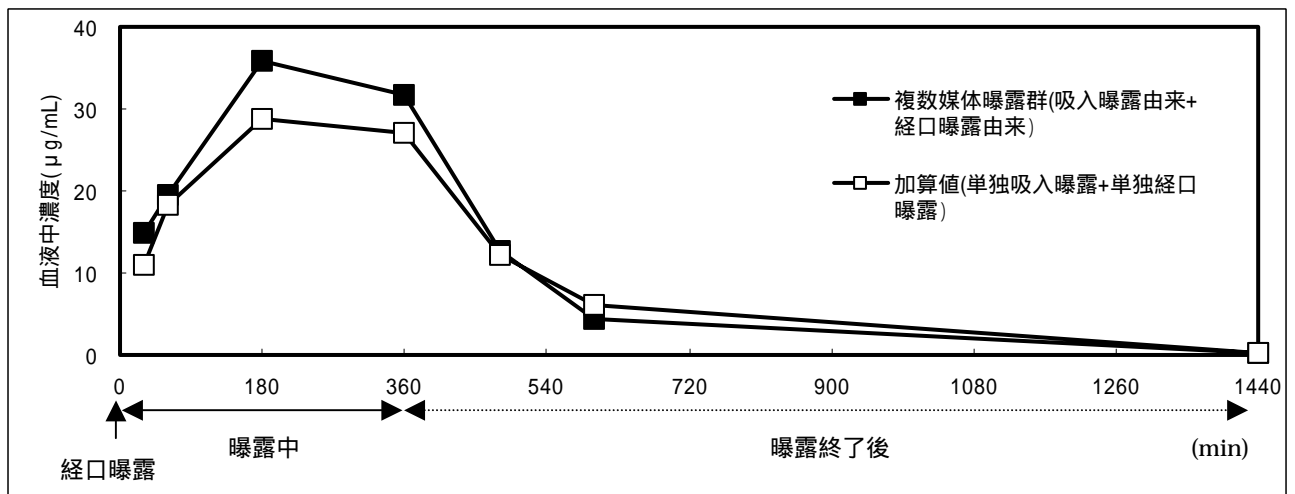


Figure 2-4. 血液中濃度の加算値

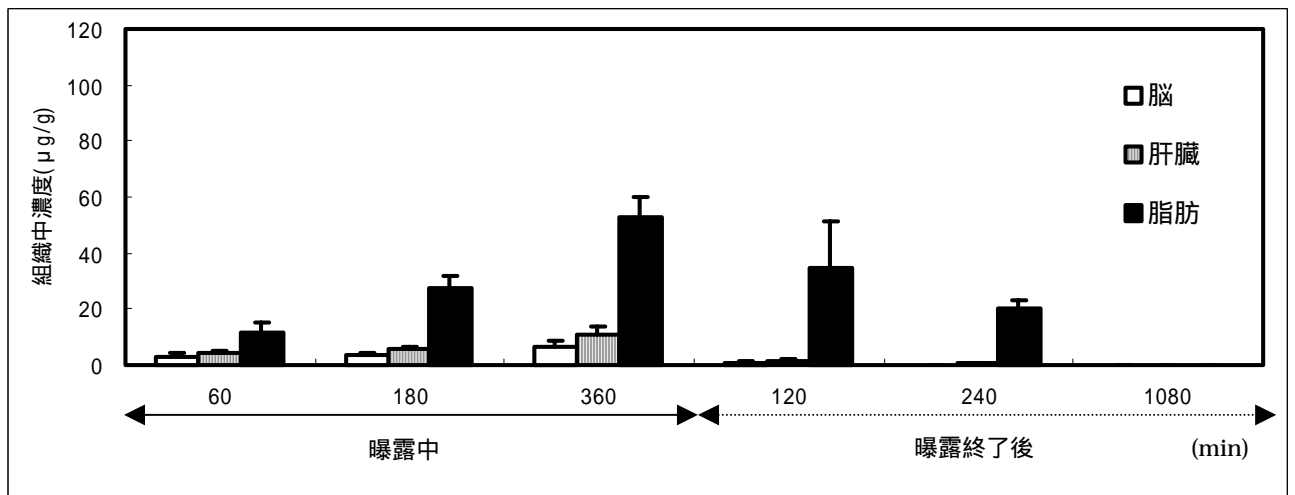


Figure 3-1. 単独吸入曝露群の組織中濃度

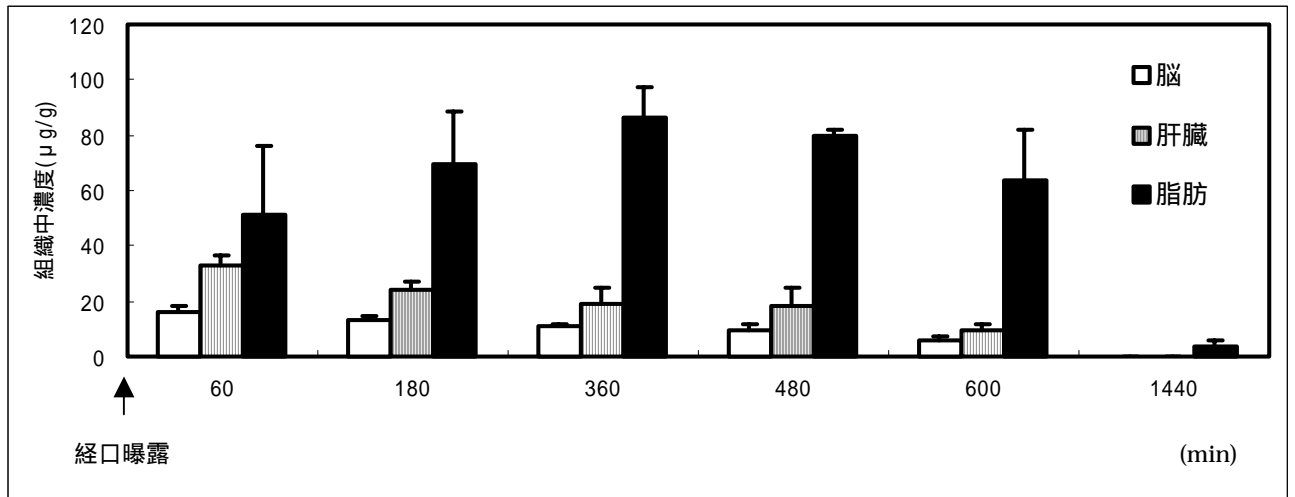


Figure 3-2. 単独経口曝露群の組織中濃度

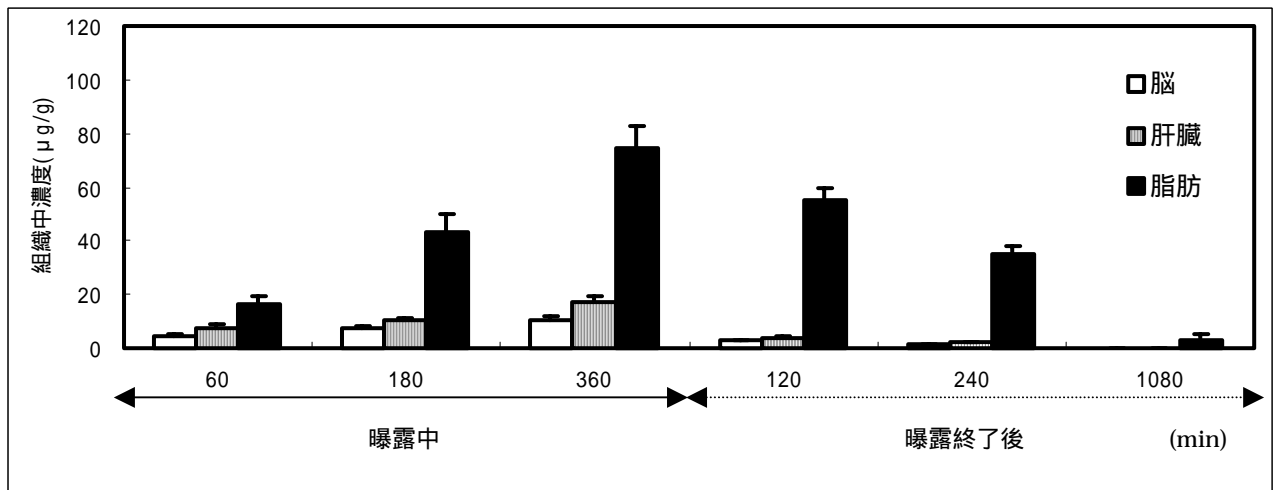


Figure 3-3-1. 複数媒体曝露群の吸入曝露由来の組織中濃度

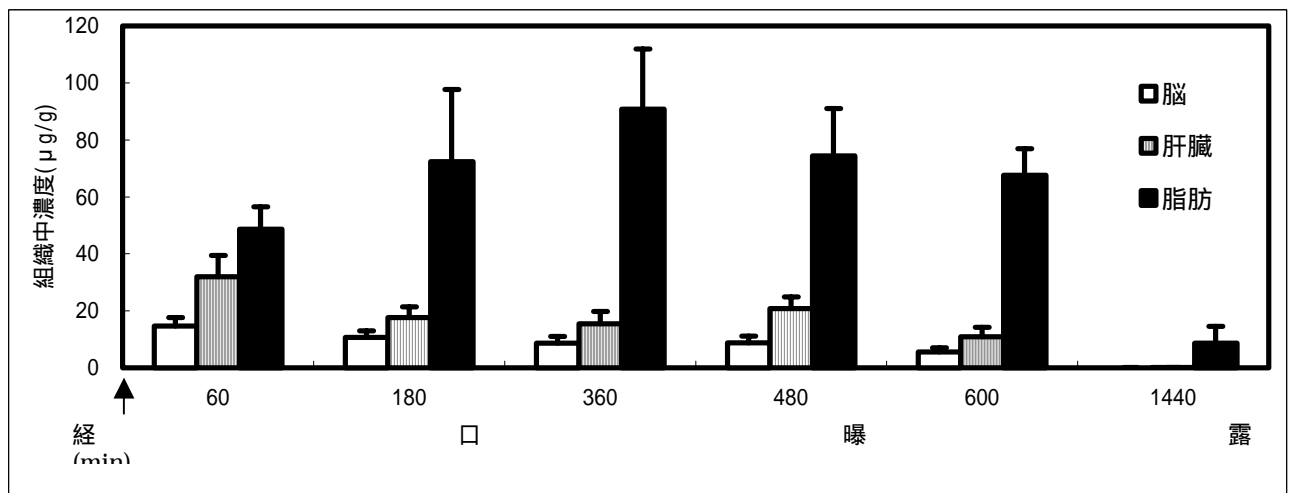


