

ジクロロメタンのマウスを用いた  
吸入による 13 週間毒性試験報告書

試験番号 : 0258

CAS No. 75 - 09 - 2

平成 12 年 3 月 22 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 13 週間毒性試験報告書

試験番号 : 0258

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

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	6
II-3-2	体重測定	6
II-3-3	摂餌量測定	6
II-3-4	血液学的検査	6
II-3-5	血液生化学的検査	7
II-3-6	尿検査	7
II-3-7	病理学的検査	7
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	7
II-4-2	母数の取り扱い	8
II-4-3	統計方法	8
II-5	試資料の保管	8
III	試験成績	
III-1	動物の状態観察	
III-1-1	生死状況	9
III-1-2	一般状態	9
III-1-3	体重	9
III-1-4	摂餌量	10
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	10
III-2-2	血液生化学的検査	10
III-2-3	尿検査	11
III-3	病理学的検査	
III-3-1	剖検	11
III-3-2	臓器重量	11
III-3-3	病理組織学的検査	11
IV	考察及びまとめ	12
V	文献	13

## TABLES

- TABLE 1 EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS IN THE  
13-WEEK INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE
- TABLE 2 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF  
MALE MICE IN THE 13-WEEK INHALATION STUDY OF  
DICHLOROMETHANE
- TABLE 3 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF  
FEMALE MICE IN THE 13-WEEK INHALATION STUDY OF  
DICHLOROMETHANE
- TABLE 4 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE MICE IN THE  
13-WEEK INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE
- TABLE 5 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE MICE IN THE  
13-WEEK INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANETHANE

## FIGURES

FIGURE 1 DICHLOROMETANE VAPOR GENERATION SYSTEM AND  
INHALATION SYSTEM

FIGURE 2 BODY WEIGHT CHANGES OF MALE MICE IN THE 13-WEEK  
INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE 3 BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 13-WEEK  
INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE 4 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE MICE IN THE 13-WEEK  
INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

FIGURE 5 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE MICE IN THE  
13-WEEK INHALATION STUDY OF DICHLOROMETHANE

## APPENDIXES

- APPENDIX A 1 CLINICAL OBSERVATION : SUMMARY, MOUSE : MALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX B 1 BODY WEIGHT CHANGES : SUMMARY, MOUSE : MALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX B 2 BODY WEIGHT CHANGES : SUMMARY, MOUSE : FEMALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX C 1 FOOD CONSUMPTION CHANGES : SUMMARY, MOUSE : MALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX C 2 FOOD CONSUMPTION CHANGES : SUMMARY, MOUSE :  
FEMALE ( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX D 1 HEMATOLOGY : SUMMARY, MOUSE : MALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX D 2 HEMATOLOGY : SUMMARY, MOUSE : FEMALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX E 1 BIOCHEMISTRY : SUMMARY, MOUSE : MALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX E 2 BIOCHEMISTRY : SUMMARY, MOUSE : FEMALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX F 1 URINALYSIS : SUMMARY, MOUSE : MALE ( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX F 2 URINALYSIS : SUMMARY, MOUSE : FEMALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX G 1 GROSS FINDINGS : SUMMARY, MOUSE : MALE :  
SACRIFICED ANIMALS ( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX G 2 GROSS FINDINGS : SUMMARY, MOUSE : FEMALE :  
DEAD AND MORIBUND ( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX G 3 GROSS FINDINGS : SUMMARY, MOUSE : FEMALE :  
SACRIFICED ANIMALS ( 13-WEEK STUDY )



## APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX H 1 ORGAN WEIGHT, ABSOLUTE : SUMMARY, MOUSE : MALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX H 2 ORGAN WEIGHT, ABSOLUTE : SUMMARY, MOUSE : FEMALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX I 1 ORGAN WEIGHT, RELATIVE : SUMMARY, MOUSE : MALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX I 2 ORGAN WEIGHT, RELATIVE : SUMMARY, MOUSE : FEMALE  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX J 1 HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS :  
SUMMARY, MOUSE : MALE : SACRIFICED ANIMALS  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX J 2 HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS :  
SUMMARY, MOUSE : FEMALE : DEAD AND MORIBUND  
ANIMALS ( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX J 3 HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS :  
SUMMARY, MOUSE : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS  
( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX K 1 HISTOLOGICAL FINDINGS : NEOPLASTIC LESIONS :  
SUMMARY, MOUSE : MALE : ALL ANIMALS ( 13-WEEK STUDY )
- APPENDIX L 1 IDENTITY OF DICHLOROMETHANE IN THE 13-WEEK  
INHALATION STUDY
- APPENDIX L 2 STABILITY OF DICHLOROMETHANE IN THE 13-WEEK  
INHALATION STUDY



## APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX M 1 CONCENTRATION OF DICHLOROMETHANE IN THE  
INHALATION CHAMBER OF THE 13-WEEK INHALATION  
STUDY

APPENDIX M 2 ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF INHALATION CHAMBER  
IN THE 13-WEEK INHALATION STUDY OF  
DICHLOROMETHANE

## 要約

ジクロロメタンの Crj:BDF<sub>1</sub> マウスを用いた吸入による 2 年間 (104 週) のがん原性試験を実施するのに先だって、その投与濃度を設定する目的で 13 週間の予備試験を実施した。

試験は被験物質投与群 5 群、対照群 1 群の 6 群構成で、各群雌雄各 10 匹の動物を用いて行った。投与濃度は雌雄共通の 8000ppm、4000ppm、2000ppm、1000ppm、500ppm とした。投与はジクロロメタンを含む空気を所定の濃度で 1 日 6 時間、1 週 5 日間、13 週間の全身暴露で行った。観察・検査項目は、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とした。

その結果、8000ppm 群の雌 1 例が試験途中に死亡し、4000ppm 以下の群は全例が生存した。8000ppm 群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、血液学的検査では雄に赤血球数の減少と血小板数の増加、雌に赤血球数、ヘマトクリット値の減少と平均赤血球容積 (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) の増加を、血液生化学的検査では雄に総蛋白、尿素窒素の低値、雌に総蛋白、アルブミン、尿素窒素の低値を、病理組織学的検査で雌雄とも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。

なお、8000ppm 群では雌雄ともに神経症状が観察され、雌 1 例の死亡も神経症状によるものと考えられた。

4000ppm 群では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、摂餌量に対照群と比較して顕著な差を認めなかったことから、これらの変化は動物の生存に影響を与えるような重篤な毒性徴候を示唆するものではないと考えた。

2000ppm 以下の投与群では、2000ppm 群の雌雄に体重比肝重量の増加が被験物質の投与の影響として認められただけであった。

以上の結果からがん原性試験の濃度設定は 4000ppm を最高濃度として以下、4000ppm、2000ppm、1000ppm、0ppm (公比 2) とした。

## I 試験材料

## I-1 被験物質の性状等

## I-1-1 名称と別名

名 称 : ジクロロメタン(Dichloromethane)

別 名 : 二塩化メチレン

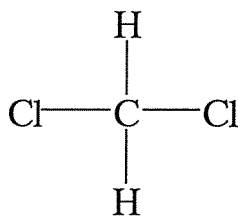
塩化メチレン

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℃

凝固点 : -96.8℃

比 重 : 1.3255(20℃)

蒸気圧 : 440mmHg(25℃)

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 5259、APR 5260

製 造 元：和光純薬工業株式会社

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も文献値（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 J1 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、それぞれの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 J2 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 75 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、それぞれ体重値の中央値に近い雌雄各 60 匹(群構成時体重範囲、雄:21.0~24.8g、雌:16.8~19.9g)を選別して試験に供した。

なお、Crj:BDF<sub>1</sub>マウスを選択した理由は、がん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせたことによる。

