

クロロホルムのラット及びマウスを用いた
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：ラット/0115；マウス/0116

平成6年2月25日

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

クロロホルムのラット及びマウスを用いた
吸入によるがん原性試験報告書

本 文

目 次	頁
要 約	1
ク ロ ロ ホ ル ム に つ い て	3
I 試 験 材 料	
I - 1 被 験 物 質 の 使 用 ロ ッ ト 等	9
I - 2 被 験 物 質 の 同 一 性 ・ 安 定 性	9
I - 2 - 1 同 一 性	9
I - 2 - 2 安 定 性	9
I - 3 試 験 動 物	9
II 試 験 方 法	
II - 1 投 与	
II - 1 - 1 投 与 経 路、投 与 方 法 及 び 投 与 期 間	10
II - 1 - 2 投 与 濃 度	10
II - 1 - 3 被 験 物 質 の 発 生 方 法 と 濃 度 調 整	10
II - 1 - 4 被 験 物 質 の 濃 度 測 定	10
II - 2 動 物 管 理	
II - 2 - 1 群 分 け 及 び 個 体 識 別 方 法	11
II - 2 - 2 飼 育 条 件	11
II - 3 観 察 ・ 検 査 項 目 及 び 方 法	
II - 3 - 1 動 物 の 一 般 症 状 の 観 察	12
II - 3 - 2 体 重 測 定	12
II - 3 - 3 摂 餌 量 測 定	12
II - 3 - 4 血 液 学 的 検 査	12
II - 3 - 5 血 液 生 化 学 的 検 査	12
II - 3 - 6 尿 検 査	13
II - 3 - 7 病 理 学 的 検 査	13
II - 4 数 値 処 理 と 統 計 学 的 方 法	
II - 4 - 1 数 値 の 取 扱 い と 表 示	14
II - 4 - 2 母 数 の 取 扱 い と 表 示	14
II - 4 - 3 統 計 方 法	15
II - 5 試 資 料 の 保 管	15

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 ラットを用いた試験

Ⅲ-1-1 動物の状態観察	16
(1) 生死状況	16
(2) 一般状態	16
(3) 体重	16
(4) 摂餌量	17
Ⅲ-1-2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査	17
(1) 血液学的検査	17
(2) 血液生化学的検査	17
(3) 尿検査	17
Ⅲ-1-3 病理学的検査	18
(1) 剖検	18
(2) 臓器重量	18
(3) 病理組織学的検査	18
(4) 死因	19

Ⅲ-2 マウスを用いた試験

Ⅲ-2-1 動物の状態観察	20
(1) 生死状況	20
(2) 一般状態	20
(3) 体重	20
(4) 摂餌量	21
Ⅲ-2-2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査	21
(1) 血液学的検査	21
(2) 血液生化学的検査	21
(3) 尿検査	21
Ⅲ-2-3 病理学的検査	22
(1) 剖検	22
(2) 臓器重量	22
(3) 病理組織学的検査	22
(4) 死因	24

Ⅳ 考察 25

Ⅴ 結論 31

Ⅵ 文献 32

T A B L E S

- TABLE 1 EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS
IN THE INHALATION STUDIES OF CHLOROFORM
- TABLE 2 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT
(TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 3 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT
(TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 4 INCIDENCE AND TIME OF MASS OCCURRENCE (CLINICAL OBSERVATION)
:RAT :MALE
- TABLE 5 INCIDENCE AND TIME OF MASS OCCURRENCE (CLINICAL OBSERVATION)
:RAT :FEMALE
- TABLE 6 FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT (TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 7 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT (TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 8 CAUSE OF DEATH : RAT
- TABLE 9 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE
(TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 10 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE
(TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 11 INCIDENCE AND TIME OF MASS OCCURRENCE (CLINICAL OBSERVATION)
:MOUSE :MALE
- TABLE 12 INCIDENCE AND TIME OF MASS OCCURRENCE (CLINICAL OBSERVATION)
:MOUSE :FEMALE

T A B L E S (CONTINUED)

TABLE 13 FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE (TWO-YEAR STUDY)

TABLE 14 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE (TWO-YEAR STUDY)

TABLE 15 NEOPLASTIC LESIONS (KIDNEY)
INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS : MOUSE : MALE

TABLE 16 NUMBER OF MOUSE WITH SELECTED KIDNEY LESIONS

TABLE 17 NEOPLASTIC LESIONS (LIVER)
INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS : MOUSE : MALE

TABLE 18 NEOPLASTIC LESIONS (LIVER)
INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS : MOUSE : FEMALE

TABLE 19 NUMBER OF MOUSE WITH SELECTED LIVER LESIONS

TABLE 20 CAUSE OF DEATH : MOUSE

F I G U R E S

FIGURE 1 CHOLOROFORM VAPOR GENERATION SYSTEM AND INHALATION SYSTEM

FIGURE 2 SURVIVAL ANIMAL RATE : RAT:MALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 3 SURVIVAL ANIMAL RATE : RAT:FEMALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 4 BODY WEIGHT CHANGES : RAT:MALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 5 BODY WEIGHT CHANGES : RAT:FEMALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 6 FOOD CONSUMPTION : RAT:MALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 7 FOOD CONSUMPTION : RAT:FEMALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 8 SURVIVAL ANIMAL RATE : MOUSE:MALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 9 SURVIVAL ANIMAL RATE : MOUSE:FEMALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 10 BODY WEIGHT CHANGES : MOUSE:MALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 11 BODY WEIGHT CHANGES : MOUSE:FEMALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 12 FOOD CONSUMPTION : MOUSE:MALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 14 FOOD CONSUMPTION : MOUSE:FEMALE(TWO-YEAR STUDY)

P H O T O G R A P H S

- PHOTOGRAPH 1 NASAL CAVITY (ETHMOTURBINATE), NORMAL
RAT, MALE, Control, ANIMAL NO. 0115-1001
(H. E., X60)
- PHOTOGRAPH 2 NASAL CAVITY (ETHMOTURBINATE), OSSEOUS METAPLASIA : A
AND INFLAMMATION OF OLFACTORY EPITHELIUM : B
RAT, MALE, 90ppm, ANIMAL NO. 0115-1349
(H. E., X60)
- PHOTOGRAPH 3 KIDNEY, LARGE CYSTIC NODULE : A
MOUSE, MALE, 90ppm, ANIMAL NO. 0116-1338
- PHOTOGRAPH 4 KIDNEY, RENAL CELL CARCINOMA : A
MOUSE, MALE, 90ppm, ANIMAL NO. 0116-1338
(H. E., X30)
- PHOTOGRAPH 5 KIDNEY, RENAL CELL ADENOMA : A
MOUSE, MALE, 30ppm, ANIMAL NO. 0116-1240
(H. E., X150)
- PHOTOGRAPH 6 KIDNEY, RENAL CELL ADENOMA : A
MOUSE, MALE, 30ppm, ANIMAL NO. 0116-1246
(H. E., X60)
- PHOTOGRAPH 7 KIDNEY, CYSTIC TUBULAR CELL HYPERPLASIA : A
MOUSE, MALE, 90ppm, ANIMAL NO. 0116-1349
(H. E., X150)
- PHOTOGRAPH 8 KIDNEY, CYSTIC TUBULAR CELL HYPERPLASIA : A
MOUSE, MALE, 90ppm, ANIMAL NO. 0116-1321
(H. E., X150)
- PHOTOGRAPH 9 LIVER, HEPATOCELLULAR CARCINOMA : A
MOUSE, FEMALE, 90ppm, ANIMAL NO. 0116-2243
(H. E., X60)
- PHOTOGRAPH 10 LIVER, HEPATOCELLULAR ADENOMA : A
MOUSE, FEMALE, 90ppm, ANIMAL NO. 0116-2319
(H. E., X30)
- PHOTOGRAPH 11 LIVER, FATTY CHANGE : A
MOUSE, MALE, 90ppm, ANIMAL NO. 0116-1318
(H. E., X150)
- PHOTOGRAPH 12 LIVER, CENTROLOBULAR VACUOLIC CHANGE : A
MOUSE, FEMALE, 90ppm, ANIMAL NO. 0116-2309
(H. E., X150)

P H O T O G R A P H S (CONTINUED)

- PHOTOGRAPH 13 NASAL CAVITY(OLFACTORY EPITHELIUM), NORMAL : A
MOUSE, MALE, Control, ANIMAL NO.0116-1005
(H.E., X300)
- PHOTOGRAPH 14 NASAL CAVITY(OLFACTORY EPITHELIUM), ATROPHY : A
MOUSE, MALE, 90ppm, ANIMAL NO.0116-1302
(H.E., X300)
- PHOTOGRAPH 15 NASAL CAVITY(NASAL GLAND), NORMAL : A
MOUSE, FEMALE, Control, ANIMAL NO.0116-2002
(H.E., X300)
- PHOTOGRAPH 16 NASAL CAVITY(NASAL GLAND), RESPIRATORY METAPLASIA : A
MOUSE, FEMALE, 90ppm, ANIMAL NO.0116-2304
(H.E., X300)
- PHOTOGRAPH 17 NASAL CAVITY(RESPIRATORY EPITHELIUM), NORMAL : A
MOUSE, FEMALE, Control, ANIMAL NO.0116-2002
(H.E., X300)
- PHOTOGRAPH 18 NASAL CAVITY(RESPIRATORY EPITHELIUM), EOSINOPHILIC CHANGE : A
MOUSE, FEMALE, 90ppm, ANIMAL NO.0116-2304
(H.E., X300)
- PHOTOGRAPH 19 NASAL CAVITY(NASAL SEPTUM), NORMAL
MOUSE, MALE, Control, ANIMAL NO.0116-1005
(H.E., X60)
- PHOTOGRAPH 20 NASAL CAVITY(NASAL SEPTUM), OSSEOUS METAPLASIA : A
MOUSE, MALE, 90ppm, ANIMAL NO.0116-1302
(H.E., X60)