Figure 3-3-2. 複数媒体曝露群の経口曝露由来の組織中濃度

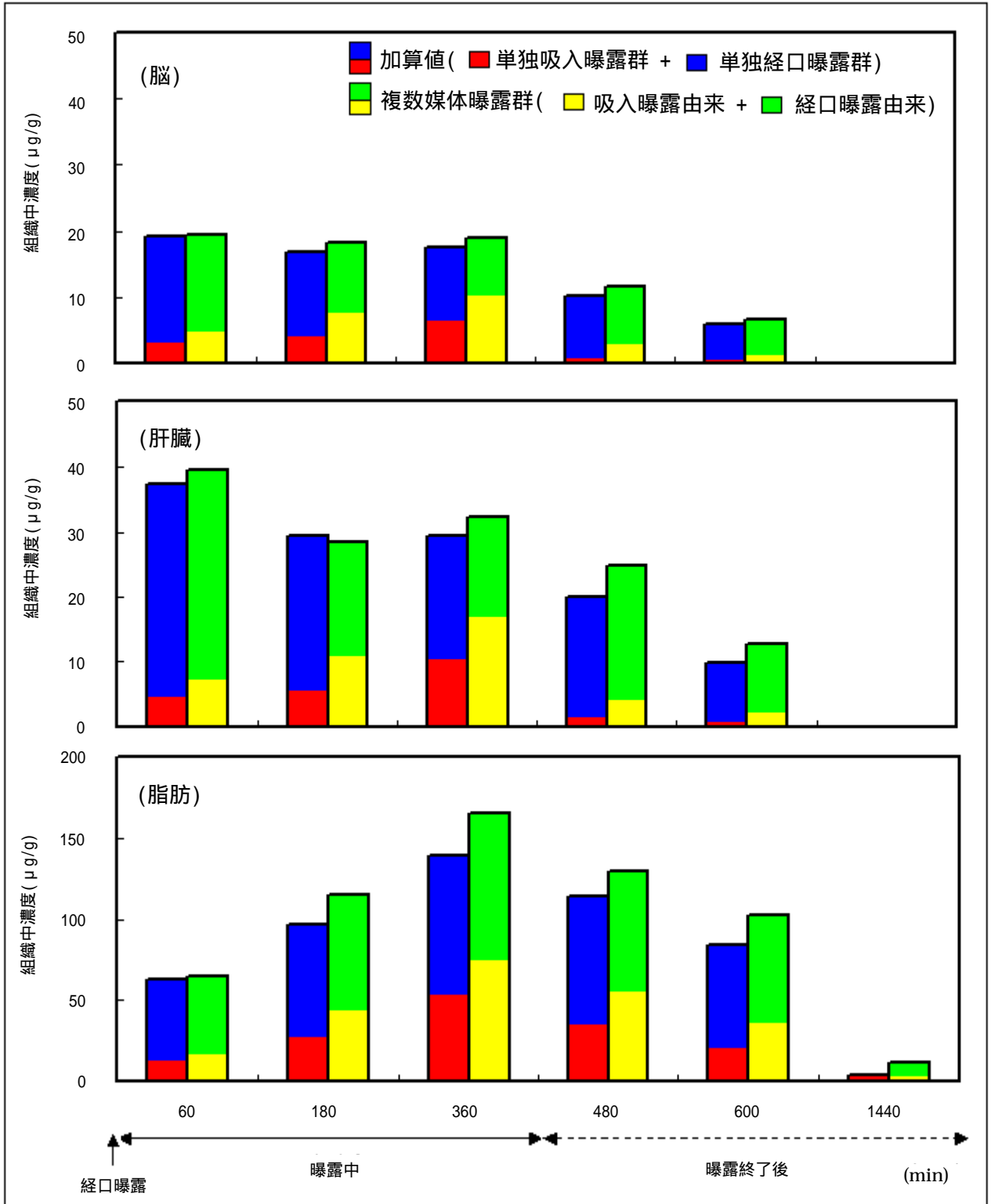


Figure 3-4. 組織中濃度の加算値

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	単独経口曝露群	複数媒体曝露群
血液中濃度測定群	B-C 群	B-I 群	B-G 群	B-G+I 群
	339 ± 7 ^a	339 ± 7	351 ± 7	353 ± 5
組織中濃度測定群	T-C 群	T-I 群	T-G 群	T-G+I 群
	349 ± 13	347 ± 9	356 ± 9	344 ± 6