## 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、13 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 63 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

雌雄ともに最高濃度を 8000ppm に設定し、それ以下 4000ppm、2000ppm、1000ppm、500ppm（公比 2）とした。

投与濃度は 2 週間投与試験の結果に基づき設定した。すなわち、2 週間投与試験（文献 4）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 16000ppm、8000ppm、4000ppm、2000ppm、1000ppm とし、各群 1 日 6 時間、1 週 5 日間、2 週間、全身暴露して行った。

その結果、16000ppm 群は雄の半数と雌の全例が死亡したが、8000ppm 以下の群については死亡はなかった。8000ppm 群では雌雄ともに試験開始当初に体重の増加抑制と摂餌量の低値を認めたが、試験期間後半では対照群との差を認めなかった。その他、一般状態、血液学的検査、病理学的検査に著変を認めなかった。4000ppm 以下の群では体重、摂餌量、一般状態、血液学的検査、病理学的検査に対照群と差を認めなかった。

#### 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(25℃)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（16℃）に冷却、再加熱（25℃）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 M1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、500ppm 群:501.9±1.3ppm、1000ppm 群:1007.8±3.7ppm、2000ppm 群:2000.9±8.8ppm、4000ppm 群:4002.6±10.0ppm、8000ppm 群:8001.3±22.0ppmであった。

#### II-2 動物管理

##### II-2-1 各群の使用動物数

投与群5群及び対照群1群の計6群を設け、各群雌雄各10匹の動物を用いた。

##### 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3）。

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パ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室ごとに収容し、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（605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吸入チャンバー室（604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±2℃、湿度55±15%、換気回数12±1回/時、圧力0～-15mmAqに、吸入チャンバーが設置されている飼育室の飼育環境は温度23±2℃、湿度55±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 M2 に示した。

検疫期間中は 1 ケージ当り 1 匹の単飼(ステンレス製 2 連型網ケージ、112W×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 6 連型網ケージ、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 5 連網ケージ、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)千葉工場(千葉県千葉市美浜区新港 8-2)の CRF-1 固型飼料(3Mrad=30KGy- $\gamma$ 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の範囲内であることを確認した。

## 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

暴露休止中に動物の一般状態観察を毎週 1 回、動物の生死確認を毎日 2 回行った。

### II-3-2 体重測定

全動物の体重を、週 1 回、測定した。

### II-3-3 摂餌量測定

週 1 回、摂餌量を測定した。

### 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、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。

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 L1 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 L1 に示した。

## II-3-6 尿検査

投与最終週に新鮮尿を採取し、尿検査を行った。

検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX L1 に示した。

## II-3-7 病理学的検査

### 1 剖検

解剖時に全動物について肉眼的に観察を行った。

### 2 臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について TABLE 1 に示した臓器の湿重量(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、一部症例には PAS 染色を行い、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、小数点以下 4 位までを計測し、小数点以下 2 位を四捨五入して小数点以下 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、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 L2 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母数から除いた。

尿検査は、投与最終週に行い、検査数を母数とした。

剖検と病理組織学的検査は、死亡・瀕死による試験途中での解剖動物数と定期解剖動物数を母数とした。

## II-4-3 統計方法

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。なお、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。

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。なお  $\chi^2$  検定は対照群と各投与群間との検定であり、最終検定では 5% 及び 1% で両側検定を行った。

## 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従って、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 動物の状態観察