A P P E N D I X E S

- APPENDIX A 1 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX A 2 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX A 3 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX A 4 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX B 1 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX B 2 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 3 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 4 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX C 1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX C 2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX C 3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX C 4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX D 1 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX D 2 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX D 3 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX D 4 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX E 1 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 RAT:MALE
- APPENDIX E 2 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 RAT:FEMALE
- APPENDIX E 3 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 MOUSE:MALE
- APPENDIX E 4 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 MOUSE:FEMALE
- APPENDIX F 1 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 RAT:MALE
- APPENDIX F 2 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 RAT:FEMALE
- APPENDIX F 3 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 MOUSE:MALE
- APPENDIX F 4 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 MOUSE:FEMALE
- APPENDIX G 1 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX G 2 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX G 3 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX G 4 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX G 5 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX G 6 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX G 7 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX G 8 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
 MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX H 1 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), ABSOLUTE
RAT:MALE
- APPENDIX H 2 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), ABSOLUTE
RAT:FEMALE
- APPENDIX H 3 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), ABSOLUTE
MOUSE:MALE
- APPENDIX H 4 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), ABSOLUTE
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX I 1 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), RELATIVE
RAT:MALE
- APPENDIX I 2 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), RELATIVE
RAT:FEMALE
- APPENDIX I 3 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), RELATIVE
MOUSE:MALE
- APPENDIX I 4 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), RELATIVE
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX J 1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX J 2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX J 3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX J 4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX J 5 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX J 6 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MRIBUND ANIMALS
- APPENDIX J 7 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX J 8 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX K 1 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED
RAT:MALE
- APPENDIX K 2 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED
RAT:FEMALE
- APPENDIX K 3 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED
MOUSE:MALE
- APPENDIX K 4 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX L 1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX L 2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX L 3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX L 4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX M 1 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS
RAT:MALE
- APPENDIX M 2 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS
RAT:FEMALE
- APPENDIX M 3 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS
MOUSE:MALE
- APPENDIX M 4 NEOPLASTIC LESIONS - INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX N 1 HISTOLOGICAL FINDINGS :METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX N 2 HISTOLOGICAL FINDINGS :METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX N 3 HISTOLOGICAL FINDINGS :METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX N 4 HISTOLOGICAL FINDINGS :METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

A P P E N D I X E S (CONTINUED)

- APPENDIX N 5 HISTOLOGICAL FINDINGS :METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX N 6 HISTOLOGICAL FINDINGS :METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX N 7 HISTOLOGICAL FINDINGS :METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX N 8 HISTOLOGICAL FINDINGS :METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX O 1 IDENTITY AND PURITY OF CHLOROFORM
PERFORMED AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(TWO-YEAR STUDY)
- APPENDIX O 2 STABILITY OF CHLOROFORM AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(TWO-YEAR STUDY)
- APPENDIX P 1 CONCENTRATION OF CHLOROFORM IN INHALATION CHAMBER
(TWO-YEAR STUDY)
- APPENDIX P 2 ENVIRONMENT OF INHALATION CHAMBER (TWO-YEAR STUDY)
- APPENDIX Q 1 NUTRIENTS IN RAT AND MOUSE FEED
- APPENDIX Q 2 CONTAMINANTS IN RAT AND MOUSE FEED
- APPENDIX Q 3 CONTAMINANTS IN RAT AND MOUSE DRINKING WATER
- APPENDIX R 1 METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY AND URINALYSIS
- APPENDIX R 2 UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY

要約

クロロホルムのがん原性を検索する目的でラットとマウスを用いて全身暴露による2年間(104週間)の吸入試験を実施した。

試験に使用した動物はF344/DuCrj(Fischer)ラットとCrj:BDF₁マウスで、雌雄各群とも50匹とし、被験物質投与群3群と対照群1群の計4群の構成で、合計ラット400匹、マウス400匹を用いた。

投与濃度は、ラットでは2週間及び13週間の予備試験を行い、これらの結果から90ppm、30ppm、10ppmとした。マウスでは2週間及び13週間の予備試験を行い、さらに雄については28日間試験を追加して行った。これらの結果から投与濃度は、5ppmから段階的に濃度を上げて最終的に90ppm、30ppm、5ppmとした。すなわち、マウスの5ppm群は104週間5ppmとし、30ppm群は5ppmで2週間、10ppmで2週間暴露した後30ppmとした。また、90ppm群では30ppmと同様に4週間処理した後、さらに30ppmで2週間暴露した後90ppmとした。投与は、1日6時間、週5日、104週間にわたり行った。観察・検査項目は、一般状態の観察、体重、摂餌量の測定、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

生存率については、ラット及びマウスともに対照群に比べて有意な低下を示した群はなく、むしろラットの雄では全投与群で高かった。

ラットの腫瘍性病変については、雌雄ともにクロロホルムの投与による腫瘍の発生は認めなかった。しかし、非腫瘍性病変として、鼻腔の変化を認め(雌雄に骨化生、杯細胞増生及び嗅上皮の炎症と呼吸上皮化生の発生増加、雄にのみ嗅上皮の壊死の発生増加)、これらの中で骨化生と嗅上皮の呼吸上皮化生は雌雄とも最低濃度の10ppm群でも発生増加を認めた。その他、精巣の萎縮の発生増加を雄の90ppm群、肝臓の空胞性小増殖巣の発生増加を雌の90ppm群で認めた。また、幾つかの加齢性病変の発生低下も認めた。

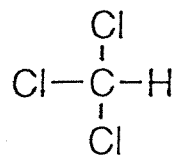
マウスの腫瘍性病変については、雄で腎細胞癌の発生がPeto検定、Cochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定では90ppm群に対照群に比べて有意な増加を認めた。さらに、腎細胞腺腫と腎細胞癌を合わせた検定でもPeto検定、Cochran-Armitage検定で増加傾向を認め、Fisher検定では30ppm以上の群で対照群に比べて有意な増加を示した。また、雌で肝細胞癌の発生がPeto検定で増加傾向を示した。また、非腫瘍性病変として、鼻腔の変化を認め(雌雄に骨化生と嗅上皮の呼吸上皮化生の発生増加、雌にのみ鼻腺の呼吸上皮化生と呼吸上皮のエオジン好性変化の発生増加)、これらの中で骨化生は雌雄とも最低濃度の5ppm群でも発生増加を認めた。また、腎臓の尿細管上皮には雄の30ppm以上の群で核の大小不同、好塩基性変化及び嚢胞状過形成、雌の90ppm群で好塩基性変化を認めた。肝臓には脂肪

変性の発生増加を雄の 90ppm群で認めた。また、マウスでも幾つかの加齢性病変の発生低下を認めた。

以上のことから、クロロホルムの投与はCrj:BDF₁マウスの雄に腎臓の腎細胞癌と腎細胞腺腫、雌に肝臓の肝細胞癌を発生増加させ、クロロホルムのがん原性が証明された。その腫瘍発生濃度は、雄で 30ppmであった。

クロロホルムについて

< 構造式、分子量 >



分子量 : 119.39

CAS. No. : 67-66-3

< 名称と別名 >

名 称 : クロロホルム (Chloroform)

別 名 : Trichloromethane

Formyl Trichloride

Methane Trichloride

Methenyl Trichloride

Methyl Trichloride

< 物理化学的性状等 >

性 状 : 特有のエーテル臭を有する無色透明の液体

沸 点 : 61~62℃

凝固点 : -63.5℃

比 重 : d_{20}^{20} 1.484

蒸気圧 : 200mmHg (25℃)

溶解性 : 水に微溶 (溶解度 1mL/200mL 25℃)、各種有機溶剤に可溶

保存条件 : 室温、遮光条件下で保存

<用途>

日本においては、1992年現在、クロロホルムはフッ素系冷媒やフッ素樹脂の製造、医薬品(麻酔剤、消毒剤)、溶剤(ゴム、グッタペルカ、鉱油、ロウ、アルカロイド、酢酸、メチルセルロース、ニトロセルロース)、有機合成、アニリンの検出、血液防腐用などに使用されている(文献 1,2)。

アメリカにおいては、1974年、冷媒等に使用するフルオロカーボン22の合成に用いられる他、プラスチック、医薬品、化粧品、ペニシリン、ビタミン等の抽出、精製、溶媒、粘着剤、樹脂、殺虫剤などの溶剤、染料中間体として広範に使用されている。

西ヨーロッパでは、主として冷媒の合成に用いられている(文献 3)。

<生産量>

日本では、1950年に商業生産が開始され、生産量は1991年に3万7千t、輸出が1千648t、輸入が2万7千797t、1992年に3万7千t、輸出が101t、輸入が2万6千638tであった(文献 1,2,3)。

アメリカでは、1922年に商業生産が開始され、1976年に133万t、スペインからの輸入が503t、8万8千tがオランダ、カナダ、ブラジル、メキシコ、アルゼンチン等へ輸出された。

西ヨーロッパでは、年間10~50万t、東ヨーロッパでは50~100万t生産され、その主な生産国はベネルックス三国、西ドイツ、フランス、英国である(文献 3)。

<許容濃度>

作業環境中でのクロロホルムの許容濃度は日本(日本産業衛生学会、1991,文献 4)、アメリカ(ACGIH、1990-91,文献 5)とも10ppmである。

また、ブルガリア、ポーランド、ルーマニア、西ドイツも10ppmである(文献 6)。

<人への影響>

I A R C (International Agency for Research on Cancer、1979,文献 3)によると、クロロホルムの暴露が繰り返されると人は死に至り、急性死の原因として心臓停止、遅延死の原因として肝臓、腎臓への障害があるとされている。また、クロロホルム暴露の症状として呼吸抑制、昏睡も含まれる。

産業中毒便覧(1981,文献 7)によると、クロロホルムの反復暴露による障害例はまれであるが、10～200ppmの作業場で1～4年勤務する作業員68名中の25%に肝臓の腫大が、5～6%に中毒性肝炎が認められ、また 77～237ppmの暴露を受けている作業員10名は、倦怠感、消化器障害、精神鈍麻を訴えたが(検診を受けた8名には肝障害は認めず)、22～71ppm暴露では、その程度は相対的に軽いという報告が記述されている。