^a 体重値の平均値(g) ± 標準偏差(g)

Table 2. 血液中濃度の加算値の比率

	30 分	60 分	180 分	360 分	480 分	600 分	1440 分
単独 ^a	1	1	1	1	1	1	1
複数 ^b	1.37 ^c	1.08	1.25	1.17	1.01	0.72	1.29

^a : 単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群の血液中濃度の加算値

^b : 複数媒体曝露群 (吸入曝露由来 + 経口曝露由来) の血液中濃度

^c : 単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群の血液中濃度の加算値を 1 とした時の複数媒体曝露群 (吸入曝露由来 + 経口曝露由来) の血液中濃度の比率

Table 3. 組織中濃度の加算値の比率

		60 分	180 分	360 分	480 分	600 分	1440 分
脳	単独 ^a	1	1	1	1	1	-
	複数 ^b	1.01 ^c	1.10	1.08	1.14	1.12	-
肝臓	単独	1	1	1	1	1	1
	複数	1.06	0.97	1.10	1.24	1.29	13.00
脂肪	単独	1	1	1	1	1	1
	複数	1.03	1.19	1.18	1.13	1.22	3.04

^a : 単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群の組織中濃度の加算値

^b : 複数媒体曝露群 (吸入曝露由来 + 経口曝露由来) の組織中濃度

^c : 単独吸入曝露群 + 単独経口曝露群の組織中濃度の加算値を 1 とした時の複数媒体曝露群 (吸入曝露由来 + 経口曝露由来) の組織中濃度の比率

3. 文献調査

(1) 調査対象化学物質の選定

複数媒体影響を検索する動物実験（メカニズム研究を含む）に供する化学物質の選定は、「調査対象物質選定フロー」（別紙 1 参照）に従って行った。すなわち、PRTR 法 3 5 4 物質について「黒本調査大気検出率上位リスト」（別紙 2 参照）と「黒本調査水質検出率上位リスト」（別紙 3 参照）および「PRTR 大気排出量上位リスト」（別紙 4 参照）と「PRTR 公共水域排出量上位リスト」（別紙 5 参照）を作成し、これらの資料およびその他環境媒体に関する情報を加味して候補物質群リスト（別添 6 参照）を作成した。この候補物質群から次の三つの観点を検討し、調査対象化学物質を選定した。

ヒトへの健康影響（発がん性を含む）が疑われる化学物質

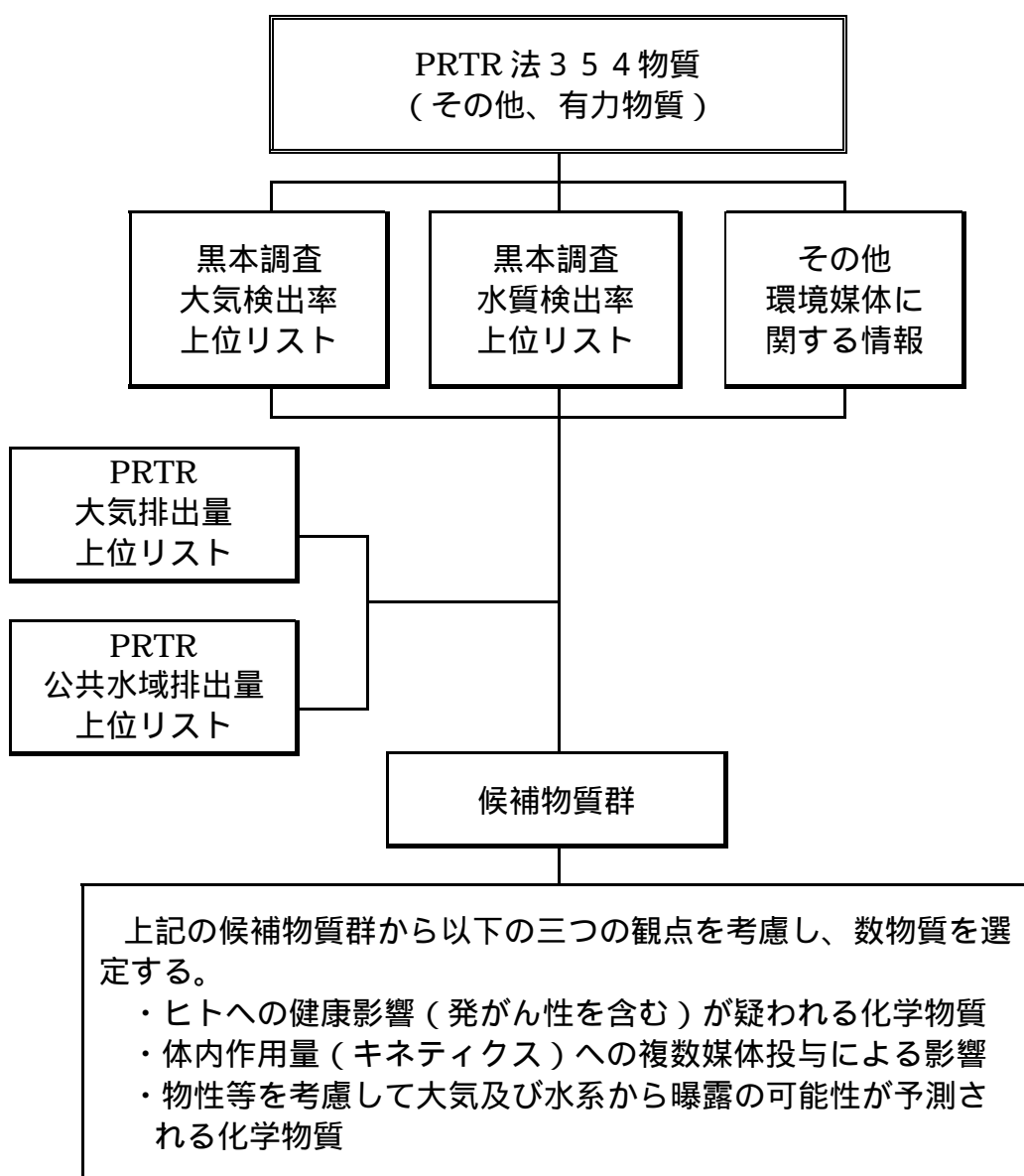
体内作用量（キネティクス）への複数媒体投与による影響

物性等を考慮して大気及び水系から曝露の可能性が予測される化学物質

平成 15 年度の調査対象化学物質は、動物実験では *N,N*-ジメチルホルムアミドおよびベンゼン、また、複数媒体影響の発生メカニズムに関する研究では *N,N*-ジメチルホルムアミド、ベンゼンおよびトルエンとした。