##### Ⅲ－１－１ 生死状況

8000ppm 群で 11 週 7 日に雌 1 例が死亡した以外は全例が生存した。

##### Ⅲ－１－２ 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A1 に示した。

一般状態の観察では、8000ppm 群の雄 1 例に試験 5 週、6 週、13 週に痲皮を認めただけであり、投与群に特徴的な所見はなかった。

なお、暴露中の動物の状態はチャンバーの外から次のような行動を認めている。8000ppm 群は雌雄とも暴露開始後 15 分頃から極端な興奮状態がしばらく持続し、暴露開始後 30 分頃には全動物が横臥状態になった。また、動物が極端な興奮状態にある時は、ケージの側壁、床及び天井面にぶつかりながら狂った様に飛び跳ねる例も認めるなど 8000ppm 群の雌雄に神経症状が認められた。4000ppm 群でもケージ内で頻繁に立ち上がるなど対照群と比べて幾分活発な動きを認めたが、2000ppm 以下の群の動物には暴露中の行動に異常を認めなかった。また、試験途中に死亡した 8000ppm 群の雌 1 例はケージ壁面と餌箱の間隙に入り込んだ状態で死亡していた。

##### Ⅲ－１－３ 体重

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

雄の 8000ppm 群は投与 1 週の体重値が対照群の 94%と低値を示したが、投与 2 週以降は対照群との差がなくなり最終計測日の値は対照群の 97%であった。4000ppm 以下の群では、2000ppm 群の投与 7 週、1000ppm 群の投与 7 週と 8 週に一時的に対照群よりも低値となった以外は各投与群とも対照群と差を認めなかった。

雌の 8000ppm 群の体重は投与期間を通じて、対照群の 89%～95%で推移し、最終計測日の値は対照群の 90%であった。4000ppm 以下の投与群には対照群と差を認めなかった。

### Ⅲ－１－４ 摂餌量

摂餌量(1日1匹当り)をTABLE 4, 5, FIGURE 4, 5 及び APPENDIX C1, C2 に示した。

雄は 8000ppm 群の投与 1 週と 2000ppm 群の投与 7 週の値に低値を認めたが、これ以外は対照群と差を認めなかった。

雌は 8000ppm 群の投与 1 週と 7 週、4000ppm 群の投与 7 週の値に低値を認めたが、これ以外は対照群と差を認めなかった。

### 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。

雄は 8000ppm 群に赤血球数の減少と血小板数の増加を認めた。また、全投与群で平均赤血球容積 (MCV) の増加、2000ppm 以上の群で平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) の増加を認めたが、投与濃度との対応は明瞭でなかった。

この他、500ppm から 4000ppm までの群にヘモグロビン濃度の高値、500ppm 群にヘマトクリット値の高値を認めた。

雌は 8000ppm 群に赤血球数及びヘマトクリット値の減少と MCV、MCH、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) の増加を認めた。MCV と MCH に関しては 2000ppm 以下の群でも高値を認めたが、投与濃度との対応はなかった。

#### 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。

雄は 4000ppm 以上の群で総蛋白と尿素窒素の低値を認めた。2000ppm 以上の群で A/G 比の増加を認めたが、投与濃度との対応はなかった。

その他、1000ppm から 4000ppm までの群に総コレステロールの低値、1000ppm 群 と 8000ppm 群にトリグリセライドの低値を認めた。

雌は 4000ppm 以上の群に総蛋白と尿素窒素の低値、8000ppm 群にアルブミンの低値を認めた。

その他、1000ppm と 500ppm 群に総コレステロールの低値を認めた。

### Ⅲ-2-3 尿検査

尿検査の結果を APPENDIX F1, F2 に示した。

雌の 4000ppm 群に pH の増加、8000ppm と 500ppm 群に蛋白の程度の減弱を認めたが、投与濃度との対応はなかった。

### Ⅲ-3 病理学的検査

#### Ⅲ-3-1 剖検

剖検所見を APPENDIX G1~G3 に示した。

〈死亡例〉死亡した 8000ppm 群の雌 1 例は胸郭に強い変形（陥凹）を認め、肺の色調が赤色を呈していた。

〈生存例〉雌雄とも被験物質の投与の影響と考えられる所見はなかった。

#### 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(実重量)、APPENDIX H1, H2(体重比)に示した。

雄は 8000ppm 群で肺と肝臓に実重量と体重比の高値を、脳に実重量の高値、腎臓に体重比の高値を認めた。4000ppm 群では肝臓に実重量と体重比の高値を、2000ppm 群では肝臓に体重比の高値を認めた。