化学物質の危険・有害便覧(1991,文献 8)によると、人への影響としてクロロホルムは強い麻酔性があり、また肝臓、腎尿細管、心臓などに細胞毒として作用する。高濃度の蒸気を吸入すると、興奮状態、反射機能の喪失、感覚麻痺、意識喪失、呼吸停止が起こり死亡する。低濃度、蒸気の繰り返し暴露による慢性中毒症状としては、胃腸、肝臓、腎臓障害がある。

濃度と作用の例示(文献 8)

濃度 (ppm)	人への作用
30	臭気が感知できる。しかし、すぐに臭覚が麻痺する不快感や不安感が起こる。
100	
1000	
4000～5000	5～10分間の暴露でめまい、吐き気をもよおし、頭痛、疲労が残る。
14000～16000	脈拍が早くなる。嘔吐、思考混乱などが起こる。 麻酔性を発揮する危険濃度。

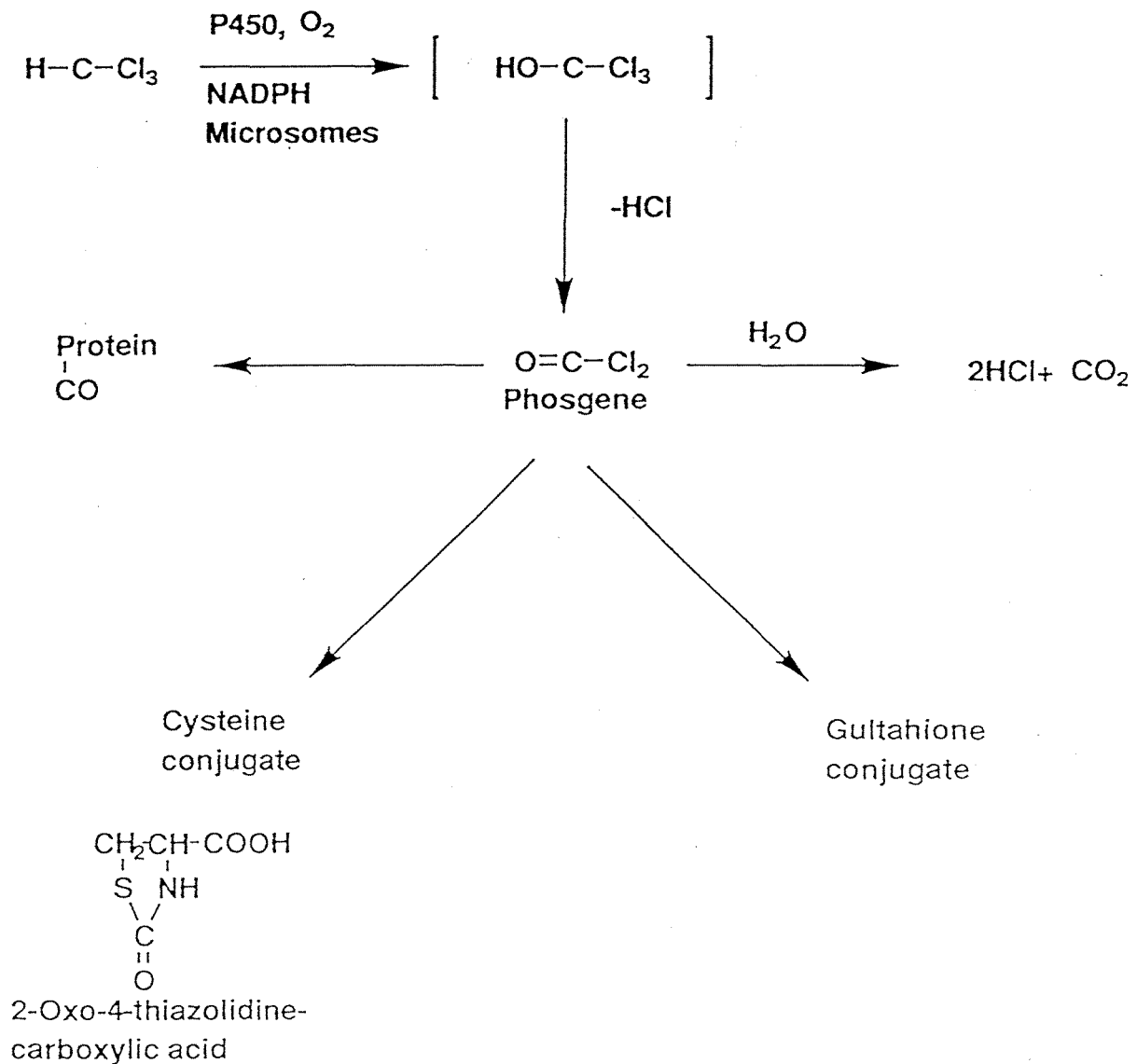
なお、同便覧に、災害事例として以下の例が示されている。

- (1) クロロホルムを溶剤として使用する作業に長期従事していた者が、胃腸障害、肝障害を起こした。
- (2) クロロホルムの混合物を処理した釜に作業員がガスマスクを使用せずに入ったため、めまいと頭痛を起こした。

<代謝>

クロロホルムの代謝については、I.W.F.Dcuidsonら(1982,文献 9)が総説に示している。³⁶Cl-クロロホルムを使用した実験では、排泄尿中の無機塩素がクロロホルムの代謝物由来であることをラットにより確認した。また、クロロホルムを与えた犬の実験では、尿中にトリクロロメタノールのグルクロン酸抱合体と考えられる施光性をもった酸化代謝物を見出した。クロロホルムの主な最終代謝物としてクロルイオンに加えて、CO₂がin vivo

やin vitroの研究で確認されている。この場合、中間的前駆体代謝物として同定されたホスゲンをとまなうことが、in vitroの研究で確認されている。また、COも少量ではあるが代謝物として確認されている。ホスゲンは酵素的にシステインと結合して、2-オキソ-4-チアゾリジンカルボン酸を生成し、またグルタチオン抱合体の生成も示唆されている。



Metabolic pathway of chloroform (文献 9)

<変異原性>

S. L. Rosenthal (1987, 文献 10) は、クロロホルムの種々のサルモネラ、大腸菌を用いた変異原性試験と姉妹染色分体交換や不定期 DNA 合成などの DNA 損傷試験の結果を解説している。

変異原性試験の結果では、S 9 による活性化、非活性化にかかわらずクロロホルムがバクテリアに変異を起こさず、主として陰性の結果を示している。しかし、偽陰性の結果がいくつかの要因によって得られるとして、次の項目を上げている。

- (1) 活性化システムがクロロホルムの代謝に対しては不適切であるかもしれない。
- (2) クロロホルムの主な活性代謝物であるホスゲン是不安定で反応性に富み、ミクロゾームのタンパクや脂質に捕捉され、バクテリアの DNA に到達しなかったかもしれない。
- (3) 多くの試験では、陽性対照物質として揮発性のものを使用していなかったためクロロホルムの蒸発を防ぐための注意がなされなかったかもしれない。

また、DNA 損傷試験の結果については、研究者により陽性であったり陰性であったり、また、あいまいな結果を示しており、確固たる結論に到達する前にさらなる試験が必要であるとしている。

また、J. A. Heddle ら (1983, 文献 11) は、マウスの骨髓細胞を用いてクロロホルムの小核試験を実施し、陰性の結果を得ている。

<急性毒性試験>

J. L. Larson ら (1993, 文献 12) は、マウスとラットを用いてコーン油に混ぜたクロロホルムの単回投与試験を実施した。この報告によるとクロロホルムの急性効果は、ラットの雄で腎臓に重度の近位尿管細胞の壊死、マウスの雌で肝臓に中心性肝細胞壊死が認められた。また、クロロホルムにより誘起された組織学的変化とそれらの再生後の時間経過の検討結果から腫瘍形成における細胞再生の役割を示唆している。

RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substance, 1985-1986, 文献 13) では、以下に示したごとく、吸入試験に関するいくつかの報告がまとめられている。

(R T E C S , 文 献 13)

動物種	内 容
猫	LCL ₀ : 35000mg/m ³ /4h
モルモット	LCL ₀ : 20000ppm/2h
人	LCL ₀ : 25000ppm/5m
哺乳類	LCL ₀ : 25000ppm/5m
マウス	LCL ₀ : 28gm/m ³
ラット	LC ₅₀ : 75gm/m ³ /60m
ウサギ	LCL ₀ : 59gm/m ³

< 長期毒性試験 >

M. D. Reuber (1979, 文献 14) は、N C I (National Cancer Institute、1976, 文献 15) で実施した経口投与によるがん原性試験 (ラット、マウスの雌雄に、クロロホルムをコーン油に混入して強制経口投与) を再評価した。その結果、ラットでは雌雄で肝臓に結節性過形成と肝細胞癌を合わせた発生の増加、雄で腎臓に腎細胞癌の発生、雌で肝臓の胆管癌と甲状腺の腫瘍の発生の増加が認められた。また、マウスでは雌雄とも肝細胞癌の発生が認められた。

T. A. Jorgenson ら (1985, 文献 16) は、雄ラット (200, 400, 900, 1800mg/L)、雌マウス (200, 400, 900, 1800mg/L) を用いて混水投与による104週間の試験を行った。その結果、ラットでは腎臓腫瘍の発生増加が認められたが、マウスには投与群に有意な腫瘍の発生増加はなかったと報告している。

F. J. C. Roe ら (1979, 文献 17) は、ICIマウスを用いて強制経口投与 (クロロホルムをねり菌みがき中に混入) による96週間 (80週間投与後、16週間休薬) の試験を行った。その結果、雄に腎臓腫瘍の発生増加を認めた。また、種々の系統 (ICI, CBA, C57BL 及び CF/1) の雄マウスに、ほぼ同様の処置をしたところ、ICIマウスにのみ腎臓腫瘍の発生を認めたが、他の系統のマウスでは腫瘍の増加がみられなかったと報告した。

< I A R C における評価 >

I A R C (International Agency for Research on Cancer) Monographs Supplement 7 (1987, 文献 18) では、動物に対する発癌性の証拠は十分ではあるが、短期テストによる証拠、人に対する発癌性の証拠については不適切であるとして、総合的な評価はグループ2Bに分類している。