調査対象物質選定フロー

複数媒体影響を検索する動物実験に供する化学物質の選定は、以下のフローを考慮して行う。



順位	物質名	環境 (大気) 検出率 (%)	環境 (大気) 検出 点数	環境 (水質) 検出率 (%)	環境 (水質) 検出 点数	PRTR 大気 順位	PRTR 公共 水域 順位
1	トルエン	100	42/42	32	29/91	1	16
1	(m,p-)キシレン	100	42/42	9	12/137	2	28
1	1,1,1-トリクロロエタン	100	48/48	11	43/395	59	32
1	ジクロロメタン(別名塩化メチレン)	100	42/42			3	46
1	アセトニトリル	100	17/17	12	18/147	39	59
1	スチレン	100	42/42	0	0/36	8	68
1	エチルベンゼン	100	45/45	5	7/133	4	86
1	ポリ塩化ビフェニル(別名PCB)	100	45/45				116
1	p-ニトロフェノール	100	27/27	0	0/36		173
1	四塩化炭素	100	108/108	30	105/355	142	
11	テトラクロロエチレン	99	107/108	18	73/395	12	83
12	アセトアルデヒド	98	46/47	0	0/33	47	23
13	クロロメタン(別名塩化メチル)	96	46/48			9	78
13	クロロエタン	96	46/48			15	126
15	プロモメタン(別名臭化メチル)	92	36/39	0	0/60	28	148
15	3-メチルピリジン	92	45/49	4	6/165	77	64
17	フタル酸ジ-n-ブチル	87	45/49	17	5/30	80	82
18	クロロエチレン(別名塩化ビニル)	86	31/36	9	12/129	23	48
18	ニトロベンゼン	86	42/49	3	5/147	91	67
20	フェノール	85	40/47	50	15/30	25	24
21	p-ジクロロベンゼン	84	36/43	2	2/95	49	92
22	エチレンオキシド	82	42/51	0	0/17	31	40
23	クロロホルム	81	88/108	24	86/359	13	11
23	トリクロロエチレン	81	88/108	19	75/395	6	66
23	1,2-ジクロロエタン	81	39/68	41	66/161	21	71
23	ピリジン	81	43/53	18	6/33	78	26
27	アジピン酸ビス(2-エチルヘキシル)	79	26/33	3	1/33	93	129
28	-メチルスチレン	77	20/26	0	0/36	54	137
29	クロロベンゼン	75	24/32	0	0/36	68	
30	トリクロロフルオロメタン(別名CFC-11)	73	71/97			100	
30	りん酸トリ-n-ブチル	73	29/40	45	66/148		96
32	o-ジクロロベンゼン	67	20/30	0	0/95	43	70
33	1,2-エポキシプロパン(別名酸化プロピレン)	65	30/46	0	0/36	33	72
33	りん酸トリス(2-クロロエチル)	65	24/37	51	36/70	92	
33	1,4-ジオキサン	65	22/34	0	0/60	71	
36	エチレングリコールモノエチルエーテル	63	24/38			38	49
37	N,N-ジメチルホルムアミド	61	30/49	14	5/36	7	7
38	ジクロロジフルオロメタン(別名CFC-12)	39	38/97			74	
39	アクリロニトリル	38	15/40	0	0/162	22	22
40	cis-1,2-ジクロロエチレン	26	19/73	36	24/66	119	63
40	trans-1,2-ジクロロエチレン	26	19/73	8	6/78	76	154
42	ベンジル=クロリド(別名塩化ベンジル)	24	5/21	0	0/63	145	131
43	アリルアルコール	20	3/15		0/33	60	61
43	アクリル酸エチル	20	3/15	0	0/51	75	91
43	フタル酸ジ-n-ヘブチル	20	3/15	0	0/33	154	
46	酢酸ビニル	19	8/42	0	0/33	16	50
46	エチレングリコールモノメチルエーテル	19	8/43			18	57
48	2-アミノエタノール	18	9/51	15	24/156	58	34
49	メタクリル酸メチル	17	3/18	0	0/24	24	21
50	2-ビニルピリジン	14	7/50			128	77
50	-カプロラクタム	14	7/51	0	0/30	89	9
52	ペンタクロロニトロベンゼン(別名キントゼン又はPCNB)	10	5/48	0	0/57		
52	二硫化炭素	10	5/51	0	0/6	5	13
52	o-クロロトルエン	10	2/21	0	0/66	72	113
55	p-ニトロクロロベンゼン	9	5/54	0	0/150	164	121
56	1,1,2-トリクロロエタン	8	4/48	0	0/60	79	60
56	テレフタル酸ジメチル	8	3/38	0	0/18	185	
56	りん酸ジメチル=2,2-ジクロロビニル(別名ジクロロボス又はDDVP)	8	4/51	0	0/30	129	140
59	1,3-ジクロロ-2-プロパノール	6	1/18	0	0/33	124	27
59	N-メチルカルバミン酸 2-sec-ブチルフェニル(別名フェノブカルブ又はBPMC)	6	4/72	0	0/75	214	165
61	チオりん酸O,O-ジメチル-O-(3-メチル-4-ニトロフェニル)(別名フェニトロチオン又はMEP)	4	2/45	0	0/30	197	161
62	アニリン	2	1/42	1	1/141	110	29
62	N-メチルアニリン	2	1/42	4	3/69	175	

