

ジクロロメタンのマウスを用いた  
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0279

CAS No. 75-09-2

平成12年3月31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

ジクロロメタンのマウスを用いた  
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0279

本 文

## 本文目次

頁

要約 .....	1
I 試験材料	
I-1 被験物質の性状等	
I-1-1 名称等 .....	4
I-1-2 構造式、示性式、分子量 .....	4
I-1-3 物理化学的性状等 .....	4
I-2 被験物質の使用ロット等 .....	5
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性	
I-3-1 特性・同一性 .....	5
I-3-2 安定性 .....	5
I-4 試験動物 .....	6
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 .....	7
II-1-2 投与濃度及びその設定理由 .....	7
II-1-3 被験物質の発生方法と濃度調整 .....	7
II-1-4 被験物質の濃度測定 .....	8
II-2 動物管理	
II-2-1 各群の使用動物数 .....	8
II-2-2 群分け及び個体識別方法 .....	8
II-2-3 飼育条件 .....	8

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	9
II-3-2	体重測定	9
II-3-3	摂餌量測定	9
II-3-4	血液学的検査	10
II-3-5	血液生化学的検査	10
II-3-6	尿検査	10
II-3-7	病理学的検査	10
II-4	数値処理と統計学的方法	
II-4-1	数値の取り扱いと表示	10
II-4-2	母数の取り扱い	11
II-4-3	統計処理	11
II-5	試資料の保管	12
III	試験成績	
III-1	動物の状態観察	
III-1-1	生死状況	13
III-1-2	一般状態	13
III-1-3	体重	13
III-1-4	摂餌量	14
III-2	血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査	
III-2-1	血液学的検査	14
III-2-2	血液生化学的検査	14
III-2-3	尿検査	14
III-3	病理学的検査	
III-3-1	剖検	15
III-3-2	臓器重量	15
III-3-3	病理組織学的検査	15
III-3-4	死因	20

IV 考察及びまとめ

IV-1 生死状況、体重、摂餌量 .....	21
------------------------	----

IV-2 血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査 .....	21
--------------------------------	----

IV-3 腫瘍性病変

IV-3-1 雄の腫瘍性病変 .....	21
----------------------	----

IV-3-2 雌の腫瘍性病変 .....	22
----------------------	----

IV-4 非腫瘍性病変 .....	24
-------------------	----

IV-5 他の報告との比較 .....	24
---------------------	----

V 結論 .....	26
------------	----

VI 文献 .....	27
-------------	----

## TABLES

- TABLE 1 EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE
- TABLE 2 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE
- TABLE 3 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE
- TABLE 4 INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE
- TABLE 5 INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE
- TABLE 6 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE
- TABLE 7 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE
- TABLE 8 SELECTED NON NEOPASTIC LESIONS OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE
- TABLE 9 SELECTED NON NEOPASTIC LESIONS OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

## TABLES (CONTINUED)

TABLE 10 NEOPLASTIC LESIONS INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS IN  
MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF  
DICHLOROMETHANE

TABLE 11 NEOPLASTIC LESIONS INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS IN  
FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF  
DICHLOROMETHANE

TABLE 12 CAUSE OF DEATH OF MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF  
DICHLOROMETHANE

## FIGURES

FIGURE 1 DICHLOROMETHANE VAPOR GENERATION SYSTEM AND INHALATION SYSTEM

FIGURE 2 SURVIVAL ANIMAL RATE OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE 3 SURVIVAL ANIMAL RATE OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE 4 BODY WEIGHT CHANGES OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE 5 BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE 6 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE 7 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE



## PHOTOGRAPHS

- PHOTOGRAPH 1 LUNG : BRONCHIOLAR-ALVEOLAR CARCINOMA  
MALE, 4000ppm, ANIMAL No. 1303 ( H&E )
- PHOTOGRAPH 2 LUNG : BRONCHIOLAR-ALVEOLAR CARCINOMA  
FEMALE, 4000ppm, ANIMAL No. 2305 ( H&E )
- PHOTOGRAPH 3 LUNG : HYPERPLASIA : TERMINAL BRONCHIOLE  
MALE, 4000ppm, ANIMAL No. 1303 ( H&E )
- PHOTOGRAPH 4 LIVER : HEPATOCELLULAR CARCINOMA  
MALE, 4000ppm, ANIMAL No. 1313 ( H&E )
- PHOTOGRAPH 5 LIVER : HEPATOCELLULAR ADENOMA  
MALE, 4000ppm, ANIMAL No. 1344 ( H&E )
- PHOTOGRAPH 6 LIVER : HEMANGIOMA  
FEMALE, 4000ppm, ANIMAL No. 2304 ( H&E )
- PHOTOGRAPH 7 LIVER : VACUOLIC CHANGE : PERIPHERAL(MODERATE)  
MALE, 4000ppm, ANIMAL No. 1346 ( H&E )

## APPENDIXES

- APPENDIX A 1 CLINICAL OBSERVATION : SUMMARY, MOUSE : MALE  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX A 2 CLINICAL OBSERVATION : SUMMARY, MOUSE : FEMALE  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX B 1 BODY WEIGHT CHANGES : SUMMARY, MOUSE : MALE  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX B 2 BODY WEIGHT CHANGES : SUMMARY, MOUSE : FEMALE  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX C 1 FOOD CONSUMPTION CHANGES : SUMMARY, MOUSE : MALE  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX C 2 FOOD CONSUMPTION CHANGES : SUMMARY, MOUSE :  
FEMALE ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX D 1 HEMATOLOGY : SUMMARY, MOUSE : MALE ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX D 2 HEMATOLOGY : SUMMARY, MOUSE : FEMALE  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX E 1 BIOCHEMISTRY : SUMMARY, MOUSE : MALE ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX E 2 BIOCHEMISTRY : SUMMARY, MOUSE : FEMALE  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX F 1 URINALYSIS : SUMMARY, MOUSE : MALE ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX F 2 URINALYSIS : SUMMARY, MOUSE : FEMALE ( 2-YEAR STUDY )

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX G 1 GROSS FINDINGS : SUMMARY, MOUSE : MALE :  
ALL ANIMALS ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX G 2 GROSS FINDINGS : SUMMARY, MOUSE : MALE :  
DEAD AND MORIBUND ANIMALS ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX G 3 GROSS FINDINGS : SUMMARY, MOUSE : MALE :  
SACRIFICED ANIMALS ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX G 4 GROSS FINDINGS : SUMMARY, MOUSE : FEMALE :  
ALL ANIMALS ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX G 5 GROSS FINDINGS : SUMMARY, MOUSE : FEMALE :  
DEAD AND MORIBUND ANIMALS ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX G 6 GROSS FINDINGS : SUMMARY, MOUSE : FEMALE :  
SACRIFICED ANIMALS ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX H 1 ORGAN WEIGHT, ABSOLUTE : SUMMARY, MOUSE : MALE  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX H 2 ORGAN WEIGHT, ABSOLUTE : SUMMARY, MOUSE : FEMALE  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX I 1 ORGAN WEIGHT, RELATIVE : SUMMARY, MOUSE : MALE  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX I 2 ORGAN WEIGHT, RELATIVE : SUMMARY, MOUSE : FEMALE  
( 2-YEAR STUDY )

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX J 1 HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS :  
SUMMARY, MOUSE : MALE : ALL ANIMALS  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX J 2 HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS :  
SUMMARY, MOUSE : MALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX J 3 HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS :  
SUMMARY, MOUSE : MALE : SACRIFICED ANIMALS  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX J 4 HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS :  
SUMMARY, MOUSE : FEMALE : ALL ANIMALS  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX J 5 HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS :  
SUMMARY,MOUSE :FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX J 6 HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS :  
SUMMARY, MOUSE : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX K 1 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF  
TUMORS-TIME RELATED, MOUSE : MALE
- APPENDIX K 2 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF  
TUMORS-TIME RELATED, MOUSE : FEMALE
- APPENDIX L 1 HISTOLOGICAL FINDINGS : NEOPLASTIC LESIONS :  
SUMMARY, MOUSE : MALE ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX L 2 HISTOLOGICAL FINDINGS : NEOPLASTIC LESIONS :  
SUMMARY, MOUSE : FEMALE ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX M 1 NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL  
ANALYSIS, MOUSE : MALE ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX M 2 NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL  
ANALYSIS, MOUSE : FEMALE ( 2-YEAR STUDY )