I 試験材料

I - 1 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号：TLK0986, ECQ2709, ECF1746

製 造 元：和光純薬工業株式会社

グ レ ー ド：特級

純 度：99.0%以上

I - 2 被験物質の同一性・安定性

I - 2 - 1 同一性

被験物質として使用するクロロホルムを各ロット毎にマススペクトル、赤外吸収スペクトルを測定し、文献値と比較することにより、同一であることを確認した。なお、それらの結果について、Appendix 0 1 に示した。

I - 2 - 2 安定性

被験物質として使用するクロロホルムを各ロット毎に受領時及びその使用終了時に、赤外吸収スペクトル測定とガスクロマトグラフ分析を実施し、安定であることを確認した。なお、それらの結果について、Appendix 0 2 に示した。

I - 3 試験動物

動物は、日本チャールス・リバー(株)のF344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)及びCrj:BDF₁マウス(SPF)の雌雄を使用した。

ラット、マウスとも雌雄各240匹を生後4週齢で導入し、各1週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で一般状態の観察所見に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各200匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:119~141g、雌:91~105g/マウス雄:20.6~23.9g、雌:17.2~20.0g)を選別し、試験に供した。

Ⅱ 試験方法

Ⅱ－１ 投与

Ⅱ－１－１ 投与経路、投与方法及び投与期間

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

投与は吸入チャンバー内の試験動物を設定濃度のクロロホルムの蒸気に暴露することにより行った。

投与期間及び暴露回数は以下の通りである。

6時間/日, 5日/週(祝祭日を除く)

ラット(試験番号:0115): 491回/104週間

マウス(試験番号:0116): 499回/104週間

Ⅱ－１－２ 投与濃度

投与濃度はラットが雌雄とも 90ppm、30ppm、10ppm(公比3.0)、マウスが雌雄とも 90ppm、30ppm、5ppmと設定した(但し、マウスの 90ppm群は 5ppm(1～2週)、10ppm(3～4週)、30ppm(5～6週)、90ppm(7～104週)、30ppm群は 5ppm(1～2週)、10ppm(3～4週)、30ppm(5～104週)と段階的に濃度を上げた)。

Ⅱ－１－３ 被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質の発生方法は Figure 1 に示す通り、クロロホルム(液体)の入った発生容器①を循環水式恒温槽②で加熱しながら、清浄空気③をバブラー④を用いてバブリングしてクロロホルムを蒸発させた。クロロホルム蒸気を、一定温度に冷却⑤し、さらに加熱⑥することにより安定した濃度でラインミキサー⑦に供給した。次にそれぞれの吸入チャンバー内のクロロホルム濃度をガスクロマトグラフ⑧により監視しながら設定値になるように蒸気の供給量⑨を調整した。

Ⅱ－１－４ 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内のクロロホルムの濃度は自動サンプリング装置付ガスクロマトグラフを用い、暴露開始前から暴露終了後まで 15分毎に測定した。Appendix P 1 に測定結果を示した。

投与濃度の平均値は設定濃度を満足する結果を示した。なお、試験における結果(平均値±標準偏差)を記述すると、ラットでは 90ppm群:89.9±0.4ppm、30ppm群:30.0±0.5ppm、10ppm群:10.1±0.2 ppmであり、マウスでは 90ppm群:5.1±0.1ppm(1～2週)、10.1±0.0ppm(3～4週)、30.0±0.1ppm(5～6週)、90.1±0.7ppm(7～104週)、30ppm群:5.0±0.0ppm(1～2週)、10.0±0.0ppm(3～4週)、30.1±0.4ppm(5～104週)、5ppm群:5.0±0.1ppm(1～104週)であった。

Ⅱ - 2 動物管理

Ⅱ - 2 - 1 群分け及び個体識別方法

供試動物の各投与群への割り当ては、動物を体重の重い順より各群に1匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより群間の体重の偏りを小さくする群分け方法(適正層別方式)により実施した(文献 19)。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間においては色素塗布により、投与期間においては耳パンチにより識別し、またケージにも個体識別番号を付した。

なお、ラットとマウスは、バリア区域内の独立した室にそれぞれ収容し、各室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験と区別した。

Ⅱ - 2 - 2 飼育条件

動物は、各試験の馴化期間及び投与期間中は吸入チャンバー内で飼育した。試験で使用した吸入チャンバー内の環境条件を Table 1 に示した。その計測結果を、Appendix P 2 に示した。また、検疫室(検疫期間)及び吸入チャンバー室(馴化期間及び投与期間)の室内環境条件は、温度 24±2℃、湿度 50±10%、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/時であった。

試験の検疫期間中は1ケージ当り5匹の群飼(ステンレス製網ケージ、ラット:340W×294D×176H mm、マウス:224W×212D×120H mm)、馴化期間中は1ケージ当り1匹の単飼(ステンレス製六連網ケージ、ラット:125W×216D×176H mm、マウス:95W×116D×120H mm)、投与期間中は1ケージ当り1匹の単飼(ステンレス製五連網ケージ、ラット:150W×216D×176H mm、マウス:100W×116D×120H mm)の条件下で飼育した。なお、ケージは2週間毎に交換した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)のCRF-1固型飼料(3Mrad=30kg y- γ 線照射滅菌飼料)を飼育全期間を通して固型飼料給餌器により自由摂取させた。

また、飲水は全飼育期間を通して市水(秦野市水道局供給)をフィルターろ過した後、紫外線滅菌し自動給水により自由摂取させた。

なお、使用飼料の品質管理は栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)の自社分析データ資料を、夾雑物については(財)日本食品分析センター、飲水の水質については(財)食品薬品安全センターの分析データ資料を使用ロットごとに入手し、異常のないことを確認した。これら品質管理のデータは、Appendix Q 1~3 に示した。

II - 3 観察・検査項目及び方法

II - 3 - 1 動物の一般状態の観察

動物の一般状態の観察は、毎日1回行った。

II - 3 - 2 体重測定

動物の体重は、14週までは週1回、それ以降は2週に1回測定した。

II - 3 - 3 摂餌量測定

動物の摂餌量は、14週までは週1回、それ以降は4週に1回測定した。

II - 3 - 4 血液学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より採血したEDTA-2K加血液を用いて血液学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日より(18時間以上)絶食させた。

検査項目は Table 1、検査方法は Appendix R 1 に示した。

II - 3 - 5 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より採血したヘパリンリチウム加血液を遠心分離して得られた血漿を用いて血液生化学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日より絶食(18時間以上)させた。

検査項目は Table 1、検査方法は Appendix R 1 に示した。

Ⅱ - 3 - 6 尿 検 査

投与最終週まで生存した動物について、新鮮尿を採取し尿検査を行った。
検査項目は Table 1、検査方法は Appendix R 1 に示した。

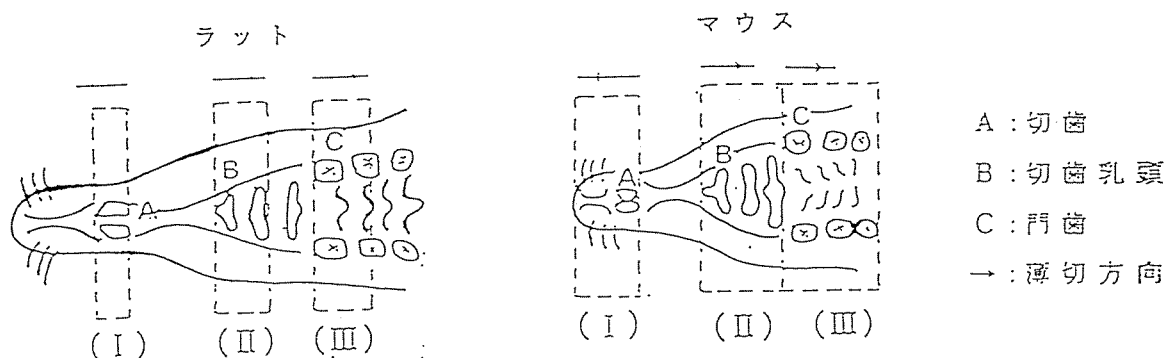
Ⅱ - 3 - 7 病理学的検査

解剖時に全動物について肉眼的に観察を行った。全動物の臓器を10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、Table 1 に示した臓器及び肉眼的に変化のみられた臓器を、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡にて病理組織学的に検査した。なお、鼻腔については切歯の後端(レベルⅠ)、切歯乳頭(レベルⅡ)、第一臼歯の前端(レベルⅢ)の3カ所で切り出し(横断)、検査した。

臓器重量は、定期解剖時まで生存した動物について Table 1 に示した臓器の湿重量を測定した。

腫瘍性病変についてはPeto検定に用いるコンテクス(0:定期解剖例に発見された腫瘍、1:死亡/瀕死例に発見された腫瘍で、かつ、直接死因に関係しない腫瘍、2:多分1だと思いが、確かでない腫瘍、3:多分4だと思いが、確かでない腫瘍、4:死亡/瀕死例に発見された腫瘍で、直接死因に係する腫瘍)を付与した(文献 20)。

切出し位置



Ⅱ - 4 数値処理と統計学的方法

Ⅱ - 4 - 1 数値の取扱いと表示

各数値データは計測機器の精度に合わせて表示した。

体重についてはgを単位とし、ラットでは小数点以下第1位を四捨五入して整数値で、マウスでは小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

摂餌量についてはgを単位とし、1週間(7日)を通しての摂餌量を小数点以下第1位まで計測し、この値を7で除し、1日当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。

臓器実重量についてはgを単位とし、小数点以下第3位まで計測し、表示した。臓器重量体重比については臓器実重量値を解剖時体重で除し、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、血液生化学的検査については Appendix R 2 に示した精度により表示した。A/G比はアルブミン/(総蛋白-アルブミン)による計算で求め、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。

