

塩化メチルのラット及びマウスを用いた
吸入によるがん原性予備試験報告書

試験番号

2 週 間 : ラット/0174 ; マウス/0175

1 3 週 間 : ラット/0191 ; マウス/0192

CAS No. 74 - 87 - 3

平成 5 年 8 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

塩化メチルのラット及びマウスを用いた
吸入によるがん原性予備試験報告書

試験番号

2 週 間 : ラット/0174 ; マウス/0175

13 週 間 : ラット/0191 ; マウス/0192

本 文

目 次	頁
要 旨	1
塩化メチルについて	3
I 試 験 材 料	
I - 1 被 験 物 質 の 使 用 ロ ッ ト 等	7
I - 2 被 験 物 質 の 同 一 性 ・ 安 定 性	7
I - 2 - 1 同 一 性	7
I - 2 - 2 安 定 性	7
I - 3 試 験 動 物	8
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	9
II - 1 - 2 投 与 濃 度	9
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	
(1) 数 値 の 取 扱 と 表 示	14
(2) 母 数 の 取 扱 と 表 示	14
(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 2週間試験

(1) 動物の状態観察	16
(2) 病理学的検査	16

Ⅲ-1-2 13週間試験

(1) 動物の状態検査	17
(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査	...	17
(3) 病理学的検査	18

Ⅲ-2 マウスを用いた試験

Ⅲ-2-1 2週間試験

(1) 動物の状態検査	20
(2) 病理学的検査	21

Ⅲ-2-2 13週間試験

(1) 動物の状態検査	22
(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査	...	23
(3) 病理学的検査	23

Ⅳ 考察及びまとめ

Ⅴ 文献

T A B L E S

- TABLE 1 EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS
IN THE INHALATION STUDIES OF METHYL CHLORIDE
- TABLE 2 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT
(TWO-WEEK STUDY)
- TABLE 3 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT
(TWO-WEEK STUDY)
- TABLE 4 FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT (TWO-WEEK STUDY)
- TABLE 5 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT (TWO-WEEK STUDY)
- TABLE 6 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT
(THIRTEEN-WEEK STUDY)
- TABLE 7 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT
(THIRTEEN-WEEK STUDY)
- TABLE 8 FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT (THIRTEEN-WEEK STUDY)
- TABLE 9 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT (THIRTEEN-WEEK STUDY)

T A B L E S (CONTINUED)

TABLE 10 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE
(TWO-WEEK STUDY)

TABLE 11 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE
(TWO-WEEK STUDY)

TABLE 12 FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE (TWO-WEEK STUDY)

TABLE 13 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE (TWO-WEEK STUDY)

TABLE 14 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE
(THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 15 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE
(THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 16 FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 17 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

F I G U R E S

FIGURE 1 METHYL CHLORIDE GAS GENERATION SYSTEM AND INHALATION SYSTEM

FIGURE 2 BODY WEIGHT CHANGES : RAT:MALE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 3 BODY WEIGHT CHANGES : RAT:FEMALE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 4 FOOD CONSUMPTION : RAT:MALE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 5 FOOD CONSUMPTION : RAT:FEMALE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 6 BODY WEIGHT CHANGES : MOUSE:MALE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 7 BODY WEIGHT CHANGES : MOUSE:FEMALE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 8 FOOD CONSUMPTION : MOUSE:MALE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 9 FOOD CONSUMPTION : MOUSE:FEMALE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