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX N 1 HISTOLOGICAL FINDINGS:NEOPLASTIC LESIONS–TIME  
RELATED, MOUSE : MALE ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX N 2 HISTOLOGICAL FINDINGS:NEOPLASTIC LESIONS–TIME  
RELATED, MOUSE : FEMALE ( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX O 1 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR :  
SUMMARY, MOUSE : MALE : ALL ANIMALS  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX O 2 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR :  
SUMMARY, MOUSE : MALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX O 3 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR :  
SUMMARY, MOUSE : MALE : SACRIFICED ANIMALS  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX O 4 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR :  
SUMMARY, MOUSE : FEMALE : ALL ANIMALS  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX O 5 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR :  
SUMMARY,MOUSE:FEMALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX O 6 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR :  
SUMMARY, MOUSE : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS  
( 2-YEAR STUDY )
- APPENDIX P 1 IDENTITY OF DICHLOROMETHANE IN THE 2-YEAR  
INHALATION STUDY
- APPENDIX P 2 STABILITY OF DICHLOROMETHANE IN THE 2-YEAR  
INHALATION STUDY

## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX Q 1 CONCENTRATION OF DICHLOROMETHANE IN THE  
INHALATION CHAMBER OF THE 2-YEAR INHALATION STUDY
- APPENDIX Q 2 ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF INHALATION CHAMBER  
IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF  
DICHLOROMETHANE
- APPENDIX R 1 METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY AND  
URINALYSIS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF  
DICHLOROMETHANE
- APPENDIX R 2 UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND  
BIOCHEMISTRY IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF  
DICHLOROMETHANE

## 要約

ジクロロメタンのがん原性を検索する目的でマウスを用いた吸入による2年間（104週間）の試験を実施した。

試験には Crj:BDF<sub>1</sub> マウスを被験物質投与群3群と対照群1群の構成で各群雌雄各50匹の合計400匹を使用した。投与はジクロロメタンを1日6時間、1週5日、104週間、動物に全身暴露することにより行った。投与濃度は、雌雄ともに1000ppm、2000ppm、4000ppmとした。また、検査項目として一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

被験物質の投与期間中、雌雄とも2000ppm以上の群に生存率の低下、全投与群に体重増加の抑制を認めた。最終計測週(104週)における生存率は、雄：対照群76%、1000ppm群70%、2000ppm群52%、4000ppm群40%、雌：対照群52%、1000ppm群52%、2000ppm群34%、4000ppm群42%であり、体重は対照群に対し雄：1000ppm群90%、2000ppm群88%、4000ppm群70%、雌：1000ppm群96%、2000ppm群92%、4000ppm群83%であった。これら投与群での生存率の低下は、ジクロロメタンの投与による肺腫瘍や肝腫瘍の発生によるものと考えられた。病理組織学的検査ではジクロロメタンの投与で、雌雄とも肺の細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌、ならびに肝細胞腺腫と肝細胞癌の顕著な発生増加を認めた。また、雄では肝臓に血管腫の発生の増加と副腎に褐色細胞腫の発生増加が示され、雌では肝臓では血管腫単独での増加は明確に示されなかったが、血管腫に血管肉腫を合わせた発生で増加が示された。これらの腫瘍の発生増加についても被験物質の投与の影響を否定できなかった。そのほか、4000ppm群の雌雄の肺に細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌の前腫瘍性変化と考えられる終末細気管支上皮の過形成の増加を認め、4000ppm群の雌雄に肝臓の小葉周辺性の空胞変性を認めた。

以上のように、雌雄のマウスに肺の細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌、ならびに肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加が認められ、この結果は、ジクロロメタンの雌雄のマウスに対するがん原性を示す明らかな証拠（clear evidence）と考えられた。

ジクロロメタンのがん原性試験における主な腫瘍発生 (雄)

投与濃度 (ppm)			Control	1000	2000	4000	ハート	コクソアミテージ
検 査 動 物 数			50	50	50	50	検定	検定
良 性 腫 瘍	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	7	3	4	14	↑↑	↑
	肝臓	肝細胞腺腫	10	13	14	15	↑	
		血管腫	0	4	3	5*	↑	
	副腎	褐色細胞腫	1	0	1	3	↑	
悪 性 腫 瘍	肺	細気管支-肺胞上皮癌	1	14**	22**	39**	↑↑	↑↑
	リンパ節	悪性リンパ腫	14	13	16	9		
	肝臓	肝細胞癌	10	9	14	20*	↑↑	↑↑
		肝芽腫	0	0	0	1		
		血管肉腫	1	0	1	1		
	脾臓	悪性リンパ腫	2	1	5	2		
		肥胖細胞腫：悪性	2	4	0	0		
	肺	(細気管支-肺胞上皮腺腫 /細気管支-肺胞上皮癌)	8	17*	26**	42**	↑↑	↑↑
	肝臓	(肝細胞腺腫/肝細胞癌/肝芽腫)	15	20	25*	29**	↑↑	↑↑
		(血管腫/血管肉腫)	1	4	4	6	↑↑	
	全臓器	血管腫	1	5	6	7*	↑↑	
		組織球性肉腫	5	2	3	0*		↓

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

\* :  $p \leq 0.05$  で有意      \*\* :  $p \leq 0.01$  で有意      (フィッシャー検定)  
 ↑ :  $p \leq 0.05$  で有意増加    ↑↑ :  $p \leq 0.01$  で有意増加    (ハート、コクソアミテージ 検定)  
 ↓ :  $p \leq 0.05$  で有意減少    ↓↓ :  $p \leq 0.01$  で有意減少    (コクソアミテージ 検定)



ジクロロメタンのがん原性試験における主な腫瘍発生 (雌)

投与濃度 (ppm)			Control	1000	2000	4000	ヘト	コクソアミテージ
検 査 動 物 数			50	50	49	50	検定	検定
良 性 腫 瘍	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	2	4	5	12**	↑↑	↑↑
	肝臓	肝細胞腺腫	1	7 <sup>a)*</sup>	4	16**	↑↑	↑↑
		血管腫	2	2 <sup>a)</sup>	0	5		
	皮下組織	血管腫	2	0	0	0		
	下垂体	腺腫	13	9	6	6		
	卵巣	嚢胞腺腫	0	2	1	3		
悪 性 腫 瘍	肺	細気管支-肺胞上皮癌	3	1	8	20**	↑↑	↑↑
		腺扁平上皮癌	0	0	0	1		
	肝臓	肝細胞癌	1	1 <sup>a)</sup>	5	19**	↑↑	↑↑
		血管肉腫	1	0 <sup>a)</sup>	0	2		
	リンパ節	悪性リンパ腫	23	31	19	15		↓
	皮下組織	血管肉腫	1	1	0	0		
	乳腺	腺癌	2	0	1	3		
	子宮	組織球性肉腫	15	10	15	13		
	肺	(細気管支-肺胞上皮腺腫 /細気管支-肺胞上皮癌 /腺扁平上皮癌)	5	5	12*	30**	↑↑	↑↑
	肝臓	(肝細胞腺腫/肝細胞癌)	2	8 <sup>a)*</sup>	9*	30**	↑	↑↑
		(血管腫/血管肉腫)	3	2 <sup>a)</sup>	0	7	↑↑	
	皮下組織	(血管腫/血管肉腫)	3	1	0	0		↓
	全臓器	悪性リンパ腫	25	33	21	17		↓

a) : 検査動物数 49、他は上段に表示の動物数と同じ  
 検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