順位	物質名	環境 (水質) 検出率 (%)	環境 (水質) 検出 点数	環境 (大気) 検出率 (%)	環境 (大気) 検出 点数	PRTR 大気 順位	PRTR 公共 水域 順位
1	有機スズ化合物	75	109/145			158	87
2	グリオキサール	61	20/33			143	41
3	りん酸トリス(2-クロロエチル)	51	36/70	65	24/37	92	
4	フェノール	50	15/30	85	40/47	25	24
5	りん酸トリ-n-ブチル	45	66/148	73	29/40		96
6	1,2-ジクロロエタン	41	66/141	81	39/48	21	71
7	cis-1,2-ジクロロエチレン	36	24/66	26	19/73	119	63
8	1,3-ジチオラン-2-イリデンマロン酸ジイソプロピル(別名イソプロチオラン)	33	26/78	0	0/52		159
9	トルエン	32	26/78	100	42/42	1	16
10	四塩化炭素	30	105/355	100	108/108	142	
11	4,4'-イソプロピリデンジフェノール(別名ビスフェノールA)	28	41/148			112	111
12	クロロホルム	24	86/359	81	88/108	13	11
13	エチレンジアミン四酢酸	19	4/21				37
13	トリクロロエチレン	19	75/395	81	88/108	6	66
15	テトラクロロエチレン	18	73/395	99	107/108	12	83
15	ピリジン	18	6/33	81	43/53	78	26
15	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩(アルキル基の炭素数が10から14までのもの及びその混合物に限る。)	18	9/51			83	30
18	ベンゼン	17	19/112	*		11	51
18	フタル酸ジ-n-ブチル	17	5/30	87	13/15	80	82
18	エチレングリコール	17	2/24			20	3
21	2-アミノエタノール	15	24/156	18	9/51	58	34
22	N,N-ジメチルホルムアミド	14	5/36	61	30/49	7	7
23	アセトニトリル	12	18/147	100	17/17	39	59
24	1,1,1-トリクロロエタン	11	43/395	100	48/48	59	32
25	クロロエチレン(別名塩化ビニル)	9	12/129	86	31/36	23	48
25	(o-)キシレン	9	12/137	100	42/42	2	28
27	チオりん酸 S-ベンジル-O,O-ジイソプロピル(別名イプロベンホス又はIBP)	8	13/165	0	0/24		173
27	trans-1,2-ジクロロエチレン	8	6/78	26	19/73	76	154
27	2,4-ビス(エチルアミノ)-6-メチルチオ-1,3,5-トリアジン(別名シメトリン)	8	6/78			192	
30	2,2'-(イソプロピリデンビス[(2,6-ジプロモ-4,1-フェニレン)オキシ])ジエタノール	7	2/30				
31	エチルベンゼン	5	7/133	100	45/45	4	86
31	クロロ酢酸	5	1/21			141	38
31	ニトリロ三酢酸	5	1/21				
34	N-メチルアニリン	4	3/69	2	1/51	175	
34	o-アニシジン	4	2/48	0	0/51	194	
34	m-アミノフェノール	4	1/27				128
34	3-メチルピリジン	4	6/165	92	45/49	77	64
38	ニトロベンゼン	3	5/147	86	42/49	91	67
38	アジピン酸ビス(2-エチルヘキシル)	3	1/33	79	26/33	93	129
38	(p-)クレゾール	3	1/33			44	45
38	p-フェネチジン	3	1/39			188	
42	ジフェニルアミン	2	2/81			113	
42	N-ニトロソジフェニルアミン	2	2/81				
42	S-エチル=ヘキサヒドロ-1H-アゼピン-1-カルボチオアート(別名モリネート)	2	1/42	0	0/49		
42	p-ジクロロベンゼン	2	2/95	84	36/43	49	92
42	シクロヘキシルアミン	2	2/126			169	
47	アニリン	1	1/141	2	1/42	110	29

*:ベンゼンは大気汚染防止法対象物質での検出結果あり。

大気 順位	公共 水域 順位	物質名
1	16	トルエン
2	28	キシレン
3	46	ジクロロメタン (別名塩化メチレン)
4	86	エチルベンゼン
5	13	二硫化炭素
6	66	トリクロロエチレン
7	7	N,N-ジメチルホルムアミド
8	68	スチレン
9	78	クロロメタン (別名塩化メチル)
10		1,1-ジクロロ-1-フルオロエタン (別名H C F C -141 b)
11	51	ベンゼン
12	83	テトラクロロエチレン
13	11	クロロホルム
14		1-クロロ-1,1-ジフルオロエタン (別名H C F C -142 b)
15	126	クロロエタン
16	50	酢酸ビニル
17	81	クロロジフルオロメタン (別名H C F C -22)
18	57	エチレングリコールモノメチルエーテル
19	130	1,3,5-トリメチルベンゼン
20	3	エチレングリコール
21	71	1,2-ジクロロエタン
22	22	アクリロニトリル
23	48	クロロエチレン (別名塩化ビニル)
24	21	メタクリル酸メチル
25	24	フェノール
26	56	1,3-ブタジエン
27	19	ホルムアルデヒド
28	148	ブromoメタン (別名臭化メチル)
29		ジクロロペンタフルオロプロパン (別名H C F C -225)
30		テトラフルオロエチレン
31	40	エチレンオキシド
32	105	フタル酸ビス (2-エチルヘキシル)
33	72	1,2-エポキシプロパン (別名酸化プロピレン)
34	104	酢酸 2-エトキシエチル (別名エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート)
35	73	1,1-ジクロロエチレン (別名塩化ビニリデン)
36	1	ふっ化水素及びその水溶性塩
37	35	アクリル酸
38	49	エチレングリコールモノエチルエーテル
39	59	アセトニトリル
40	134	1,2-ジクロロプロパン
41	114	3-クロロプロペン (別名塩化アリル)
42	69	4,4'-イソプロピリデンジフェノールと1-クロロ-2,3-エポキシプロパンの重縮合物(別名ビスフェノールA型エポキシ樹脂)(液状のものに限る。)
43	70	o-ジクロロベンゼン
44	45	クレゾール
45	2	ほう素及びその化合物
46		イソプレン
47	23	アセトアルデヒド
48		2-クロロ-1,1,1,2-テトラフルオロエタン (別名H C F C -124)
49	92	p-ジクロロベンゼン
50	85	エピクロロヒドリン
51	44	メタクリル酸
52	52	アクリル酸メチル
53		2,2-ジクロロ-1,1,1-トリフルオロエタン (別名H C F C -123)
54	137	-メチルスチレン
55	88	1,3,5,7-テトラアザトリシクロ[3.3.1.1.3.7]デカン (別名ヘキサメチレントラミン)
56	33	鉛及びその化合物
57		メチル-1,3-フェニレン=ジイソシアネート (別名 m-トリレンジイソシアネート)
58	34	2-アミノエタノール
59	32	1,1,1-トリクロロエタン
60	61	アリルアルコール