なお、各数値データにおいての平均値及び標準偏差は上記に示した桁数と同様になるよう四捨五入を行った。

Ⅱ - 4 - 2 母数の取扱いと表示

各種統計検定における群内動物数(母数)は総括表に示した。

体重及び摂餌量については、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、欠測となったデータについては「-」で表示し、母数より除いた。

臓器重量、血液学的検査、血液生化学的検査は、定期解剖時まで生存した動物を対象とし、欠測となったデータについては「-」で表示し、母数より除いた。

尿検査は、投与最終週まで生存した動物を対象に行い、検査数を母数とした。

剖検と病理組織学的検査データは、各群の有効動物数(供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数)を母数とした。

ただし、腫瘍性病変については臓器別に、検査不能臓器をもつ動物数を除いたものを母数とした。

II - 4 - 3 統計方法

本試験で得られた測定値は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。

予備検定については5%の有意水準で両側検定を行い、最終検定では5%及び1%で両側検定を行った。

なお、病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変について、死亡/瀕死例、定期解剖例に分け、所見のみられなかった動物をグレード0として χ^2 検定を行った。また、尿検査についても χ^2 検定を行った。なお χ^2 検定は対照群と各投与群間との検定である。

各群雌雄毎に検査数が2以下の項目については検定より除外した。

腫瘍性病変については、各臓器、腫瘍ごとに、各群いずれかの発生率が5%を越える腫瘍について、Peto検定、Cochran-Armitage検定、Fisher検定を行った。またPeto検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス(II-3-7 病理学的検査を参照)を用いて、死亡率法<Standard rates>(コンテックス3, 4を付与された腫瘍についての検定)、有病率法<Prevalence rates>(コンテックス0, 1, 2を付与された腫瘍についての検定)、死亡率法+有病率法<Combined rates>(コンテックス0~4の総計で検定)を行った。Fisher検定は対照群と各投与群間の検定を行った。

II - 5 試資料の保管

試験計画書、標本、生データ、記録文書、最終報告書、信頼性保証証明書、被験物質、その他本試験に係る資料は日本バイオアッセイ研究センターの標準操作手順書にしたがって、試資料保管施設に保管する。保管期間は最終報告書提出後10年間とする。

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 ラットを用いた試験

Ⅲ-1-1 動物の状態観察

(1) 生死状況

投与期間中における群別の生存状況を Table 2,3 及び Figure 2,3 に示した。

最終計測週(104週)における生存数(生存率)は、雄では 90ppm群:38/50例(76%)、30ppm群:37/50例(74%)、10ppm群:39/50例(78%)、対照群:27/50例(54%)、雌では 90ppm群:34/49例(69%)、30ppm群:40/50例(80%)、10ppm群:36/50例(72%)、対照群:38/50例(76%)であった。

なお、雌の 90ppm群の1例が事故死亡した。

(2) 一般状態

一般状態の観察結果を Appendix A 1,2 に、外部腫瘍、内部腫瘍の発生動物数を Table 4,5 に示した。

外部腫瘍及び内部腫瘍の発生状況を全動物(死亡及び生存動物)についてみると、雌雄ともに各投与群で対照群に比較して、その発生数に変化はみられなかった。外部腫瘍の発生数は、雄では 90ppm群:23例、30ppm群:25例、10ppm群:24例、対照群:33例、雌では 90ppm群:18例、30ppm群:25例、10ppm群:19例、対照群:20例であった。

内部腫瘍の発生数は、雄では 90ppm群:6例、30ppm群:4例、10ppm群:4例、対照群:2例、雌では 90ppm群:5例、30ppm群:4例、10ppm群:5例、対照群:7例であった。

その他の一般状態でも、クロロホルム投与による特徴的な所見は死亡動物及び生存動物のいずれにも認めなかった。

(3) 体重

投与期間中における群別の体重推移を Table 2,3 、Figure 4,5 及び Appendix B 1,2 に示した。

雄では 90ppm群で全投与期間をとおり、対照群に比較して体重増加の抑制が認められ、さらに 30ppm群で1週以降90週まで、10ppm群で1週以降86週まで引き続いて、対照群に比較して体重増加の抑制が認められた。

雌では 90ppm群で全投与期間をとおり、対照群に比較して体重増加の抑

制が認められ、さらに 30ppm群で1週以降96週まで、10ppm群で1週以降30週まで、ほぼ連続して対照群に比較して体重増加の抑制が認められた。

(4) 摂餌量

投与期間中における群別の摂餌量(1日1匹当りの摂餌量)を Table 6,7、Figure 6,7 及び Appendix C 1,2 に示した。

投与群の摂餌量は、対照群に対して雄では 90ppm群:85~119%、30ppm:88~111%、10ppm:88~105%であった。

雌では 90ppm群:83~119%、30ppm群:86~118%、10ppm群:90~109%であった。

Ⅲ - 1 - 2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

(1) 血液学的検査

定期解剖時に行った血液学的検査の結果を Appendix D 1,2 に示した。

雌では、90ppm、10ppm群でヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の有意な増加、90ppm群で赤血球数の有意な増加を認めた。

雄では、特記すべき変化は認めなかった。

(2) 血液生化学的検査

定期解剖時に行った血液生化学的検査の結果を Appendix E 1,2 に示した。

雄では、全投与群でアルブミンの有意な増加、 γ -G T P 活性の有意な上昇、尿素窒素及びクロールの有意な減少、30ppm以上の群でA/G比の有意な増加、トリグリセライド、リン脂質及びクレアチニンの有意な減少、90ppm、10ppm群でG P T 活性の有意な上昇、90ppm群でG O T 活性の有意な上昇、総コレステロール及びカルシウムの有意な減少をそれぞれ示した。

雌では、全投与群でクロールの有意な減少、90ppm群でL A P 及び γ -G T P 活性の有意な上昇、無機リンの有意な増加、トリグリセライドの有意な減少をそれぞれ示した。その他、30ppm、10ppm群でアルブミンの増加、30ppm群でL D H 活性の低下、10ppm群で総蛋白、A/G比の増加を示した。

(3) 尿検査

投与期間最終週に行った尿検査の結果を Appendix F 1,2 に示した。

雄では、全投与群で蛋白の陽性度の有意な減少、90ppm群でグルコースの

陽性例の有意な増加を認めた。

雌では、30ppm以上の群で蛋白の陽性度の有意な減少、グルコースの陽性例の有意な増加を認めた。

その他、ケトン体の陽性例については、雄の30ppm群では減少、雌の10ppm群では増加という相反する結果を示した。

Ⅲ - 1 - 3 病理学的検査

(1) 剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix G 1~4 に示した。

対照群と比較して投与群に特徴的あるいは顕著な発生率の増加を示す所見はなかった。

(2) 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を Appendix H 1,2 (実重量)、I 1,2 (体重比)に示した。

雌の90ppm群に腎臓の実重量と体重比の高値を認めた。なお、90ppm群では体重の低値に伴って、雄に心臓と肝臓の実重量の低値、雌に心臓の実重量の低値と体重比の高値、副腎、卵巣、肺、肝臓及び脳の体重比の高値を認めた。

その他、雄では30ppm群に脳の実重量の高値と副腎の体重比の低値、10ppm群に腎臓の体重比の低値、雌では10ppm群に腎臓の体重比の高値が示されたが、これらの変化は投与濃度に対応していなかった。

(3) 病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果を Appendix J 1~4に示した。腫瘍性病変の結果は Appendix K 1,2 に担腫瘍動物数と腫瘍数、Appendix L 1,2 に腫瘍の種類、Appendix M 1,2 に統計解析(Peto検定、Cochran-Armitage検定、Fisher検定)、Appendix N 1~4に転移性病変について示した。

<鼻腔>

雌雄とも投与群の鼻腔に下記の変化を認めた。すなわち、骨化生は対照動物に通常観察されない所見であるが、雌雄とも全投与群に発生が認められ、その発生部位は主に鼻腔後半の篩骨甲介であった。嗅上皮については、呼吸上皮化生が雌雄とも全ての投与群で、炎症が雄の30ppm以上の群と雌の全投与群(定期解剖例)で、嗅上皮の壊死が雄の90ppm群で発生増加した。

また、呼吸上皮での杯細胞増生は雌雄とも 30ppm以上の群(雄の各投与群と雌 30ppm群は定期解剖例)で発生増加した。

なお、老齢ラットに自然発生する病変である嗅上皮のエオジン好性変化の発生低下を雄の全投与群(10ppm群は定期解剖例のみ)と雌の 90ppm群(死亡/瀕死例)で、同じく自然発生病変である異物性炎症の発生低下を雄の 30ppm以上の群(定期解剖例)で認めた。

<腎臓>

慢性腎症の発生低下を雌雄とも全投与群(雌の 10ppm群は定期解剖例のみ)で認めた。

<精巣>

萎縮の発生増加を 90ppm群(定期解剖例)で認めた。

<肝臓>

空胞性小増殖巣の発生増加を雌の 90ppm群(定期解剖例)で認めた。

<心臓>

心筋線維症の発生低下を雄の 90ppm群(定期解剖例)で認めた。

<その他の非腫瘍性病変>

雄の 90ppm群の死亡/瀕死例に前胃の潰瘍の発生低下を認めたが、定期解剖例の発生は対照群との間に差を認めないことから、投与による変化ではなかった。また、雄のリンパ節炎と雌の副腎皮質の脂肪変性は対照群と一部の投与群の間に発生の差をみたが、投与濃度に対応した変化でなかった。

<腫瘍性病変>

子宮の内膜間質性ポリープの発生低下が一部の群に示されたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。その他の腫瘍性病変に関しても投与濃度に対応した発生増加を認めなかった。

(4) 死因

病理学的にみた死亡/瀕死の死因を Table 8 に示した。

各投与群と対照群の間に顕著な差を認めなかった。

Ⅲ - 2 マウスを用いた試験

Ⅲ - 2 - 1 動物の状態観察

(1) 生死状況

投与期間中における群別の生存状況を Table 9.10 及び Figure 8.9 に示した。

最終計測週(104週)の生存数(生存率)は、雄では 90ppm群:36/49例(75%)、30ppm群:36/50例(72%)、5ppm群:38/50例(76%)、対照群:33/50例(66%)、雌では 90ppm群:24/48例(50%)、30ppm群:25/50例(50%)、5ppm群:36/49例(74%)、対照群:29/50例(58%)であった。