\* :  $p \leq 0.05$  で有意      \*\* :  $p \leq 0.01$  で有意      (フィッシャー検定)  
 ↑ :  $p \leq 0.05$  で有意増加    ↑↑ :  $p \leq 0.01$  で有意増加    (ヘト、コクソアミテージ検定)  
 ↓ :  $p \leq 0.05$  で有意減少    ↓↓ :  $p \leq 0.01$  で有意減少    (コクソアミテージ検定)

## I 試験材料

## I-1 被験物質の性状等

## I-1-1 名称等

名 称 : ジクロロメタン (Dichloromethane)

別 名 : 二塩化メチレン

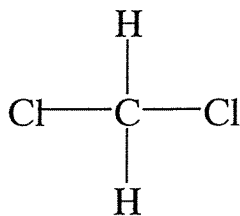
塩化メチレン

メチレンクロライド

メチレンジクロライド

CAS No. : 75-09-2

## I-1-2 構造式、示性式、分子量



$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (分子量 : 84.93)

## I-1-3 物理化学的性状等

性 状 : 揮発性の無色透明な液体

沸 点 : 39.95°C

凝 固 点 : -96.8°C

比 重 : 1.3255(20°C)

蒸 気 圧 : 440mmHg(25°C)

溶 解 性 : 水に微溶、エタノール、エーテルに易溶

保存条件 : 室温、遮光条件下で気密容器に保存

## I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号：

APR 5260 (1994 年 11 月 18 日 ~1995 年 1 月 9 日)  
KCH 4634 (1995 年 1 月 9 日 ~1995 年 4 月 3 日)  
ESR 7256 (1995 年 4 月 4 日 ~1995 年 6 月 28 日)  
ESM 2924 (1995 年 6 月 28 日 ~1995 年 9 月 22 日)  
ESJ 4826 (1995 年 9 月 22 日 ~1995 年 12 月 25 日)  
ESF 6669 (1995 年 12 月 25 日 ~1996 年 4 月 1 日)  
DLP 1873 (1996 年 4 月 1 日 ~1996 年 6 月 27 日)  
DLL 3810 (1996 年 6 月 28 日 ~1996 年 9 月 26 日)  
DLH 5609 (1996 年 9 月 27 日 ~1996 年 11 月 14 日)

製 造 元：和光純薬工業株式会社

グ レ ー ド：試薬特級

純 度：99.9%以上

## I-3 被験物質の特性・同一性、安定性

## I-3-1 特性・同一性

被験物質の同一性の確認は各ロット毎の被験物質のマススペクトル及び赤外吸収スペクトルを測定し、ジクロロメタンの文献値と比較することにより行った。

その結果、マススペクトルでは文献値（文献 1）と同じ分子イオン及びフラグメントピークが認められ、また、赤外吸収スペクトルでは文献値（文献 2）と同じ波数にピークが認められたことからジクロロメタンであることを確認した。

測定結果については、APPENDIX P1 に示した。

## I-3-2 安定性

被験物質の安定性は使用開始前及び使用終了後に、赤外吸収スペクトル及びガスクロマトグラムを測定し、それぞれのデータを比較することにより行った。

その結果、測定結果に差はみられず、投与期間中のジクロロメタンは安定であった。

測定結果については、APPENDIX P2 に示した。

#### I - 4 試験動物

動物は日本チャールス・リバー（株）（神奈川県厚木市下古沢 795 番地）から購入した Crj:BDF<sub>1</sub> マウス（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 248 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（群構成時体重範囲、雄:20.4～23.0g、雌:17.0～19.4g）を選別して試験に供した。

## II 試験方法

試験計画、材料及び方法等の概要を TABLE 1 に示した。

### 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。吸入チャンバー内に設定濃度に調整したジクロロメタンを含む新鮮空気を送り込み、6 時間/日、5 日間/週、104 週間（祝祭日を除く）、試験動物に全身暴露した。投与期間中の暴露回数は 489 回であった。なお、対照群には新鮮空気のみを送気した。

#### II-1-2 投与濃度及びその設定理由

投与濃度は雌雄とも 1000ppm、2000ppm、4000ppm（公比 2.0）とした。

投与濃度は 13 週間投与試験の結果に基づき設定した。すなわち、13 週間試験（文献 3）は、6 週齢の Crj:BDF<sub>1</sub> マウス 120 匹を 5 投与群と 1 対照群（各群雌雄各 10 匹）に分け、ジクロロメタン投与群の濃度を 500ppm、1000ppm、2000ppm、4000ppm、8000ppm とし、各群 1 日 6 時間、1 週 5 日間、13 週間、全身暴露して行った。

その結果、8000ppm 群では雌 1 例が死亡し、動物の状態観察で暴露開始後、雌雄ともに短時間の興奮状態を示した後、横臥状態となった。雌 1 例の死因は神経症状が強く疑われた。また、8000ppm 群では雌雄とも体重の増加抑制（雌雄ともに最終計測時で対照群の 90%）を認めたほか、血液学的検査及び血液生化学的検査でも変化を認め、病理組織学的検査で雌雄の肝臓に軽度または中等度の小葉周辺性の空胞変性を認めた。

4000ppm 以下の群では全例が生存し、4000ppm 群に雌雄とも血液生化学的検査で総蛋白と尿素窒素の低値、臓器重量で肝重量の増加、病理組織学的検査で雌の肝臓に軽度の小葉周辺性の空胞変性を認めるなど、血液生化学的検査、臓器重量及び病理組織学的検査に若干の変化を認めた。しかし一般状態、体重、摂餌量には対照群と比較して顕著な差を認めなかった。

#### 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を FIGURE 1 に示した。まず、発生容器内のジクロロメタンを循環式恒温層で加熱(30℃)しながら、清浄空気のパブリングにより蒸発させた。次に、このジクロロメタン蒸気を循環式恒温槽で一定温度（18℃）に冷却、再加熱(30℃)し、新鮮空気と混合して一定濃度に調整した後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバーのラインミキサーに供給した。最終的には、吸入チャンバー内のジクロロメタン濃度をガスクロマトグラフにより測定・監視しながら、吸入チャンバーへの供給流量を調節することにより、チャンバー内

濃度を設定濃度に調整した。

#### II-1-4 被験物質の濃度測定

吸入チャンバー内のジクロロメタン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。

測定結果については、APPENDIX Q1 に示した。

各投与群における被験物質濃度の測定結果（平均値±標準偏差）は、1000ppm 群:991.2±8.9ppm、2000ppm 群:1989.8±14.4ppm、4000ppm 群:3980.5±24.8ppm であった。

#### II-2 動物管理

##### II-2-1 各群の使用動物数

投与群 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群雌雄各 50 匹の動物を用いた。

群 名 称	雄使用動物数（動物番号）	雌使用動物数（動物番号）
対照群	50 匹 (1001～1050)	50 匹 (2001～2050)
1,000 ppm	50 匹 (1101～1150)	50 匹 (2101～2150)
2,000 ppm	50 匹 (1201～1250)	50 匹 (2201～2250)
4,000 ppm	50 匹 (1301～1350)	50 匹 (2301～2350)

##### II-2-2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、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を合計した値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 4）。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫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バンチにより識別した。なお、全飼育期間を通してケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した部屋に収容し、室扉には試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

##### II-2-3 飼育条件

動物は、検疫室（517、518 室）で 1 週間の検疫飼育を行った後、馴化及び投与期間中は

511 室に設置した吸入チャンバー内で飼育した。試験に使用した検疫室、吸入チャンバー室及び吸入チャンバー内の環境条件を Table 1 に示した。

投与期間の吸入チャンバー内の飼育環境は、温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 15\%$ 、暴露中換気回数  $6 \pm 0.5$  回/時、飼育中換気回数  $12 \pm 1$  回/時、圧力  $0 \sim -15\text{mmAq}$  に、吸入チャンバーが設置されている飼育室は、温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 10\%$ 、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/時に設定した。その結果、吸入チャンバー内環境はすべて設定条件の範囲内であった。また、投与期間中の吸入チャンバー内環境の計測結果については、APPENDIX P2 に示した。