公共水域 順位	大気 順位	物質名
1	36	ふっ化水素及びその水溶性塩
2	45	ほう素及びその化合物
3	20	エチレングリコール
4	63	マンガン及びその化合物
5	64	亜鉛の水溶性化合物
6	87	ポリ(オキシエチレン)=ノニルフェニルエーテル
7	7	N,N-ジメチルホルムアミド
8	104	ポリ(オキシエチレン)=アルキルエーテル(アルキル基の炭素数が12から15までのもの及びその混合物に限る。)
9	89	-カプロラクタム
10		トリクロロアセトアルデヒド
11	13	クロロホルム
12	84	エチレンジアミン
13	5	二硫化炭素
14	61	銅水溶性塩(錯塩を除く。)
15	135	N-(2-アミノエチル)-1,2-エタンジアミン(別名ジエチレントリアミン)
16	1	トルエン
17	214	チオ尿素
18	86	ニッケル化合物
19	27	ホルムアルデヒド
20	98	モリブデン及びその化合物
21	24	メタクリル酸メチル
22	22	アクリロニトリル
23	47	アセトアルデヒド
24	25	フェノール
25	69	クロム及び3価クロム化合物
26	78	ピリジン
27	124	1,3-ジクロロ-2-プロパノール
28	2	キシレン
29	110	アニリン
30	83	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩(アルキル基の炭素数が10から14までのもの及びその混合物に限る。)
31	210	O-エチル=O-4-ニトロフェニル=フェニルホスホノチオアート(別名E P N)
32	59	1,1,1-トリクロロエタン
33	56	鉛及びその化合物
34	58	2-アミノエタノール
35	37	アクリル酸
36	101	6価クロム化合物
37		エチレンジアミン四酢酸
38	141	クロロ酢酸
39	151	テレフタル酸
40	31	エチレンオキシド
41	143	グリオキサール
42	85	砒素及びその無機化合物
43	177	ヒドロキノン
44	51	メタクリル酸
45	44	クレゾール
46	3	ジクロロメタン(別名塩化メチレン)
47	126	ニッケル
48	23	クロロエチレン(別名塩化ビニル)
49	38	エチレングリコールモノエチルエーテル
50	16	酢酸ビニル
51	11	ベンゼン
52	52	アクリル酸メチル
53	131	コバルト及びその化合物
54	108	ヒドラジン
55	103	セレン及びその化合物
56	26	1,3-ブタジエン
57	18	エチレングリコールモノメチルエーテル
58	178	ピペラジン
59	39	アセトニトリル
60	79	1,1,2-トリクロロエタン
61	60	アリルアルコール
62	214	N,N-ジエチルチオカルバミン酸S-4-クロロベンジル(別名チオベンカルブ又はベンチオカーブ)
63	119	cis-1,2-ジクロロエチレン
64	77	3-メチルピリジン
65	118	カドミウム及びその化合物
66	6	トリクロロエチレン

別紙 6

候補物質群リスト

順位 PRTR 大気と 公共用水域 順位合計	(政令番号) 物質和名 物質英名	PRTR 大気 排出量 (kg/年) [順位]	PRTR 公共用水域 排出量 (kg/年) [順位]	環境調査(大気) 検出数/検体数 検出範囲 (ng/m ³) (定量下限) 実施年度	環境調査(水質) 検出数/検体数 検出範囲 (ppb) (定量下限) 実施年度	用途	許容濃度 ACGIH (産衛)	IARC 発がん性分類	健康影響	性状
1 [14]	(172) N,N-ジメチルホルムアミ ド N,N-dimethylformamide	6,314,905 [7]	289,435 [7]	30/49 20-620 (20) H10	5/36 0.08-0.11 (0.07) H10	溶剤(有機合成、ポリマー、 色素)、ガス吸収剤	10(10)ppm	グループ 3 (産衛 2B)	動物実験では肝臓への影響、また催奇 形性が報告されている。ヒトでは肝毒 性、アルコール不耐症が報告されてい る。	b.p.:153 ,m.p.: -61 ,v.p.:3.7mmHg アミノ臭のある液体、水に 1:1 で溶ける。 無機化合物と付加化合物をつくり溶 かす。
2 [17]	(227) トルエン toluene	131,669,0 42 [1]	114,959 [16]	42/42 1100-85000 (8) H10	29/91 0.03-2.7 (0.03) S61	染料、香料、火薬、有機顔料、 甘味料、漂白剤、ソルバール酸	50(50)ppm	グループ 3	動物実験では肝及び腎毒性が報告さ れている。ヒトでは神経作用、騒音に よる聴力障害促進が報告されている。	b.p.:110.6 ,m.p.: -95 , v.p.:22mmHg 水溶解度 526mg/L(25) 屈折率の大きい可燃性液体
3 [30]	(63) キシレン xylene	52,383,91 7 [2]	42,464 [28]	m,p-xylene: 42/42 550-35000 (100) H10	o-xylene: 12/137 0.04-1.2 (0.03) S61	合成原料(染料、有機顔料、香 料、可塑剤、医薬品)、溶剤(塗 料、農薬、石油精製)	100(50)ppm	グループ 3	動物実験では体重増加抑制、血液、肝 臓、腎臓への影響が報告されている。 ヒトでは急性毒性、刺激性、中枢神経 への影響が報告されている。	b.p.:140 ,v.p.:7.99mmHg(25) 水溶解度 106mg/L(25) o,m,p 体の混合物
4 [49]	(266) フェノール phenol	714,975 [25]	59,686 [24]	40/47 50.1-760 (50) H8	15/30 0.066-0.7 (0.03) H10	消毒剤、合成原料(ヒ ^レ クリン酸、サ ルチル酸、フェニチン、合成樹脂、染 料中間体)	5(5)ppm	グループ 3	動物実験では肝、腎毒性及び生殖、発 生毒性が報告されている。 ヒトでは腎障害、メトヘモグロビン血 症、神経系への影響が報告されてい る。	b.p.:181.75 ,m.p.:40.90 , v.p.:0.35mmHg 水溶解度:82.8g/L(25)白色結晶 大気中から水分を吸収して液化する。
5 [62]	(299) ベンゼン benzene	2,416,276 [11]	14,775 [51]	註1)参照	19/112 0.03-2.1 (0.03) S61	合成原料(染料、合成ゴム、合 成洗剤、有機顔料、医薬品)、 溶剤	0.5ppm (発がん物質)	グループ 1 ラット:多臓器腫瘍 マウス:白血病,多臓器腫瘍	動物実験では造血器官(骨髄)及び免 疫系(脾臓、リンパ節、胸腺)への影響が 報告されている。 ヒトでは骨髄造血機能の低下等が報 告されている。	b.p.:80.1 ,m.p.:5.5 , v.p.:100mmHg(26.1) 無色透明の揮発性液体 水溶解度 1.8g/L(25)
6 [71]	(211) クロロエチレン (別名 塩化ビニル) chloroethylene (vinylchloride)	805,218 [23]	15,552 [48]	31/36 16-1300 (14) H10	12/129 0.114-0.25 (0.011) H9	ポリ塩化ビニル、塩化ビニル、酢酸 ビニル共重合体の合成	1(2.5)ppm	グループ 1 ラット,マウス: 乳腺,肺,シソナル腺,皮膚 腫瘍及び肝臓血管肉腫	動物実験では肝臓、腎臓、心臓、脾臓等 への影響が報告されている。ヒトでは 職業性暴露により指端骨溶解、レイノ ー症候等が報告されている。	b.p.: -13.37 ,m.p.: -153.8 , v.p.:2660mmHg(25) 水溶解度 2.7g/L 引火性を有する気体
7 [72]	(211) トリクロロエチレン trichloroethylene	6,316,735 [6]	5,597 [66]	88/108 0.01-1.5ppb (0.01-1.5) S58 註2)参照	75/395 0.29-12 (0.2-1) S50	溶剤、脱脂洗浄剤、フロンガス製 造溶剤(生ゴム、染料等)	50(25)ppm	グループ 2A ラット:精巣及び腎腫瘍 マウス:肝腫瘍	動物実験では刺激性、肝臓、腎臓、中枢 神経系への影響が報告されている。ヒ トでは神経系、呼吸器系、心臓脈管系 等への影響が報告されている。	b.p.:87 ,m.p.: -73 , v.p.:57.8mmHg(20) 重い可動性で不燃性の液体 水溶解度:1.1g/L(25)
8 [91]	(209) 1,1,1-トリクロロエタン 1,1,1-trichloroethane	48,803 [59]	35,362 [32]	48/48 17-420 (12) H13	43/395 0.06-5.4 (0.05-0.4) S50	合成原料、試薬	350(200)ppm	グループ 3	動物実験では中枢神経系及び肝臓へ の影響が報告されている。ヒトでは中 枢神経への影響が報告されている。	b.p.:74.0 ,m.p.: -30.4 , v.p.:16.5kPa 水溶解度 4.4g/L(20) 揮発性液体であるが、不燃性
9 [95]	(200) テトラクロロエチレン tetrachloroethylene	2,332,321 [12]	2,218 [83]	107/108 0.01-1.5ppb (0.008-0.02) S58 註3)参照	73/395 0.15-9.5 (0.06-0.2) S50	ドライクリーニング用洗剤、洗浄剤、 合成原料	25ppm 産衛:検討中	グループ 2A ラット:白血病 マウス:肝腫瘍	動物実験では中枢神経系、肝臓、腎臓 への影響が報告されている。ヒトでは 中枢神経系、肝臓、肺への影響が報告 されている。	b.p.:121 ,f.p.: -19 , v.p.:18.47mmHg(25) 不燃性液体 水溶解度 0.15g/L(25)