なお、雄の 90ppm群で1例、雌の 90ppm群で2例、5ppm群で1例が事故死亡した。

(2) 一般状態

一般状態の観察結果を Appendix A 3.4 に、外部腫瘍、内部腫瘍の発生動物数を Table 11.12 に示した。

外部腫瘍及び内部腫瘍の発生状況を全動物(死亡及び生存動物)についてみると、雌雄ともに各投与群で対照群に比較して、その発生数に変化はみられなかった。外部腫瘍の発生数は、雄では 90ppm群:3例、30ppm群:8例、5ppm群:2例、対照群:6例、雌では 90ppm群:2例、30ppm群:7例、5ppm群:8例、対照群:2例に認めた。

内部腫瘍の発生数は、雄では 90ppm群:11例、30ppm群:13例、5ppm群:8例、対照群:21例、雌では 90ppm群:19例、30ppm群:16例、5ppm群:8例、対照群:12例に認めた。

その他の一般状態でも、クロロホルム投与による特徴的な所見は死亡動物及び生存動物のいずれにも認めなかった。

(3) 体重

投与期間中における群別の体重推移を Table 9.10、Figure 10.11 及び Appendix B 3.4 に示した。

雄では、全投与群で全投与期間をとおり、対照群に比較して体重増加の抑制があった。

雌では、90ppm群で全投与期間をとおり、30ppm群で1週以降98週まで、5ppm群で1週以降54週まで、ほぼ連続して対照群に比較して体重増加の抑制があった。

(4) 摂餌量

投与期間中における群別の摂餌量(1日1匹当りの摂餌量)を Table 13, 14、Figure 12, 13 及び Appendix C 3, 4 に示した。

投与群の摂取量は、対照群に対して雄では 90ppm群:89~102%、30ppm群:86~98%、5ppm群:88~95%であった。

雌では、90ppm群:88~110%、30ppm群:88~118%、5ppm群:90~108%であった。

Ⅲ - 2 - 2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

(1) 血液学的検査

定期解剖時に行った血液学的検査の結果を Appendix D 3, 4 に示した。

雄では、全投与群でヘマトクリット値の有意な増加、90ppm、5ppm群でヘモグロビン濃度の有意な増加を認めた。

雌では、30ppm以上の群でMCHの有意な増加を認めた。

(2) 血液生化学的検査

定期解剖時に行った血液生化学的検査の結果を Appendix E 3, 4 に示した。

雄では、全投与群でALP活性の有意な上昇、30ppm以上の群で尿素窒素及びカルシウムの有意な増加、90ppm群で総蛋白及びアルブミンの有意な増加、GOT、GPT及びCPK活性の有意な上昇を示した。その他、5ppm群でカリウムの増加を示した。

雌では、90ppm群でアルブミン及び尿素窒素の有意な増加、GOT及びGPT活性の有意な上昇、トリグリセライドの有意な減少を示した。

(3) 尿検査

投与期間最終週に行った尿検査の結果を Appendix F 3, 4 に示した。

雄では、30ppm、5ppm群で蛋白の陽性度の増加、5ppm群でpHの上昇を示した。

雌では、対照群に比較して顕著な差はなかった。

Ⅲ - 2 - 3 病理学的検査

(1) 剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix G 5~8 に示した。

定期解剖例では、雄で腎臓の結節の発生率(90ppm群:10例、30ppm群:6例)が高かった。

(2) 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を Appendix H 3,4(実重量)、I 3,4(体重比)に示した。

雄の腎臓は 90ppm群で実重量の高値を示し、統計学的に有意差は認められなかったものの、体重比も対照群と比較して顕著な高値を認めた。なお、解剖時体重の低値に伴って、雄では全投与群に心臓の実重量の低値と脳の体重比の高値、30ppm以上の群に副腎の実重量の低値、精巣、心臓及び肝臓の体重比の高値、また 90ppm群に脾臓と肺の体重比の高値を、雌では 30ppm以上の群に心臓、腎臓及び肝臓の体重比の高値、また 90ppm群に肺と脳の体重比の高値を示した。

その他、雄では 90ppm群と 5ppm群に脳の実重量の高値、30ppm群と 5ppm群で腎臓の実重量に低値、30ppm群で肺の体重比に低値、また 5ppm群で肝臓の実重量に低値が、雌では 30ppm群で心臓の実重量に高値を示したが、これらの変化は投与濃度に対応していなかった。

(3) 病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果を Appendix J 5~8に示した。腫瘍性病変の結果は Appendix K 3,4 に担腫瘍動物数と腫瘍数、Appendix L 3,4 に腫瘍の種類、Appendix M 3,4 に統計解析(Peto検定、Cochran-Armitage検定、Fisher検定)、Appendix N 5~8に転移性病変について示した。

<腎臓>

雄の腎細胞癌の発生(90ppm群:11/48例、30ppm群:4/50例、5ppm群:1/50例、対照群:0/50例)はPeto検定(有病率法)、Cochran-Armitage検定で増加傾向を認め、Fisher検定でも 90ppm群に発生増加を認めた。腎細胞腺腫(90ppm群:1/48例、30ppm群:3/50例、5ppm群:0/50例、対照群:0/50例)と腎細胞癌を合計した統計検定でもPeto検定(有病率法)、Cochran-Armitage検定で増加傾向、Fisher検定で 30ppm以上の群に発生増加を認めた(Table 15)。

非腫瘍性病変としては、雄に核の大小不同、好塩基性変化及び囊胞状過

形成の発生増加を認めた。核の大小不同は尿細管上皮の核の大きさが様々になる所見であり、30ppm以上の群で発生増加を認め、5ppm群でも少数例に観察された。好塩基性変化は30ppm以上の群(定期解剖例)で程度の増強を認めた。嚢胞状過形成は、皮質の尿細管が嚢胞状に拡張し尿細管上皮の一部が多層化する所見であり、30ppm以上の群で発生増加を認めた。なお、この系統の雄マウスに自然発性的に出現する近位尿細管の空胞化が、全投与群で消失していた。

雌でも、好塩基性変化の発生増加を90ppm群で認め、核の大小不同を90ppm群の少数例に観察した。

その他、雌の30ppm群(死亡/瀕死例)に硝子滴の出現の程度の増強が観察されたが、投与濃度に対応した変化でなかった。

なお、Table 16 に全動物(死亡/瀕死例+定期解剖例)での腎臓の所見を示した。

< 肝臓 >

雄の肝細胞癌の発生(90ppm群:10/48例、30ppm群:7/50例、5ppm群:0/50例、対照群:10/50例)は、Peto検定(有病率法、死亡率法+有病率法)で増加傾向を示した。しかし、90ppm群と対照群の発生率に差がなく、5ppm群での発生率が対照群より低かった(Fisher検定で有意な低下)ことから、この増加傾向は投与による変化でなかった(Table 17)。

雌の肝細胞癌の発生(90ppm群:3/48例、30ppm群:0/50例、5ppm群:1/49例、対照群:1/50例)がPeto検定(有病率法のみ)で増加傾向を示した。肝細胞腺腫の発生(90ppm群:3/48例、30ppm群:4/50例、5ppm群:1/49例、対照群:1/50例)は投与群と対照群の間に差を認めなかった。なお、肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生を合計すると(90ppm群:6/48例、30ppm群:4/50例、5ppm群:2/49例、対照群:2/50例)、Peto検定(有病率法、死亡率法+有病率法)では増加傾向を示した(Table 18)。

非腫瘍性病変としては、脂肪変性の発生増加を雄の90ppm群(定期解剖例)で認めた。統計的に有意ではなかったものの、雌では中心性の空胞変性を90ppm群で観察した。

その他、明細胞性小増殖巣の発生低下を雄の5ppm群(定期解剖例)で認めたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

なお、Table 19 に全動物(死亡/瀕死例+定期解剖例)での肝臓の所見を示した。

< 鼻腔 >

雌雄とも投与群の鼻腔に下記の変化を認めた。骨化生は対照動物に通常観察されない所見であるが、雌雄とも全投与群に発生を認め、その発生部

位は主に鼻腔後半の鼻中隔であった。また、嗅上皮の呼吸上皮化生が雄の90ppm群(定期解剖例)及び雌の90ppm群と5ppm群で、鼻腺の呼吸上皮化生が雌の90ppm群(定期解剖例)と30ppm群で、呼吸上皮のエオジン好性変化が雌の90ppm群(定期解剖例)で発生増加した。

なお、雄では鼻腺の呼吸上皮化生の発生低下を90ppm群(定期解剖例)で認めた。

その他、雄では全投与群(定期解剖例)に呼吸上皮のエオジン好性変化の発生低下、30ppm群(定期解剖例)に嗅上皮のエオジン好性変化の発生低下が示されたが、両所見とも投与濃度に対応した変化ではなかった。

< 精巢 >

鉍質沈着の発生低下を全投与群(90ppm群と5ppm群は定期解剖例のみ)で認めた。鉍質沈着の主な発生部位は血管壁や間質であった。

< その他の腫瘍性病変 >

雌ではリンパ節の悪性リンパ腫の発生(90ppm群:13/48例、30ppm群:9/50例、5ppm群:13/49例、対照群:14/50例)がPeto検定(有病率法)で増加傾向、子宮の悪性組織球肉腫の発生(90ppm群:13/48例、30ppm群:11/50例、5ppm群:4/49例、対照群:10/50例)が、Peto検定(死亡率法、死亡率法+有病率法)で増加傾向を示した。しかし、これらの腫瘍は90ppm群と対照群の発生率に大差がないため、これらの増加傾向は投与による変化でなかった。

< その他の非腫瘍性病変 >

雄の脾臓の髄外造血、腺胃(粘膜)の過形成及び眼球の白内障、雌の下垂体の過形成、副腎の紡錘形細胞増生及び陰核腺の導管拡張は対照群と一部の投与群の間に発生の差をみたが、投与濃度に対応した変化でなかった。