検疫期間中は 1 ケージ当たり 1 匹の単飼 (ステンレス製 2 連型網ケージ  $112\text{W} \times 212\text{D} \times 120\text{H}$  mm)、馴化期間中は 1 ケージ当たり 1 匹の単飼 (ステンレス製 6 連型網ケージ  $95\text{W} \times 116\text{D} \times 120\text{H}$  mm)、投与期間中は 1 ケージ当たり 1 匹の単飼 (ステンレス製 5 連網ケージ  $100\text{W} \times 116\text{D} \times 120\text{H}$  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)千葉工場 (千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1 固型飼料 ( $3\text{Mrad}=30\text{KGy}$  -  $\gamma$  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、飲水は飼育全期間を通して、市水 (秦野市水道局供給) をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水により自由摂取させた。

なお、飼料の夾雑物については(財)日本食品分析センター (東京都渋谷区元代々木町 52 番 1 号) の分析データを使用ロットごとに入手し、飲料水については(財)食品薬品安全センター秦野研究所 (神奈川県秦野市落合 729-5) に 3 ヶ月毎に分析を委託し、それぞれ試験計画書に規定した許容基準と比較して異常のないことを確認した。

## 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

投与期間中は生死及び瀕死の確認を毎日 1 回以上行い、全動物の一般状態の観察を週 1 回行った。

### II-3-2 体重測定

投与開始後 14 週までは週 1 回 (第 1 週は投与開始日と最終日の合計 2 回測定)、それ以降は 4 週に 1 回、体重を測定した。

なお、動物の死亡発見時及び切迫屠殺時にも体重を測定した。

### II-3-3 摂餌量測定

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回給餌量及び残餌量を測定し (104 週にも測定)、その値から摂餌量を算出した。

#### 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 EDTA-2K 入り採血管に採血した血液を用いて血液学的検査を行った。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 R1 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ヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、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 R1 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 R1 に示した。

#### II-3-7 病理学的検査

##### （1）剖検

全動物について剖検を行った。

##### （2）臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について TABLE 1 に示した臓器の実重量を測定した。また、実重量の体重比、すなわち定期解剖時の体重に対する百分率を算出した。

##### （3）病理組織学的検査

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組織を、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。

#### II-4 数値処理と統計学的方法

##### II-4-1 数値の取り扱いと表示

チャンバー内被験物質濃度については ppm を単位として、小数点以下第 4 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。

体重については g を単位とし、小数点以下第 2 位まで計測し、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。

摂餌量については g を単位とし、計測期間を通しての摂餌量を小数点以下第 1 位まで計測し、この値を計測期間の日数で除し、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。

臓器実重量については g を単位とし、小数点以下第 3 位まで計測して表示した。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 R2 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い表示した。

#### II-4-2 母数の取り扱い

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、その中から欠測となったデータを除外して母数とした。

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を除外して母数とした。

尿検査は、投与最終週まで生存した動物を対象に行い、検査ができた動物数を母数とした。

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、検査不能臓器数を除いたものを母数とした。

#### II-4-3 統計処理

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は、所見のみられなかった動物をグレード 0 として  $\chi^2$  検定を行った。また、尿検査についても  $\chi^2$  検定を行った。

腫瘍性病変については、各臓器腫瘍ごとに、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto 検

定（文献 5）、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（注）を用いて、死亡率法（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（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（コンテックス 0～4 の総計で検定）を行った。

$\chi^2$  検定と Fisher 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。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

0：定期解剖例にみつかった腫瘍

1：死亡／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍

2：多分 1 だと思うが、確かでない腫瘍

3：多分 4 だと思うが、確かでない腫瘍

4：死亡／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関わっていた腫瘍

## 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 5 年間とする。

### III 試験成績

#### III-1 動物の状態観察

##### III-1-1 生死状況

生死状況を TABLE 2,3 及び FIGURE 2,3 に示した。

雌雄とも 2000ppm と 4000ppm 群の生存率は他の群に比較して低値であった。各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、雄では対照群 38 /50 例(76%)、1000ppm 群 35/50 例(70%)、2000ppm 群 26/50 例(52%)、4000ppm 群 20/50 例(40%)、雌では対照群 26/50 例(52%)、1000ppm 群 26/50 例(52%)、2000ppm 群 17/49 例(35%)、4000ppm 群 21/50 例(42%)であった。なお、雌 2000ppm 群の 1 例は試験 1 週に事故死した。

##### III-1-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A1,A2 に、外部腫瘍、内部腫瘍の発生動物数を TABLE 4,5 に示した。

一般状態の観察からは投与群に特徴的な所見は死亡/瀕死動物及び生存動物のいずれにも認められなかった。

外部腫瘍の累積発生例数は雄：対照群 3/50 例、1000ppm 群 6/50 例、2000ppm 群 2/50 例、4000ppm 群 2/50 例、雌：対照群 3/50 例、1000ppm 群 4/50 例、2000ppm 群 3/49 例、4000ppm 群 8/50 例で、雌雄各群とも類似した発生であった。

内部腫瘍の累積発生例数は雄：対照群 11/50 例、1000ppm 群 7/50 例、2000ppm 群 10/50 例、4000ppm 群 13/50 例、雌：対照群 20/50 例、1000ppm 群 16/50 例、2000ppm 群 19/49 例、4000ppm 群 17/50 例で、雌雄各群とも対照群に近似していた。

##### III-1-3 体重

体重の推移を TABLE 2,3、FIGURE 4,5 及び APPENDIX B1,B2 に示した。

雄では、投与開始 10 週までは、各投与群の体重は対照群とほぼ同様に推移したが、11 週以降は 2000ppm 群の 11 週から 38 週の期間を除き増加抑制がみられた。雌では、投与開始 14 週までは 2000ppm 以上の群で対照群を上回る週が散見された。しかし 18 週以降は各投与群の体重は増加抑制傾向で推移した。最終計測週（試験 104 週）での各投与群の体重値は対照群に対して、雄：1000ppm 群 90%、2000ppm 群 88%、4000ppm 群 70%、雌：1000ppm 群 96%、2000ppm 群 92%、4000ppm 群 83%であった。

### Ⅲ-1-4 摂餌量

摂餌量を TABLE 6,7、FIGURE 6,7 及び APPENDIX C1,C2 に示した。

雌雄とも 4000ppm 群でほぼ全投与期間を通じて摂餌量の高値(雄: 対照群の 100~113%、雌: 対照群の 100~109%) が認められた。なお、90 週では雄 2000ppm 群で対照群の 131%、4000ppm 群で対照群の 127%、雌 2000ppm 群で対照群の 138%、4000ppm 群で対照群の 131%と高値が示されたが、この週にみられた摂餌量の増加は雌雄とも投与濃度に対応したものではなかった。

### Ⅲ-2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

#### Ⅲ-2-1 血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX D1, D2 に示した。

雄では、全投与群でヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の増加を認めた。このほか、1000ppm 群の MCV、MCH の増加、2000ppm 群の血小板数に統計学的な有意差を認めたが投与濃度に対応した変化ではなかった。

雌では、1000ppm と 2000ppm 群のヘモグロビン濃度とヘマトクリット値、1000ppm 群の MCHC に統計学的な有意差を認めたが投与濃度に対応した変化ではなかった。

#### Ⅲ-2-2 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を APPENDIX E1, E2 に示した。

雄では、4000ppm 群に ALP の増加を認めた。このほか、1000ppm と 2000ppm 群のトリグリセライドと尿素窒素、4000ppm 群の GOT、GPT、LDH、塩素及び CPK に統計学的な有意差を認めたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

雌では、4000ppm 群にアルブミン、総ビリルビン、GOT、GPT、ALP、ナトリウムの増加とトリグリセライドの減少を認めた。このほか、4000ppm 群の LDH と CPK に統計学的な有意差を認めたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