順位 PRTR 大気と 公共用水域 順位合計	(政令番号) 物質和名 物質英名	PRTR 大気 排出量 (kg/年) [順位]	PRTR 公共用水域 排出量 (kg/年) [順位]	環境調査(大気) 検出数/検体数 検出範囲 (ng/m ³) (定量下限) 実施年度	環境調査(水質) 検出数/検体数 検出範囲 (ppb) (定量下限) 実施年度	用途	許容濃度 ACGIH (産衛)	IARC 発がん性分類	健康影響	性状
10 [98]	(12) アセトニトリル acetonitrile	266,554 [39]	8,225 [59]	17/17 93-1200 (76) H13	18/147 1.1-7.4 (1) H4	ビタミン B1、削刀剤の製造原料、 合成繊維の溶剤	20ppm	評価なし	動物実験では肺及び腎臓への影響が報告されている。ヒトではシアン化物への変化に起因した中毒症状が報告されている。	b.p.:81.6 , m.p.: -45 , v.p.:87mmHg(24)無色の液体で水に1:1で溶ける。加温及び酸の影響下で重合することがある。
11 [141]	(140) p-ジクロロベンゼン p-dichlorobenzene	99,610 [49]	1,336 [92]	36/43 160-17000 (130) H11	2/95 0.5-1 (0.3-3) S50	染料中間物、殺虫剤、有機合成、防臭剤、農薬	10(10)ppm	グループ 2B ラット：腎腫瘍 マウス：肝腫瘍	動物実験では肝臓、腎臓への影響が報告されている。ヒトでは血液系及び肝臓への影響が報告されている。	b.p.:173.7 , m.p.:53 v.p.:1.74mmHg(25) 水溶解度 76mg/L(25) 白色結晶、揮発性(昇華)
12 [182]	(118) cis-1,2-ジクロロエチレン cis-1,2-dichloroethylene	2,261 [119]	7,048 [63]	19/73 10-160 (10) S62	24/66 0.005-0.54 (0.005) S62	洗剤	200(150)ppm	評価なし	動物実験ではラット肝、腎の重量増加が報告されている。ヒトでは嘔吐、中枢神経系の抑制、刺激性が報告されている。	b.p.:60.3 , m.p.: -80.5 v.p.:200mmHg(25) 水溶解度:3.5g/L(25)
13 [230]	(119) trans-1,2-ジクロロエチレン trans-1,2-dichloroethylene	19,880 [76]	10 [154]	19/73 10-160 (10) S62	6/78 0.077-0.23 (0.01)	洗剤	200(150)ppm	評価なし	動物実験では催奇形性試験(ラット)、発生毒性(胎児死亡と体重減少)が報告されている。ヒトでは嘔吐、中枢神経系の抑制、刺激性が報告されている。	b.p.:48 , m.p.: -50 , v.p.:395mmHg(30) 水溶解度:6.3g/L(25)

註1) ベンゼン：2.2µg/m³(環境基準値:3µg/m³)

註2) トリクロロエチレン：1.3µg/m³(環境基準値:200µg/m³)

註3) テトラクロロエチレン：0.52µg/m³(環境基準値:200µg/m³)

なお、上記の註1)、註2)及び註3)は、「大気汚染防止法に基づき実施された平成13年度地方公共団体における有害大気汚染物質モニタリング調査結果」(平成14年10月)を引用した。

(2) EPA; Framework for Cumulative Risk Assessment 要 約

この累積的リスク評価のためのフレームワーク報告書は、累積的リスク評価ガイドラインを開発するための長期的努力の第一歩である。その主な目的は、米国環境保護庁(EPA)内での累積的リスク評価を指揮し、評価するために、単純で柔軟な骨組みを提供することである。このフレームワーク報告書は、将来のガイドラインを開発する基礎として役立つとはいえ、それは手続き的なガイドでも EPA の法的規制でもなく、それは経験によってさらに発展が期待される。この報告書は、EPA 内の累積的リスク評価への一貫したアプローチを促進し、重要な問題を識別し、これらの評価において使用される用語を定義するように意図されている。

このフレームワークは、必要に応じて、検討される広い分野のレイアウトを行うことになっている。このフレームワークで議論されたいくつかの分野では、リスク分析を行うための方法論がまだ存在していないかもしれない。Appendix A に、研究が必要な分野の要約を示した。

この報告書において、「累積的リスク」とは「多数の作用因子あるいはストレッサーへの総計の曝露からの結合したリスク」を意味する。いくつかのキーポイントは累積的リスクのこの定義に由来する。第一に、「累積的リスク評価」の定義では、累積的リスクは多数の作用因子あるいはストレッサーを含み、単一の化学物質あるいはストレッサーの評価を意味しない。第二に、「作用因子あるいはストレッサー」は化学物質のみであるという制限はない。さらに、直接あるいは間接的に、生息地のようなものの変化や消失を引き起こす生物学的あるいは物理学的作用因子あるいはその活動かもしれない。第三に、この定義は、多数の作用因子あるいはストレッサーからのリスクが複合していることを必要とする。これは、リスクが「加算される」べきであることを必ずしも意味するものではなく、むしろ、ある分析は様々な作用因子あるいはストレッサーの相互作用からのリスクをどのように判断するかを導くべきからである。さらに、それは多くの化学物質あるいは他のストレッサーをカバーする評価を意味するが、他の化学物質の示すリスクを考えずに、単に各化学物質をリストすることは、この定義の下の累積的リスク評価ではない。

この報告書における「累積的リスク評価」は、「多数の作用因子あるいはストレッサーから、健康あるいは環境への結合したリスクの分析、特性記述、および可能な定量化」を意味する。この定義の1つの要点は、それが他の必要条件を満たす限り、累積的リスク評価が必ずしも定量的である必要がないということである。