P H O T O G R A P H S

- PHOTOGRAPH 1 ADRENAL GLAND, NORMAL
TWO-WEEK STUDY, RAT, FEMALE, Control, ANIMAL NO. 0174-2001
(H. E. , X60)
- PHOTOGRAPH 2 ADRENAL GLAND, FATTY CHANGE
TWO-WEEK STUDY, RAT, FEMALE, 3000ppm, ANIMAL NO. 0174-2501
(H. E. , X60)
- PHOTOGRAPH 3 LIVER, SINGLE CELL NECROSIS:A
TWO-WEEK STUDY, MOUSE, MALE, 1500ppm, ANIMAL NO. 0175-1402
(H. E. , X150)
- PHOTOGRAPH 4 TESTIS, ATROPHY:A
THIRTEEN-WEEK STUDY, RAT, MALE, 3000ppm, ANIMAL NO. 0191-1501
(H. E. , X60)
- PHOTOGRAPH 5 KIDNEY, EOSINOPHILIC BODY:A
THIRTEEN-WEEK STUDY, RAT, MALE, Control, ANIMAL NO. 0191-1001
(H. E. , X300)
- PHOTOGRAPH 6 KIDNEY, DECREASED IN EOSINOPHILIC BODY
THIRTEEN-WEEK STUDY, RAT, MALE, 3000ppm, ANIMAL NO. 0191-1501
(H. E. , X300)
- PHOTOGRAPH 7 BRAIN, DEGENERATION OF GRANULAR CELL OF THE CEREBELLUM:A
THIRTEEN-WEEK STUDY, RAT, MALE, 3000ppm, ANIMAL NO. 0191-1504
(H. E. , X150)
- PHOTOGRAPH 8 LIVER, NECROSIS AND VACUOLIC CHANGE OF CENTRAL AREA
THIRTEEN-WEEK STUDY, MOUSE, MALE, 1500ppm, ANIMAL NO. 0192-1504
(H. E. , X60)

A P P E N D I X E S

- APPENDIX A 1-1 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX A 1-2 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX A 2-1 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX A 2-2 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX A 2-3 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX A 2-4 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX A 3-1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX A 3-2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX A 3-3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX A 3-4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX A 4-1 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 4-2 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 4-3 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

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

- APPENDIX A 5-1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 5-2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 5-3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 5-4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MRIBUND ANIMALS
- APPENDIX A 5-5 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 5-6 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX A 6-1 IDENTITY AND PURITY OF METHYL CHLORIDE
PERFORMED AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(TWO-WEEK STUDIES)
- APPENDIX A 6-2 STABILITY OF METHYL CHLORIDE
AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(TWO-WEEK STUDIES)
- APPENDIX A 7-1 CONCENTRATION OF METHYL CHLORIDE IN INHALATION CHAMBER
(TWO-WEEK STUDIES)
- APPENDIX A 7-2 ENVIRONMENT OF INHALATION CHAMBER
(TWO-WEEK STUDIES)

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX B 1-1 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX B 1-2 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 1-3 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 1-4 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX B 2-1 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX B 2-2 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 2-3 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 2-4 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX B 3-1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX B 3-2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 3-3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 3-4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX B 4-1 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX B 4-2 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 4-3 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 4-4 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

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

- APPENDIX B 5-1 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX B 5-2 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 5-3 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 5-4 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX B 6-1 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE
- APPENDIX B 6-2 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 6-3 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 6-4 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX B 7-1 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX B 7-2 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 7-3 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 7-4 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX B 7-5 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 7-6 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX B 8-1 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY), ABSOLUTE
RAT:MALE
- APPENDIX B 8-2 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY), ABSOLUTE
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 8-3 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY), ABSOLUTE
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 8-4 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY), ABSOLUTE
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX B 9-1 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY), RELATIVE
RAT:MALE
- APPENDIX B 9-2 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY), RELATIVE
RAT:FEMALE
- APPENDIX B 9-3 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY), RELATIVE
MOUSE:MALE
- APPENDIX B 9-4 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY), RELATIVE
MOUSE:FEMALE
- APPENDIX B 10-1 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY) RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX B 10-2 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY) RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 10-3 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY) RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 10-4 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY) MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS
- APPENDIX B 10-5 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY) MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS
- APPENDIX B 10-6 HISTOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS
(THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY) MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

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

APPENDIX B 11-1 IDENTITY AND PURITY OF METHYL CHLORIDE
PERFORMED AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)

APPENDIX B 11-2 STABILITY OF METHYL CHLORIDE
AT THE JAPAN BIOASSAY LABORATORY
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)

APPENDIX B 12-1 CONCENTRATION OF METHYL CHLORIDE IN INHALATION CHAMBER
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)

APPENDIX B 12-2 ENVIRONMENT OF INHALATION CHAMBER
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)