#### Ⅲ-2-3 尿検査

尿検査の結果を APPENDIX F1,F2 に示した。

雄では、4000ppm 群で蛋白とケトン体の陽性例の減少を認めた。このほか、1000ppm 群と 4000ppm 群の pH に統計学的な有意差を認めたが投与濃度に対応した変化ではなかった。

雌では、4000ppm 群で蛋白陽性例の減少を認めた。

### III-3 病理学的検査

#### III-3-1 剖検

解剖時に認められた剖検所見を APPENDIX G1~G6 に示した。

雄では、肺の結節を対照群 6/50 例、1000ppm 群 16/50 例、2000ppm 群 27/50 例、4000ppm 群 40/50 例認め、投与濃度に対応した増加が示された。また、肝臓の結節を対照群 17/50 例、1000ppm 群 18/50 例、2000ppm 群 28/50 例、4000ppm 群 33/50 例認め、投与濃度に対応した増加が示された。

雌では、肺の結節を対照群 5/50 例、1000ppm 群 3/50 例、2000ppm 群 10/49 例、4000ppm 群 26/50 例に認め、投与濃度に対応した増加が示された。また、肝臓の結節を対照群 6/50 例、1000ppm 群 7/50 例、2000ppm 群 11/49 例、4000ppm 群 34/50 例に認め、投与濃度に対応した増加が示された。

#### III-3-2 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 H1, H2, I1, I2 に示した。

雄は肺の実重量と体重比の高値を 2000ppm と 4000ppm 群で、肝臓の体重比の高値を 4000ppm 群で認めた。なお、4000ppm 群では、解剖時体重の低値に伴って心臓と腎臓の実重量の低値と体重比の高値、精巣の実重量の低値、また、脳の体重比の高値を認めた。

雌は肺の実重量と体重比の高値を 2000ppm と 4000ppm 群で、肝臓の実重量と体重比の高値を 4000ppm 群で認めた。なお、4000ppm 群には解剖時体重の低値に伴って卵巣の実重量の低値、心臓及び脾臓の実重量の低値、腎臓の体重比の低値、脳の体重比の高値を認めた。そのほか、2000ppm 群の卵巣の実重量に統計学的な有意差が示されたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

#### III-3-3 病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果を APPENDIX J1~J6 に、その中の主な非腫瘍性病変を TABLE 8,9 に抜粋して示した。腫瘍性病変の結果は、APPENDIX K1, K2 に担腫瘍動物数と腫瘍数、APPENDIX L1, L2 に腫瘍の種類別の発生数、APPENDIX M1, M2 に統計解析（Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定）、APPENDIX N1, N2 に各腫瘍の時期別発生数を、APPENDIX O1~O6 に転移性病変を示し、主な腫瘍性病変を TABLE 10, 11 に抜粋した。

—雄の主な病変—

腫瘍性病変

<肺>

細気管支-肺胞上皮腺腫が対照群の 7/50 例、1000ppm 群の 3/50 例、2000ppm 群の 4/50 例及び 4000ppm 群の 14/50 例に発生し、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示された。病理組織学的に確認された細気管支-肺胞上皮腺腫は、瀕死または死亡による途中解剖例では 51 週から 94 週：対照群 0/6 例、1000ppm 群 0/6 例、2000ppm 群 0/12 例、4000ppm 群 2/14 例（初発例は 4000ppm 群の動物で 63 週）、95 週から 104 週：対照群 0/5 例、1000ppm 群 0/9 例、2000ppm 群 1/11 例、4000ppm 群 4/14 例、投与期間終了後の定期解剖では対照群 7/38 例、1000ppm 群 3/35 例、2000ppm 群 3/26 例、4000ppm 群 8/20 例であった。

細気管支-肺胞上皮癌が対照群の 1/50 例、1000ppm 群の 14/50 例、2000ppm 群の 22/50 例及び 4000ppm 群の 39/50 例に発生し、Peto 検定（死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向を示し、Fisher 検定で全投与群に対照群と比較して有意な増加が示された。

細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた発生でも Peto 検定（死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向を示し、Fisher 検定で全投与群に対照群と比較して有意な増加が示された。

細気管支-肺胞上皮癌の他臓器への転移は 1000ppm 群 1 例（胆嚢）、2000ppm 群 2 例（リンパ節、心臓、胃、肝臓、腎臓、筋肉、胸膜に転移 1 例、リンパ節、心臓、腎臓、副腎に転移 1 例）、4000ppm 群 7 例（リンパ節、肝臓、腎臓、筋肉、胸膜に転移 1 例、筋肉、胸膜に転移 1 例、心臓に転移 3 例、胸膜に転移 2 例）であった。

<肝臓>

肝細胞腺腫が対照群の 10/50 例、1000ppm 群の 13/50 例、2000ppm 群の 14/50 例及び 4000ppm 群の 15/50 例に発生し、Peto 検定（有病率法、有病率法+死亡率法）で有意な増加傾向が示された。

肝細胞癌が対照群の 10/50 例、1000ppm 群の 9/50 例、2000ppm 群の 14/50 例及び 4000ppm 群の 20/50 例に発生し、Peto 検定（死亡率法、有病率法、有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示され、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。また、肝芽腫が 4000ppm 群の 1 例に発生した。肝細胞腺腫と肝細胞癌、肝芽腫を合わせた発生でも Peto 検定（死亡率法、有病率法、有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示され、Fisher 検定で 2000ppm 以上の群に対照群と比較して有意な増加が示された。

た。病理組織学的に確認された肝細胞癌は、瀕死または死亡による途中解剖例では 51 週か

ら 94 週：対照群 1/6 例、1000ppm 群 1/6 例、2000ppm 群 5/12 例、4000ppm 群 2/14 例（初発例は 4000ppm 群の動物で 64 週）、95 週から 104 週：対照群 2/5 例、1000ppm 群 3/9 例、2000ppm 群 3/11 例、4000ppm 群 8/14、投与期間終了後の定期解剖では対照群 6/38 例、1000ppm 群 5/35 例、2000ppm 群 6/26 例、4000ppm 群 10/20 例であった。

肝細胞癌の他臓器への転移は対照群 3 例、1000ppm 群 2 例、2000ppm 群 5 例、4000ppm 群 5 例であり、転移先は骨髄に転移した対照群の 1 例を除いた全てが肺であった。

血管腫が 1000ppm 群の 4/50 例、2000ppm 群の 3/50 例及び 4000ppm 群の 5/50 例に発生した。血管腫は対照群に発生がなく、Peto 検定（有病率法、有病率法＋死亡率法）で有意な増加傾向が示され、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。対照群、2000ppm 及び 4000ppm 群に 1 例ずつ発生した血管肉腫を合わせた発生では Peto 検定（死亡率法、有病率法、有病率法＋死亡率法）で有意な増加傾向が示された。

#### <副腎>

褐色細胞腫が対照群の 1/50 例、2000ppm 群の 1/50 例及び 4000ppm 群の 3/50 例に発生し、Peto 検定（有病率法）で有意な増加傾向が示された。

#### <その他>

血管腫の全臓器での発生が Peto 検定（有病率法、有病率法＋死亡率法）で有意な増加傾向、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。これは、肝臓での血管腫発生の増加が反映された結果であった。

組織球性肉腫の全臓器での発生が Cochran-Armitage 検定で減少傾向、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な減少が示された。

### 非腫瘍性病変

#### <鼻腔>

嗅上皮のエオジン好性変化が全投与群で有意な減少となった。

#### <肺>

終末細気管支上皮の過形成が投与群に発生し、4000ppm 群で統計学的に有意な増加となった。また、肺胞管上皮の過形成、細気管支－肺胞上皮増生及び肺出血が投与群に多くみられた。終末細気管支上皮の過形成は終末細気管支上皮の細胞異型を伴った増生であり、終末細気管支から肺胞まで連続した病変も認められた。