このフレームワーク自体は、人の健康とリスクアセスメントについては、同じ概念によるが、いくつかの分野では独特なものがある。まず初めに、一つを越える作用因子あるいはストレッサーの結合影響上の焦点は、いずれの場合も、多数のストレッサーが評価される場合、通常個々に評価され、あたかも他のものが存在しないかのように評価されている、今日までの他の多くの評価とは異なるようにすべきである。次に、多数のストレッサーが同じ集団に影響しているため、仮の受容器上ではなく、潜在的に影響を受けた特定の集団に多くの問題点が生じる。第3に、累積的リスクの考察は、従来のリスク評価を行うより広い種類への非化学的なストレッサーの関心を生じさせるかもしれない。

フレームワークは次の累積的リスク評価の3つのメインフェーズについて記述する：(1)立案、範囲設定および問題公式化、(2)分析、そして(3)リスク特性記述。第1のフェーズでは、リスク管理者、リスク評価者および他のステークホルダーのチームが、評価の目標、範囲、深さおよび焦点を確立する。このフェーズの最終成果物は、概念モデルおよび分析計画である。概念モデルは、評価すべきストレッサー、評価すべき衛生あるいは環境影響、および様々なストレッサー曝露と

潜在的な影響の関係を確立する。分析計画は、必要とされるデータ、得られるアプローチ、および分析フェーズ中に期待される結果の種類を展開する。

分析フェーズは、暴露のプロフィールを作成すること、(もしあれば)ストレス間の相互作用を熟慮すること、また評価する集団(単独または複数)に対するリスクを予測することを含んでいる。このフェーズにおいて、混合物の毒性、集団の脆弱性(弱み)あるいは化学物質か非化学物質かもしれないストレス間の相互作用のような技術的に困難な問題に取り組み、そして解決するであろう。このフェーズの最終成果物は、研究対象集団(単独または複数)が暴露された多数のストレスからのリスクの分析である。

第3のフェーズ、リスク特性記述(リスク解釈)は、評価の信頼度および評価に対する総合的な確かさに対する展望(将来の見通し)に、リスク評価を加える。さらに、このフェーズにおいては、評価がフェーズ1において述べられた目的および目標を達成したかどうかの評価も含まれる。

このフレームワーク報告書での累積的リスクの議論は、トピックを広くとらえて、たとえばすべての質問を検討するための技術が現在存在しなくとも、今後導かれるかもしれない評価の多くのフェーズを考えられる限り含んでいる。さらに、それは、EPAの現在の立法権限外である累積的リスクの特徴を含み、また、EPA外部の専門家が、発生した場所はどこかという疑問に取り組む必要があった。これらの面は、技術的な完全性のためにここで議論されるもので、EPAがそのすべてのリスク評価(-そのすべての累積的リスク評価さえ)における累積的リスク評価のあらゆる面を実行することの勧告として議論されるものではない。しかしながら、このフレームワークは、少なくともリスク評価の分野で、EPAがその様々な立法の権限の必要条件を統合し始める機会になるかもしれない。

EPAは、現在、累積的リスク評価の様々なフェーズでの活動に従事している。このフレームワーク報告書での累積的リスクの広い解釈は、これらの活動が大局的見地でどのように位置付けられるかがわかり、活動がフレームワークの下でともに関連するか例証することができる。個々のプログラム部局および地域は、立法権限あるいは他の基準に基づいて、範囲、ストレスのタイプ、あるいはそれらのプログラムで累積的リスク評価のために使用された方法に影響するか決定を下さなければならないかもしれない。この報告書においては、累積的リスク評価の利用が命令されたり、特定の場合にその方法が指示されるというような解釈をすべきではない。

同様に、この報告書はコミュニティの意思決定に必要なリスクあるいは考察すべてに取り組む手順をレイアウトする試みではない。もっと正確に言えば、それは、評価のフェーズを十分に分析するか評価するために、方法あるいはデータが現在は存在してもしなくても、累積的リスクの様々なフェーズについて記述することに焦点を当てた情報ドキュメントである。現在の科学の限界から、近い将来に行われる累積的リスク評価が、ステークホルダーまたは関心のある人々によって出された質問すべてに、十分に答えることができない。しかしながら、これは、それらが質問のうちのいくつかに答えることができないことを意味するのではなく、実際、累積的リスク評価は複合のストレスの影響力を扱う、ある種の質問に取り組むことができる最良のツールとなるであろう。

総括

平成15年度は、水系、大気系のいずれの環境中においても検出される化学物質について、前年度までの調査に引続き複数媒体影響に関する調査を実施した。

1. 動物実験

水系、大気系のいずれの環境中においても検出される化学物質、*N,N*-ジメチルホルムアミドおよびベンゼンについて、長期毒性試験（2年間）の予備的な調査として、ラットを用いた28日間複数媒体（吸入及び経口）曝露試験を実施した。

- (1) *N,N*-ジメチルホルムアミドについては、複数媒体曝露群の肝臓に単細胞壊死および肝細胞増殖が認められた。そこで、増殖細胞核抗原（PCNA）免疫染色陽性細胞を測定したところ、その出現率に複数媒体影響（吸入曝露と経口曝露の相加あるいはそれ以上の影響）が認められた。
- (2) ベンゼンについては、血液学的検査、血液生化学的検査および臓器重量に毒性影響がみられたが、その影響は主として吸入曝露による影響が大きく、複数媒体影響を受けた項目は見出せなかった。

2. 複数媒体影響の発生メカニズムに関する研究

N,N-ジメチルホルムアミド、ベンゼンおよびトルエンについて、血液や標的臓器における投与物質や代謝物の濃度を測定することにより、複数媒体曝露による健康影響の発生メカニズムを体内動態の面から研究した。

- (1) *N,N*-ジメチルホルムアミド：血液中および組織中の未変化体濃度は、単独経路曝露群の加算値（単独吸入曝露群値+単独経口曝露群値）に比べ複数媒体曝露群が高く、複数媒体影響の可能性が示唆された。
- (2) ベンゼン：血液中未変化体濃度に関しては僅かながら複数媒体曝露の影響がみられた。
- (3) トルエン：血液・組織中濃度に関して、複数媒体曝露の影響がみられなかった。

3. 文献調査

- (1) 調査対象物質として *N,N*-ジメチルホルムアミド、ベンゼンおよびトルエンを選定した。
- (2) 複合媒体影響研究の動向を把握するために、EPA の Framework for Cumulative Risk Assessment を抄訳、検討した。

文献調査の結果、複数媒体曝露による健康影響を調査すべき物質として *N,N*-ジメチルホルムアミド、ベンゼンおよびトルエンを選定した。*N,N*-ジメチルホルムアミドおよびベンゼンについての動物実験の結果、長期動物実験の実施のための予備的なデータが得られた。特に *N,N*-ジメチルホルムアミドについては、複数媒体影響の可能性を示唆する結果が得られた。また、複数媒体影響の発生メカニズムに関する研究の結果、血液や組織における化学物質の動態に関する基礎的なデータが得られ、この結果は複数媒体影響のスクリーニング手法として利用できる可能性が示された。