(4) 死因

病理学的にみた死亡/瀕死の死因を Table 20 に示した。

各投与群と対照群の間に顕著な差を認めなかった。

IV 考察

ーラットー

<生死状況及び体重>

ラットの最終計測週における投与群の生存率は、雌では対照群と比較して有意な差はなかったが、雄では有意な高値を示した。体重の推移は、雌雄ともに 90ppm 群では全投与期間で体重増加の抑制がみられた。30ppm、10ppm 群においても雌雄ともに投与期間中に体重増加の抑制がみられたが、投与終期には回復した。

<腫瘍性病変>

雌雄ともにクロロホルムの投与により統計的に有意な発生の増加や発生の増加傾向を示した腫瘍はなく、クロロホルムがF344ラットに対してがん原性を示す証拠は得られなかった。

<非腫瘍性病変>

クロロホルムの鼻腔に対する影響が示された。すなわち、嗅上皮の分布領域では雌雄とも嗅上皮の炎症及び呼吸上皮化生、篩骨甲介に骨化生の発生増加を認めた。これらの中で炎症以外の変化は雌雄とも最低濃度群である 10ppm 群でも認めた。さらに雄では嗅上皮の壊死の発生増加を 90ppm 群で認めた。呼吸上皮の分布領域では雌雄とも 30ppm 以上の群で呼吸上皮に杯細胞増生を認めた。

その他、クロロホルムの投与による影響として、精巣の萎縮の発生増加を雄の 90ppm 群、肝臓の空胞性小増殖巣の発生増加を雌の 90ppm 群で認めた。なお、老齢ラットに自然発生する病変で、鼻腔の嗅上皮のエオジン好性変化、異物性炎症、慢性腎症、心筋線維症は一部の群、あるいは全投与群で発生の低下を認めた。

<他の試験との比較について>

M. D. Reuber (1979, 文献 14) は、N C I (National Cancer Institute、1976, 文献 15) で実施した経口投与によるがん原性試験(クロロホルムをコーン油に混入)を再評価した。これによると Osborne-Mendel ラットの雌で肝臓に胆管癌、雌雄で結節性過形成と肝細胞癌を合わせた数の発生増加、雄で

腎臓に腎細胞癌の発生増加、雌で甲状腺に甲状腺腫瘍の発生増加が認められたと報告している。

T.A.Jorgensonら(1985,文献 16)は、同じくOsborne-Mendelラットの雄を用い、クロロホルムを飲水に混ぜて投与したがん原性試験を実施した。これによると、肝臓腫瘍の発生はなく、腎臓腫瘍(癌、腺腫)の発生が増加が認められたと報告している。

今回、実施した吸入試験では、F344ラットにクロロホルムによる腫瘍誘発、発生増加を示す証拠は得られなかった。

	M. D. Reuber (1979) (文献 14)	T. A. Jorgensonら (1985) (文献 16)
動物種、系統 性 試験期間 投与経路 投与期間 群構成 (動物数)	Osborne-Mendel rats 雌雄 111週間 強制経口投与 (溶媒:コーン油) 5回/週、78週間 投与開始後111週 濃度 : 動物数	Osborne-Mendel rats 雄 104週間 飲水 自由摂取104週 投与開始後104週 濃度 : 動物数
	無処置対照群 : 20匹 溶媒対照群 : 20匹 90mg/kg/日 : 50匹 180mg/kg/日 : 50匹	無処置対照群 : 330匹 制限給水対照群 : 50匹 200mg/L : 330匹 400mg/L : 150匹 900mg/L : 50匹 1800mg/L : 50匹
腫瘍発生 肝臓	雌は胆管癌を誘発 雌雄で結節性過形成と肝細胞癌を合わせた発生を増加	肝臓腫瘍の発生なし
腎臓	雄は腎細胞癌を誘発	雄の腎臓腫瘍(癌、腺腫)の発生増加
甲状腺	雌は甲状腺腫瘍の発生を増加	

なお、クロロホルム投与によるラットの鼻腔病変について、J.L.Larsonら(1992,文献 21)は、F344雄ラットを用いて短期吸入試験(6時間/日、7日間)を実施した結果、ラットの雄で鼻腔の気道に明瞭な濃度相関を示す病変(呼吸上皮に杯細胞の増加、篩骨甲介に嗅腺の変性とそれに伴う骨形成)が認められたと報告している。

今回のがん原性試験ではF344ラットの雌雄の鼻腔で篩骨甲介に骨化生の増加と呼吸上皮に杯細胞の増生を認めた。

－ マウス －

< 生死状況及び体重 >

マウスの最終計測週における生存率は、雌雄ともに全投与群で対照群に比べて有意な差はみられなかった。体重の推移は、雄の全投与群と雌の90ppm群では全投与期間で体重増加の抑制がみられた。雌の30ppm、5ppm群においても、投与期間中に体重増加の抑制がみられたが、投与終期には回復した。

< 腫瘍性病変 >

腎臓：

雄では、腎細胞癌(90ppm群:11/48例、30ppm群:4/50例、5ppm群:1/50例)、腎細胞腺腫(90ppm群:1/48例、30ppm群:3/50例)が観察された。これらの腎臓腫瘍は、(1) 腎細胞癌、腎細胞腺腫ともに対照群に発生しなかったこと。(2) 当センターのBDF₁雄マウスのヒストリカルコントロール値では腎細胞癌の発生はなく、腎細胞腺腫の発生率も非常に低いこと(0.2%、Range:0-2%)であること。(3) 投与濃度に相応した発生状況であること。(1)～(3)の理由によりクロロホルムの暴露により発生したものと考えられた。また、これらの腎細胞癌と腎細胞腺腫の組織像は、腫瘍内に多層化した上皮細胞が取り囲む嚢胞状の部分を持つことが特徴で、稀に自然発生する腎臓腫瘍(腎細胞腺腫)が通常充実性であることと異なっていた。

非腫瘍性病変では、嚢胞状の尿細管上皮の過形成が雄の30ppm以上の群でみられた。この所見は、尿細管が不整形に拡張をすることが特徴であり、その大きさは比較的小さなものから、かなり大きな嚢胞状を呈するものまで多様であった。また、拡張した管腔の被蓋上皮に、部分的な多層化や核の極性の乱れがみられる例もあった。この所見は腎腫瘍の前癌病変とされており、本試験で発生した腫瘍と関連があると考えられた。

さらに、雄の30ppm以上の群では尿細管の変性もしくは再生性変化と考えられる好塩基性変化と尿細管上皮の核の大小不同がみられた。本試験の予備試験である2週間試験と13週間試験でも近位尿細管の障害(変性、壊死)を観察しており、これらの所見は近位尿細管の慢性的な障害像として発現したものである。一方、本試験の予備試験である2週間試験、13週間試験で病理組織学的に近位尿細管にほとんど障害をみなかった雌では、好塩基性変化の増加が90ppm群で示されたが、その発生数は雄と比較して非常に少なく、また病変の程度も軽度であった。腎障害が強く出る雄では腫瘍の

誘発や尿細管上皮の嚢胞状過形成をみたのに対し、腎障害の程度が軽度な雌では腎腫瘍の誘発や尿細管上皮の嚢胞状過形成はみられなかった。また、従来の報告では、クロロホルムの遺伝子毒性は明確でないとされている。これらのことから、J.L.Larsonら(1993, 文献 12)が考えている様にクロロホルムの腎腫瘍の発生には、尿細管の障害と再生が重要な役割をはたしている可能性も考えられた。

肝臓：

雌の肝細胞癌の発生(90ppm群:3/48例、30ppm群:0/50例、5ppm群:1/49例、対照群:1/50例)がPeto検定(有病率法のみ)で増加傾向を示した。本試験の90ppm群での肝細胞癌の発生率を当センターBDF₁雌マウスのヒストリカルコントロール値(2.0%、Range:0~4%)と比較すると僅かではあるが高い値であった。これらのことから、マウスの雌ではクロロホルムの暴露により肝細胞癌の発生が増加したものと考えられた。

雄の肝細胞癌の発生(90ppm群:10/48例、30ppm群:7/50例、5ppm群:0/50例、対照群:10/50例)も、Peto検定(有病率法、死亡率法+有病率法)で増加傾向を示した。しかし、結果で述べた様に雄の肝細胞癌の発生の増加傾向は5ppm群の低い発生率に伴う見かけ上の変化と考えられた。本試験の雄の90ppm群での肝細胞癌の発生率は当センターのBDF₁雄マウスのヒストリカルコントロール値の範囲内(23.6%、Range:2~38%)であった。これらのことから、マウスの雄ではクロロホルムの投与により肝細胞癌の発生が増加したとは考えられなかった。

なお、非腫瘍性病変として、雄では脂肪変性の発生増加を90ppm群で、雌では中心性の空胞変性を90ppm群の少数例でみた。

<その他の臓器の非腫瘍性病変>

鼻腔に、雌雄とも鼻中隔の骨化生と嗅上皮の呼吸上皮化生の発生増加を認め、クロロホルムの鼻腔に対する影響が示された。さらに老齢マウスで加齢性の変化としてみられるものは、鼻腔では鼻腺の呼吸上皮化生の発生が雄では減少、雌では増加した。呼吸上皮のエオジン好性変化の発生の増加を雌で認めた。また、雄の精巣では血管壁や間質の鉍質沈着の発生低下を認めた。

<他の試験との比較について>

M. D. Reuber (1979, 文献 14) は、N C I (National Cancer Institute、1976, 文献 15) で実施した経口投与によるがん原性試験(クロロホルムをコーン油に混入)を再評価した。これによるとB6C3F₁マウスの雌雄で肝臓に肝細胞癌の誘発が認められたと報告している。

T. A. Jorgensonら (1985, 文献 16) は、同じくB6C3F₁マウスの雌を用い、クロロホルムを飲水に混ぜて投与したがん原性試験を実施している。これによると、腫瘍の発生増加を示した臓器は認められなかったと報告している。

一方、F. J. C. Roeら (1979, 文献 17) は、ICI, CBA, C57BL及びCF/1マウスを用いたクロロホルムのがん原性試験を実施しているが、これによると、ICIマウスの雄にのみ腎臓腫瘍の発生が認められたと報告している。