#### <歯>

異形成が 2000ppm 以上の群で有意な減少となった。

#### <胃>

腺胃の過形成の程度が 4000ppm 群で有意な減弱となった。

### ＜肝臓＞

小葉周辺性の空胞変性が 4000ppm 群で有意な増加となった。

肉芽形成が全投与群で有意な減少となった。

なお、肝臓に認められた各種の小増殖巣はいずれも対照群と投与群の間に差を認めなかった。

### ＜腎臓＞

近位尿細管の空胞化が全投与群で有意な減少となった。

リンパ球浸潤が全投与群で有意な減少となった。

好塩基性変化が 2000ppm 以上の群で有意な減少となった。

### ＜副腎＞

皮質の巣状脂肪変性が全投与群で有意な減少となった。

### ＜精巣＞

精巣の萎縮の程度が 2000ppm 以上の群で有意な増強、鉍質沈着が全投与群で有意な増加となった。

### ＜脳＞

鉍質沈着が 4000ppm 群で有意な減少となった。

その他、肝臓の脂肪化と小葉中心性変性が 2000ppm 群でそれぞれ有意な増加となったが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

## －雌の主な病変－

### 腫瘍性病変

#### ＜肺＞

細気管支-肺胞上皮腺腫が対照群の 2/50 例、1000ppm 群の 4/50 例、2000ppm 群の 5/49 例及び 4000ppm 群の 12/50 例に発生し、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向が、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。

細気管支-肺胞上皮癌が対照群の 3/50 例、1000ppm 群の 1/50 例、2000ppm 群の 8/49 例及び 4000ppm 群の 20/50 例に発生し、Peto 検定（死亡率法、有病率法、死亡率法＋有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向を、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。また、腺扁平上皮癌が 4000ppm に 1 例発生した。

細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌、腺扁平上皮癌を合わせた発生でも Peto 検定（死亡率法、有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向を示し、Fisher 検定で 2000ppm 以上の群に対照群と比較して有意な増加が示された。

細気管支-肺胞上皮癌の他の臓器への転移は対照群 2 例（リンパ節、肝臓、腎臓、卵巣、



脳、眼球、ハーダー腺に転移 1 例、リンパ節、肝臓に転移 1 例)、2000ppm 群 1 例(胸膜、縦隔に転移)、4000ppm 群 1 例(卵巣に転移)であった。

#### <肝臓>

肝細胞腺腫が対照群の 1/50 例、1000ppm 群の 7/49 例、2000ppm 群の 4/49 例及び 4000ppm 群の 16/50 例に発生し、Peto 検定(有病率法)と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が、Fisher 検定では 1000ppm 群と 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。

肝細胞癌が対照群の 1/50 例、1000ppm 群の 1/49 例、2000ppm 群の 5/49 例及び 4000ppm 群の 19/50 例に発生し、Peto 検定(死亡率法、有病率法、死亡率法+有病率法)と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生では Peto 検定(死亡率法)と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が、Fisher 検定では全投与群群に対照群と比較して有意な増加が示された。

肝細胞癌の他の臓器への転移は 1000ppm 群 1 例、2000ppm 群 5 例、4000ppm 群 5 例であり、転移先は骨髄に転移した 2000ppm 群の 1 例を除いた全てが肺であった。

血管腫が対照群の 2/50 例、1000ppm 群の 2/49 例、4000ppm 群の 5/50 例に発生し、血管腫のみでは統計学的に有意な変化とはならなかったが、血管肉腫が対照群と 4000ppm 群でそれぞれ 1/50 例、2/50 例が発生しており、血管腫と血管肉腫を合わせた発生では Peto 検定(死亡率法、有病率法+死亡率法)で有意な増加傾向が示された。

#### <皮下>

血管腫が対照群の 2/50 例、血管肉腫が対照群と 1000ppm 群にそれぞれ 1/50 例ずつ発生し、血管腫と血管肉腫を合わせた発生では Cochran-Armitage 検定で有意な減少傾向が示された。

#### <リンパ節>

悪性リンパ腫の発生が対照群の 23/50 例、1000ppm 群の 31/50 例、2000ppm 群の 19/49 例及び 4000ppm 群での 15/50 例に発生し、Cochran-Armitage 検定で有意な減少傾向が示された。なお、悪性リンパ腫の全臓器での発生は対照群の 25/50 例、1000ppm 群の 33/50 例、2000ppm 群の 21/49 例及び 4000ppm 群の 17/50 例であり、Cochran-Armitage 検定で有意な減少傾向が示された。これはリンパ節での悪性リンパ腫の発生減少が反映された結果であった。

## 非腫瘍性病変

### <鼻腔>

呼吸上皮のエオジン好性変化が全投与群で、また嗅上皮のエオジン好性変化と嗅上皮の呼吸上皮化生が 2000ppm 以上の群で有意な減少となった。

### <肺>

終末細気管支上皮の過形成が投与群に発生し、4000ppm 群で有意な増加となった。また、肺胞管上皮の過形成と細気管支-肺胞上皮増生が投与群に多くみられた。

### <歯>

異形成が 4000ppm 群で有意な増加となった。

### <肝臓>

小葉周辺性の空胞変性が 4000ppm 群で有意な増加となった。肉芽形成は 4000ppm 群で有意な減少となった。小葉周辺性空胞変性は、H&E 染色標本では細胞質内の透明な空胞ないし淡青色均質物質が貯留した小胞として観察され、PAS 染色に陽性を示し、ジアスターゼでは消化されなかった。肝臓に認められた各種の小増殖巣はいずれも対照群と投与群の間に差を認めなかった。

### <卵巣>

卵巣の萎縮の程度が 4000ppm 群で有意な増強となった。

### <子宮>

嚢胞状内膜増生が 4000ppm 群で有意な減少となった。

### <脳>

鉍質沈着が 4000ppm 群で有意な減少となった。

その他、腺胃の過形成が 1000ppm 群と 4000ppm 群で、腎臓のリンパ球浸潤が全投与群で、腎臓の貯留性嚢胞が 1000ppm 群でそれぞれ有意な増加となったが、これらは投与濃度に対応した変化ではなかった。

## III-3-4 死因

病理学的にみた死亡/瀕死例の死因を TABLE 12 に示した。

雄の投与群では肺腫瘍や肝臓腫瘍、水腎症が死因となった例が対照群に比較して多くみられた。また、雌の 2000ppm と 4000ppm 群は肺腫瘍や肝臓腫瘍が死因となった例が対照群に比較して多くみられた。

#### IV 考察及びまとめ

##### IV-1 生死状況、体重、摂餌量

最終計測週(104 週)における生存率は雄：対照群 76%、1000ppm 群 70%、2000ppm 群 52%、4000ppm 群 40%、雌：対照群 52%、1000ppm 群 52%、2000ppm 群 34%、4000ppm 群 42%であり、雌雄とも 2000ppm 以上の群で生存率の低下がみられた。投与群での生存率の低下は病理学的検査の結果からジクロロメタンの投与による肺や肝臓の腫瘍発生によるものと考えられた。

体重は雌雄とも全ての投与群に抑制が示され、最終計測週では対照群に対して雄：1000ppm 群 90%、2000ppm 群 88%、4000ppm 群 70%、雌：1000ppm 群 96%、2000ppm 群 92%、4000ppm 群 83%であった。

摂餌量は雌雄とも 4000ppm 群で対照群より 10%前後の高値を示す週が多くみられた。

##### IV-2 血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査

血液学的検査で雄の全投与群にヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の増加が示された。ラットの雌雄にジクロロメタンを投与すると血中の一酸化炭素ヘモグロビンが増加することが報告されており（文献 6、7）、本試験で観察されたヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の増加も一酸化炭素ヘモグロビンの生成を示唆する変化と考えられた。