雌は 8000ppm 群で腎臓と肝臓に実重量と体重比の高値を、肺に体重比の高値を、また脾臓に実重量と体重比の低値を認めた。4000ppm 群では肝臓に実重量と体重比の高値を、2000ppm 群では肝臓に体重比のみの高値を認めた。その他、4000ppm 群では副腎に実重量と体重比の低値、心臓に体重比のみの低値を認めた。

#### Ⅲ-3-3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を APPENDIX J1~J3、APPENDIX K1 に示した。

〈死亡例〉死亡した 8000ppm 群の雌 1 例の肺にはうっ血と出血を認めた。

〈生存例〉8000ppm 群の雄に肺の細気管支-肺胞上皮腺腫を 1 例認めた。8000ppm 群の雄と 2000ppm 以上の群の雌に肝臓の小葉周辺性の空胞変性を認めた。この肝臓の変化は H&E 染色では肝細胞の細胞質内に生じた空胞として認められ、PAS 染色に陽性、ジアスターゼによる消化には陰性を示した。なお雄の対照群に 9 例認めた腎臓の近位尿細管上皮の空胞化は、投与群では 500ppm 群に 2 例、1000ppm 群に 1 例を認めたただけであった。

#### IV 考察及びまとめ

本試験は Crj:BDF<sub>1</sub> マウス雌雄各群 10 匹を使用して被験物質投与群 5 群、対照群 1 群の 6 群構成で行った。投与はジクロロメタンを含む空気 (8000ppm、4000ppm、2000ppm、1000ppm、500ppm、0ppm) を 1 日 6 時間、1 週 5 日、13 週間吸入 (全身曝露) させた。

その結果、8000ppm 群では雄の全例が生存し、体重、摂餌量でも対照群と比較して顕著な差を認めなかった。同群の雌では 1 例が死亡し、最終計測週では対照群と比較して 10% の体重抑制を認めた。雌雄とも暴露中の行動観察では暴露開始後 15 分頃から極端な興奮状態を示す神経症状が 15 分程持続し、暴露開始後 30 分頃には興奮していた動物は全て横臥状態となった。雌の 1 例の死亡もこの神経症状によるものと考えられた。血液学的検査では雄に赤血球数の減少と血小板数の増加、雌に赤血球数、ヘマトクリット値の減少と平均赤血球容積 (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) の増加を、血液生化学的検査では雄に総蛋白、尿素窒素の低値、雌に総蛋白、アルブミン、尿素窒素の低値を、病理組織学的検査で雌雄とも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 群は雌雄とも血液生化学的検査で総蛋白と尿素窒素の低値が、臓器重量で肝重量の増加が、さらに雌では病理組織学的検査でも肝臓に軽度の小葉周辺性の空胞変性を認めた。一方、一般状態の観察、体重、及び摂餌量の各検査項目には対照群とほとんど差を認めなかった。

2000ppm 以下の投与群では、2000ppm 群の雌雄に体重比肝重量の増加が被験物質の投与の影響として認められただけであった。

これらの結果より、がん原性試験の最高暴露濃度は 8000ppm 付近では神経症状の発現で動物が死亡する可能性が高いと考え、4000ppm を最高濃度とし、以下 2000ppm、1000ppm、0ppm (公比 2) とした。

なお、被験物質の投与との関連は明らかでないが雄の 1 例に肺の細気管支-肺胞上皮腺腫の発生がみられた。

## V 文献

1. Heller, S. R. and Milne, G.W.A. (1978)  
EPA/NIH Mass Spectral Data Base Vol.1,pp53.  
U.S.Government Printing Office, Washington.
2. 和光純薬工業からの提供資料(1987).
3. 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.
4. 日本バイオアッセイ研究センター (2000)  
ジクロロメタンのマウスを用いた吸入による 2 週間毒性試験報告書