今回、実施した吸入試験では、BDF₁マウスの雄に腎臓腫瘍、雌に肝臓腫瘍の発生増加を認めた。

	M. D. Reuber (1979) (文献 14)	T. A. Jorgensonら (1985) (文献 16)
動物種、系統性	B6C3F ₁ mice 雌雄	B6C3F ₁ mice 雌
試験期間	92週間	104週間
投与経路	強制経口投与 (溶媒:コーン油)	飲水
投与期間	5回/週、78週間 投与開始後92週	自由摂取104週 投与開始後104週
群構成 (動物数)	雄) 濃度 : 動物数 無処置対照群 : 20匹 溶媒対照群 : 20匹 138mg/kg/日 : 50匹 277mg/kg/日 : 50匹 雌) 濃度 : 動物数 無処置対照群 : 20匹 溶媒対照群 : 20匹 238mg/kg/日 : 50匹 477mg/kg/日 : 50匹	濃度 : 動物数 無処置対照群 : 430匹 制限給水対照群 : 50匹 200mg/L : 430匹 400mg/L : 150匹 900mg/L : 50匹 1800mg/L : 50匹
腫瘍発生 肝臓 腎臓	雌雄とも肝細胞癌を誘発 腫瘍の発生なし	各臓器に投与群で有意な腫瘍発生 の増加なし

F. J. C. Roeら (1979) (文献 17)

	試験 I	試験 II
動物種、 系統 性 試験期間 投与経路 投与容量 投与期間 解剖時期	ICI mice (Swiss albino mice) 雌雄(10週齢以下) 96週間 強制経口投与 (溶媒:歯磨き基剤) 1ml/kg 体重 6回/週、80週間 投与開始後96週	ICI mice、CBA mice、 C57BL mice、CF/1 mice 雄 104週間 強制経口投与 (溶媒:歯磨き基剤) 1ml/kg 体重 6回/週、80週間 ICI:投与開始後97、99週間 CBA:投与開始後104週間 C57BL:投与開始後104週間 CF/1:投与開始後93週間
群構成	濃度 : 動物数(検索数) 雄 雌	濃度 : 動物数(検索数) ICI CBA
	溶媒対照群:104(72) 104(59) 17mg/kg/日: 52(37) 52(35) 60mg/kg/日: 52(38) 52(38)	溶媒対照群:52(49) 52(51) 60mg/kg/日:52(47) 52(51)
		濃度 : 動物数(検索数) C57BL CF/1
		溶媒対照群:52(46) 52(45) 60mg/kg/日:52(51) 52(48)
腫瘍発生 肝臓	雌雄とも肝腫瘍は対照群と比較して増加していない	肝腫瘍は各系統ともに対照群と比較して増加していない
腎臓	雄 60mg/kg/日で腎臓腫瘍(Hypernephroma, Adenoma)を誘発、雌の各群に腎臓腫瘍の発生はなかった	ICI miceに 60mg/L投与した群で腎臓腫瘍の発生:5例(内、3例が悪性腫瘍)、対照群では良性腎腫瘍1例、CBA、C57BL、CF/1 miceには腎臓腫瘍の発生はなかった

なお、クロロホルム投与によるマウスの鼻腔病変について、J.L.Larsonら(1992,文献 21)は、B6C3F₁雌マウスを用いて短期吸入試験(6時間/日、7日間)を実施した結果、鼻腔病変は認められなかったと報告している。

しかし、今回のがん原性試験では、BDF₁マウスの雌雄の鼻中隔に骨化生嗅上皮の呼吸上皮化生の増加を認めた。

V 結論

F344/DuCrj (Fischer) ラット及びCrj:BDF₁マウスを用いてクロロホルムの2年間(104週間)にわたる吸入によるがん原性試験を行った。

ラットでは雌雄ともにクロロホルムの投与による腫瘍の発生は認められなかった。しかし、非腫瘍性病変として、鼻腔の変化を認め(雌雄に骨化生、杯細胞増生及び嗅上皮の炎症と呼吸上皮化生の発生増加、雄にのみ嗅上皮の壊死の発生増加)、これらの中で骨化生と嗅上皮の呼吸上皮化生は雌雄とも最低濃度の 10ppm群でも発生増加を認めた。その他、精巣の萎縮の発生増加を雄の 90ppm群、肝臓の空胞性小増殖巣の発生増加を雌の 90ppm群で認めた。また、幾つかの加齢性病変の発生低下も認めた。

マウスでは、腫瘍性病変として雄で腎細胞癌の発生がPeto検定、Cochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定では 90ppm群に对照群に比べて有意な増加を認めた。さらに、腎細胞腺腫と腎細胞癌を合わせた検定でもPeto検定、Cochran-Armitage検定で増加傾向を認め、Fisher検定では 30ppm以上の群で对照群に比べて有意な増加を示した。また、雌で肝細胞癌の発生がPeto検定で増加傾向を示した。また、非腫瘍性病変として、鼻腔の変化を認め(雌雄に骨化生と嗅上皮の呼吸上皮化生の発生増加、雌にのみ鼻腺の呼吸上皮化生と呼吸上皮のエオジン好性変化の発生増加)、これらの中で骨化生は雌雄とも最低濃度の 5ppm群でも発生増加を認めた。また、腎臓の尿細管上皮には雄の 30ppm以上の群で核の大小不同、好塩基性変化及び嚢胞状過形成、雌の 90ppm群で好塩基性変化を認めた。肝臓には脂肪変性の発生増加を雄の 90ppm群で認めた。また、マウスでも幾つかの加齢性病変の発生低下を認めた。

以上のことから、クロロホルムの投与はCrj:BDF₁マウスの雄に腎臓の腎細胞癌と腎細胞腺腫、雌に肝臓の肝細胞癌を発生増加させ、クロロホルムのがん原性が証明された。その腫瘍発生濃度は、雄で 30ppmであった。

VI 文献

1. 化学工業日報社(1993)
12093の化学商品
pp.395-396,化学工業日報社,東京.
2. 化学工業日報社(1994)
12394の化学商品
pp.403,化学工業日報社,東京.
3. International Agency for Research on Cancer(1979)
Some Halogenated Hydrocarbons.
IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk
of Chemicals to Humans,
vol.20,pp.401-427.
International Agency for Research on Cancer,Lyon.
4. 日本産業衛生学会(1993)
許容濃度の勧告(1993)
産業医学,35,323-343.
5. American Conference of Governmental Industrial Hygienists
(1991)
ACGIH化学物質と物理因子のTLV 化学物質のBEI(1991~1992年度用)
日測協資料 No30,pp28,日本作業環境測定協会.
6. American Conference of Governmental Industrial Hygienists
(1986)
Documentation of the Threshold Limit Values and Biological
Exposure Indices(1986)
vol.5,pp.130-131.
7. 後藤 稠、池田正之、原 一郎編(1981)
産業中毒便覧(増補版)
pp.576-577,医歯薬出版社,東京.
8. 中央労働災害防止協会(1991)
化学物質の危険・有害便覧
pp288-289,中央労働災害防止協会,東京.

9. Davidson, I. W. F., Sumner, D. D. and Parker, J. C. (1982)
Chloroform: A Review of Its Metabolism, Teratogenic,
Mutagenic, and Carcinogenic Potential.
Drug and Chemical Toxicology., 5, 1-87.
10. Rosenthal, S. L. (1987)
A Review of the Mutagenicity of Chloroform.
Environmental and Molecular Mutagenesis., 10, 211-226.
11. Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. T.,
Newell, G. W. and Salamone, M. F. (1983)
The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity.
Mutation Research., 123, 61-118.
12. Larson, J. L., Wolf, D. C. and Butterworth, B. E. (1993)
Acute Hepatotoxic and Nephrotoxic Effects of Chloroform in
Male F-344 Rats and Female B6C3F1 Mice.
Fundamental and Applied Toxicology., 20, 302-315.
13. Sweet, D. V (ed) (1987)
Registry of Toxic Effects of Chemical Substance (1985-1986)
Vol. 3, pp. 1548.
NIOSH, U. S. Dept. Health and Human Services, Washington, D. C.
14. Reuber, M. D. (1979)
Carcinogenicity of Chloroform.
Environmental Health Perspectives., 31, 171-182
15. National Cancer Institute (1976)
Report on Carcinogenesis Bioassay of Chloroform.
PB-264 018.
National Technical Information Service.
16. Jorgenson, T. A., Meierhenry, E. F., Rushbrook, C. J., Bull, R. J. and
Robinson, M. (1985)
Carcinogenicity of Chloroform in Drinking Water to Male
Osborne-Mendel Rats and Female B6C3F1 Mice.
Fundamental and Applied Toxicology., 5, 760-769.

17. Roe, F. J. C., Palmer, A. K., Worden, A. N. and van Abbe, N. J. (1979)
Safety Evaluation of Toothpaste Containing Chloroform
1. Long-Term Studies in Mice.
Journal of Environmental Pathology and Toxicology., 2, 799-819.
18. International Agency for Research on Cancer (1987)
Overall Evaluation of Carcinogenicity: An Updating of IARC
Monographs Volumes 1 to 42
IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of
Chemicals to Humans, Suppl. 7, pp. 152-154.
International Agency for Research on Cancer, Lyon.
19. 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.
20. Peto, R., Pike, M. C., Day, N. E., Gray, R. G., Lee, P. N., Parish, S.,
Peto, J., Richrds, S. and Wahrendorf, J. (1980)
Guidlines for Simple, Sensitive Significance Test for
Carcinogenic Effects in Long-term Animal Experiments.
In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for
Carcinogenes: A Critical Appraisal,
IARC Monographs, Suppl. 2, pp. 311-426,
International Agency for Research on Cancer, Lyon.
21. Larson, J. L., Wolf, D. C., Morgan, K. T., Mery, S. and
Butterworth, B. E. (1994)
The Toxicity of one week Exposures to Inhaled Chloroform in
Female B6C3F₁ Mice and Male F344 Rats.
Submitted to Toxicology and Applied Pharmacology.