##### IV-3 腫瘍性病変

###### IV-3-1 雄の腫瘍性病変

###### <肺>

細気管支-肺胞上皮腺腫が対照群の 14%(7/50 例)、1000ppm 群の 6%(3/50 例)、2000ppm 群の 8%(4/50 例)及び 4000ppm 群の 28%(14/50 例)に、また、細気管支-肺胞上皮癌が対照群の 2%(1/50 例)、1000ppm 群の 28%(14/50 例)、2000ppm 群の 44%(22/50 例)及び 4000ppm 群の 78%(39/50 例)に発生した。両腫瘍とも Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示され、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。細気管支-肺胞上皮癌の発生は 1000ppm 以上の群で当センターのヒストリカルコントロールデータ（平均 10.6%、2-22%）の範囲を超えており、細気管支-肺胞上皮腺腫の発生も 4000ppm 群で当センターのヒストリカルコントロールデータ（平均 7.5%、4-18%）の範囲を超えていた。これらのことから、細気管支-肺胞上皮腺腫及び細気管支-肺胞上皮癌の発生増加は被験物質の投与による影響であり、ジクロロメタンの雄マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠（clear evidence）と考えられた。

また、投与群で認めた終末細気管支上皮の過形成は細気管支-肺胞上皮腺腫や細気管支-肺胞上皮癌の前腫瘍性変化と考えられた。

なお、本試験の予備試験として実施した 13 週間の吸入試験で細気管支-肺胞上皮腺腫が

8000ppm 群に 1 例認められた (文献 3)。

#### <肝臓>

肝細胞腺腫が対照群の 20%(10/50 例)、1000ppm 群の 26%(13/50 例)、2000ppm 群の 28%(14/50 例)及び 4000ppm 群の 30%(15/50 例)に発生しており、各投与群とも肝細胞腺腫の発生は当センターのヒストリカルコントロールデータ (平均 16.9%、4-30%) の範囲内ではあるものの、Peto 検定で有意な増加傾向が示された。

肝細胞癌が対照群の 20%(10/50 例)、1000ppm 群の 18%(9/50 例)、2000ppm 群の 28%(14/50 例)及び 4000ppm 群の 40%(20/50 例)に発生し、Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示され、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。4000ppm 群の肝細胞癌の発生は当センターのヒストリカルコントロールデータ (平均 22.4%、範囲 2-38%) の範囲を超えていた。したがって、肝細胞癌の発生増加は被験物質の投与による影響であり、ジクロロメタンの雄マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠 (clear evidence) と考えられた。なお、肝芽腫が 4000ppm 群に 1 例発生しており、肝細胞腺腫と肝細胞癌及び肝芽腫を合わせた発生でも Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向が示され、Fisher 検定で 2000ppm 以上の群に対照群と比較して有意な増加が示された。

血管腫が 1000ppm 群の 8%(4/50 例)、2000ppm 群の 6%(3/50 例)及び 4000ppm 群の 10%(5/50 例)に発生し、Peto 検定で有意な増加傾向が示され、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。4000ppm 群の血管腫の発生は当センターのヒストリカルコントロールデータ (平均 0.7%、範囲 0-10%) の上限に相当する値であり、明確ではないものの被験物質による血管腫の発生増加を否定できなかった。また、対照群と 2000ppm、4000ppm 群に 2%(1/50 例)ずつ発生した血管肉腫を合わせた発生でも Peto 検定で有意な増加傾向を示した。なお、血管肉腫の当センターのヒストリカルコントロールデータは平均 3.9%、0-12%の範囲となっている。

#### <副腎>

褐色細胞腫が対照群の 2%(1/50 例)、2000ppm 群の 2%(1/50 例)及び 4000ppm 群の 6%(3/50 例)に発生し、Peto 検定で有意な増加傾向が示された。4000ppm 群の褐色細胞腫の発生は当センターのヒストリカルコントロールデータ (平均 0.2%、範囲 0-2%) の上限に相当する値であり、明確ではないものの被験物質による褐色細胞腫の発生増加を否定できなかった。

### IV-3-2 雌の腫瘍性病変

#### <肺>

細気管支-肺胞上皮腺腫が対照群の 4%(2/50 例)、1000ppm 群の 8%(4/50 例)、2000ppm 群の 10%(5/49 例)及び 4000ppm 群の 24%(12/50 例)に、また、細気管支-肺胞上皮癌が対照群の 6%(3/50 例)、1000ppm 群の 2%(1/50 例)、2000ppm 群の 16%(8/49 例)及び 4000ppm

群の 40%(20/50 例)に発生した。両腫瘍とも Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向を示し、Fisher 検定で 4000ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。2000ppm 群の細気管支-肺胞上皮癌の発生と 4000ppm 群での細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌の発生は、当センターにおける細気管支-肺胞上皮腺腫のヒストリカルコントロールデータ（平均 3.9%、範囲 0-10%）と細気管支-肺胞上皮癌のヒストリカルコントロールデータ（平均 2.9%、範囲 0-8%）の範囲をそれぞれ超えていた。したがって細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌の発生増加は被験物質の投与による影響であり、ジクロロメタンの雌マウスに対するがん原性の明らかな証拠（clear evidence）と考えられた。なお、腺扁平上皮癌が 4000ppm に 1 例発生しており、細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌及び腺扁平上皮癌を合わせた発生でも Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向を示し、Fisher 検定で 2000ppm 以上の群に対照群と比較して有意な増加が示された。

また、雄の場合と同様に、投与群で認めた終末細気管支上皮の過形成は細気管支-肺胞上皮腺腫や細気管支-肺胞上皮癌の前腫瘍性変化と考えられた。

#### <肝臓>

肝細胞腺腫が対照群の 2%(1/50 例)、1000ppm 群の 14%(7/49 例)、2000ppm 群の 8%(4/49 例)及び 4000ppm 群の 32%(16/50 例)に発生し、また、肝細胞癌が対照群の 2%(1/50 例)、1000ppm 群の 2%(1/49 例)、2000ppm 群の 10%(5/49 例)及び 4000ppm 群の 38%(19/50 例)に発生した。両腫瘍とも Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定では肝細胞腺腫が 1000ppm 群と 4000ppm 群で、肝細胞癌が 4000ppm 群で対照群と比較して増加が示された。また、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生では Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で有意な増加傾向を示し、Fisher 検定では全投与群に対照群と比較して有意な増加が示された。4000ppm 群での肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生は、当センターにおける肝細胞腺腫のヒストリカルコントロールデータ（平均 4.9%、範囲 2-10%）と肝細胞癌のヒストリカルコントロールデータ（平均 2.2%、範囲 0-8%）の範囲をそれぞれ超えていた。したがって、肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加は被験物質の投与による影響であり、ジクロロメタンの雌マウスに対するがん原性の明らかな証拠（clear evidence）と考えられた。

血管腫が対照群の 4%(2/50 例)、1000ppm 群の 4%(2/49 例)、4000ppm 群の 10%(5/50 例)に発生した。本試験の血管腫の発生は対照群でも当センターの血管腫のヒストリカルコントロールデータ（平均 0.2%、範囲 0-2%）の上限値をわずかに超えているが、4000ppm 群の発生はヒストリカルコントロールデータの上限値の 5 倍であることから、雌の肝臓でのこれら血管腫の発生増加にはジクロロメタンの投与による影響の可能性を否定できなかった。また、血管肉腫が対照群に 2%(1/50 例)と 4000ppm 群に 4%(2/50 例)発生しているが、血管肉腫の発生は当センターのヒストリカルコントロールデータ（平均 2.4%、0-8%）の範囲内であった。

#### <皮下>

血管腫が対照群の 4%(2/50 例)、血管肉腫が対照群と 1000ppm 群にそれぞれ 2%(1/50 例)ずつ発生し、血管腫と血管肉腫を合わせた発生では Cochran-Armitage 検定で有意な減少傾向が示された。当センターのヒストリカルコントロールデータでは血管腫が(平均 0.4%、範囲 0-4%)、血管肉腫が(平均 0.5%、範囲 0-2%)となっており、Cochran-Armitage 検定で減少傾向が示されたのは両腫瘍とも対照群での発生がヒストリカルコントロールデータの上限值であった為と考えた。

#### <リンパ節>

悪性リンパ腫の発生が対照群の 46%(23/50 例)、1000ppm 群の 62%(31/50 例)、2000ppm 群の 38%(19/49 例)及び 4000ppm 群の 30%(15/50 例)に発生し、Cochran-Armitage 検定で減少傾向が示された。しかし、当センターのヒストリカルコントロールデータでの悪性リンパ腫の発生率は平均 22.0%、範囲 12-40%であることから、本試験では対照群と 1000ppm 群での悪性リンパ腫の発生が通常よりも高かったものと考えた。

以上のように、雌雄とも細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌、及び肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生が増加した。これらの腫瘍の増加は被験物質の投与による影響であり、ジクロロメタンのマウスの雌雄に対するがん原性を示す明らかな証拠 (clear evidence) と考えられた。このほか、雄では肝臓に血管腫の発生が増加と副腎に褐色細胞腫の発生増加が示され、雌では肝臓では血管腫単独での増加は明確に示されなかったが、血管腫に血管肉腫を合わせた発生で増加が示された。これらの腫瘍の発生増加についても被験物質の投与の影響を否定できなかった。また、細気管支-肺胞上皮腺腫や細気管支-肺胞上皮癌の前腫瘍性変化と考えられる終末細気管支上皮の過形成の増加が雌雄とも 4000ppm 群で示された。

#### IV-4 非腫瘍性病変

雌雄とも 4000ppm 群で肝臓に小葉周辺性の空胞変性がみられ、この所見はジクロロメタンの投与による直接的な影響であると考えられた。そのほか、雄の投与群には精巣の鉍質沈着と萎縮の増加、腺胃の過形成、脳の鉍質沈着、歯の異形成、腎臓の好塩基性変化、近位尿細管の空胞変性及びリンパ球浸潤、鼻腔嗅上皮の好酸性変化、肝臓の肉芽形成、ならびに副腎皮質に巣状脂肪変性の減少、雌の投与群では歯の異形成と卵巢萎縮の増加、肝臓の肉芽形成、子宮の囊胞状内膜増生及び脳の鉍質沈着の減少がみられた。これらの変化のうち、雄の投与群にみられた精巣の萎縮の増加と雌の投与群にみられた卵巢萎縮の増加はジクロロメタンの投与で誘発された腫瘍の増殖による全身状態の悪化に伴って生じた二次的な変化である可能性が高いと考えた。これ以外の変化(多くは投与群での自然発生性病変の減少)の意味については不明である。

#### IV-5 他の報告との比較

マウスを用いた長期毒性・発がん性試験の主な報告は、経気道投与によるものとして米国 NTP (1986、文献 8)の報告が、経口投与によるものとしては Serota,D.G.*et al* (1986、文献 9) の報告があげられる。経気道投与で実施された NTP の試験では雌雄ともに肺と肝臓に腫瘍発生が認められ、当センターで行った試験結果と一致していた。経口投与で実施した Serota,D.G.*et al*の試験ではジクロロメタンの投与に関係した明らかな腫瘍発生は認められなかった。以下に各報告の概要を示した。

##### 経気道投与による試験

NTP ではジクロロメタンを 2000ppm、4000ppm の濃度で 6 時間/日、5 日/週、102 週間、B6C3F<sub>1</sub> マウスの雌雄に吸入させた。その結果、腫瘍性病変では雌雄ともジクロロメタンの投与の影響として肺に細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌、肝臓に肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加が報告されている。また、雄に血管系腫瘍の発生増加もみられ、血管腫と血管肉腫をあわせた発生は対照群 2/50 例、2000ppm 群 2/50 例、4000ppm 群 6/50 例 (6 例中 5 例は肝臓の血管肉腫) で統計学的に増加傾向が示されたが、NTP は血管肉腫の発生増加をジクロロメタンの投与の明らかな影響とはしなかった。非腫瘍性病変では精巣 (雄) と卵巣及び子宮 (雌) の萎縮が投与群のマウスに見られたが、NTP はこれらの変化をジクロロメタンの投与による肺腫瘍及び肝腫瘍の発生に伴う二次的な変化とした。

##### 経口投与による試験

Serota,D.G.*et al*はジクロロメタン 60 mg/kg bw/day、125 mg/kg bw/day、185 mg/kg bw/day、250 mg/kg bw/day を飲み水に混じて 104 週間、B6C3F<sub>1</sub> マウスの雌雄に経口投与した。その結果、雄 250 mg/kg 群だけに肝臓腫瘍の発生増加がみられ、この群の肝細胞癌の発生は対照群よりも有意に高かった。しかし、この試験でみられた雄の肝細胞癌の発生率または肝細胞癌と肝細胞腺腫を合わせた発生率は試験を実施した施設のヒストリカルコントロールデータの範囲内であり、投与用量との相関も示されなかった。この試験では、雌雄とも 250 mg/kg 群の肝臓に投与に関連した毒性病変として脂肪変性 (オイルレッド O 染色陽性) の増加がみられた。B6C3F<sub>1</sub> を用いたこの試験から、ジクロロメタンには投与に関係した発がん性は認められず、毒性学的、病理組織学的に非腫瘍性病変についての Non-observable-effect level は雌雄とも 185 mg/kg bw/day という結論がだされた。

## V 結論

Crj:BDF<sub>1</sub> マウスを用いてジクロロメタンの2年間(104週間)にわたる吸入によるがん原性試験をおこなった結果より以下の結論を得た。

雌雄のマウスに肺の細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌、ならびに肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加が認められ、この結果はジクロロメタンのマウスの雌雄に対するがん原性を示唆する明らかな証拠 (clear evidence) と考えられた。また、肝臓では雌雄のマウスに血管腫の発生増加、副腎では雄マウスに褐色細胞腫の発生増加もみられた。

また、肺の細気管支-肺胞上皮腺腫や細気管支-肺胞上皮癌の前腫瘍性変化と考えられる変化として終末細気管支上皮の過形成の増加が雌雄とも 4000ppm 群で示された。

非腫瘍性病変としては雄雌の 4000ppm 群で肝臓に小葉周辺性の空胞変性の発生増加がみられた。



VI 文献

1. Heller, S. R. and Milne, G.W.A. (1978)  
EPA/NIH Mass Spectral Data Base Vol.1,pp33.  
U.S.Government Printing Office, Washington.
2. 和光純薬工業からの提供資料
3. 日本バイオアッセイ研究センター(2000)  
ジクロロメタンのラットを用いた吸入による 13 週間毒性試験報告書
4. 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.
5. Peto,R.,Pike,M.C.,Day,N.E.,Gary,R.G.,Lee,P.N.,Parish,S.,Peto,J.,Richrds,S.and  
Wahrendorf,J.(1980)  
Guidelines for simple,sensitive significance tests for carcinogenic effects in  
long-term animal experiments.  
In:Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens:A Critical  
Appraisal,  
IARC Monographs,Suppl.2,pp.311-426,International Agency for Reserch on  
Cancer,Lyon.
6. Burek J.D., Nitschke K.D., Bell T.J.,et al.(1984)  
Methylene chloride:a two-year inhalation toxicity and oncogenicity study  
in rats and hamsters.  
*Fundam. Appl. Toxicol.*, 4, 30-47
7. Nitschke K.D.,Burek J.D., and Bell T.J.,et al.(1988)  
Methylene Chloride:a two-year inhalation toxicity and oncogenicity study  
in rats.  
*Fundam. Appl. Toxicol.*, 11, 48-59

8. NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (1986)  
Toxicology and carcinogenesis studies of dichloromethane.  
Technical report series No.306  
U.S. Department of health and human services.
9. Serota D.G.,Thakur A.K.,and Ulland B.M.(1986)  
A two-year drinking-water study of dichloromethane in rodents. I .Mice  
*Fd Chem. Toxic*, 24, 959-963