APPENDIX C 1 METHODS FOR HEMATOLOGY BIOCHEMISTRY AND URINALYSIS

APPENDIX C 2 UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY

要旨

塩化メチルの吸入による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)の試験を実施するにあたり、その投与濃度を検索するために、本予備試験(2週間試験、13週間試験)を実施した。

2週間試験、及び13週間試験のラット、マウスとも被験物質投与群を5群、対照群1群の6群構成で行った。投与濃度は2週間試験のラット、マウスの雌雄とも、3000ppm、1500ppm、750ppm、380ppm、190ppmとし、13週間試験のラットは雌雄とも、3000ppm、1500ppm、750ppm、380ppm、190ppmとし、マウスは雌雄とも、1500ppm、1000ppm、670ppm、440ppm、300ppmとした。投与は塩化メチルを全身暴露することにより行った。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(13週間試験)、血液生化学的検査(13週間試験)、尿検査(13週間試験)、剖検、臓器重量測定(13週間試験)、及び病理組織学的検査を行った。

ラットでは2週間試験の結果、死亡がみられず、雌雄の3000ppmに体重増加の抑制、雌の3000ppm群に摂餌量の低下、雄の3000ppm群に精巣上体(細胞残屑、上皮細胞崩壊)の変化、雌の3000ppm群に副腎(脂肪変性)の変化がみられた。これらの結果より、3000ppm群で対照群と比較して、体重(雄:83%、雌:91%)、摂餌量(雄:91~93%、雌:91~95%)とも著しい変化がみられず、病理学的検査結果が軽度であり、他の群も著変がみられなかったため、13週間試験の投与濃度は2週間試験と同じ濃度の塩化メチルを投与し、動物の変化をみる目的で、3000ppm、1500ppm、750ppm、380ppm、190ppm(公比2.0)の5濃度を設定した。

13週間試験の結果、雄の3000ppm群に死亡が1例みられた。雄の380ppm以上の群、雌の750ppm以上の群に体重増加の抑制(雄:43~93%、雌:52~88%)、雄の750ppm以上の群、雌の1500ppm以上の群に摂餌量の低下がみられた。また、雄の1500ppm以上の群に腎臓(好酸体)、副腎(脂肪変性)、精巣(萎縮、浮腫)、精巣上体(精子減少)の変化、3000ppm群に肺(うっ血)、脾臓(ヘモジデリン沈着)、脳(顆粒細胞変性)の変化がみられ、雌では1500ppm以上の群に副腎(脂肪変性)の変化、3000ppm群に脾臓(ヘモジデリン沈着)の変化がみられた。雌雄とも1500ppm以上の群に軽度の貧血傾向、生化学的検査値の変化、雌の3000ppm群に尿検査値の変化がみられた。これらを参考に、がん原性試験における投与濃度を、高用量を1000ppm、中用量を224ppm、低用量を許容濃度である50ppm(公比4.48有効数値3桁)と設定した。

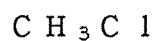
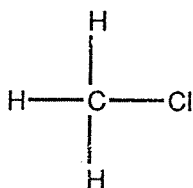
マウスでは2週間試験の結果、雌雄の3000ppm群に10/10例、雄の1500ppm群に1/10例の死亡がみられた。雌の1500ppm群に体重増加の抑制(96%)、雌雄の1500ppm群に腎臓(好塩基性変化)の変化、雄の1500ppm群に肝臓

(単細胞壊死)の変化がみられた。750ppm以下の群では著変を認めず、1500ppm群の変化も、雄で1例の死亡がみられたものの病理学的検査結果が軽度であるため、13週間試験の高用量を1500ppmとした。さらに750ppm群～1500ppm群間の動物の変化をみるため1000ppm群を設定し、以下、670ppm、440ppm、300ppm(公比1.5)の5濃度を設定した。

13週間試験の結果、1500ppm群の雌雄とも10/10例、1000ppm群の雄で2/10例、雌で1/10例の死亡をみた。雌雄の300ppm以上の群で体重増加の抑制(雄:73～84%、雌:87～94%)、雄の300ppm以上の群、雌の670ppm以上の群で摂餌量の低下がみられた。雄の1000ppm群に肝臓(空胞変性)、雌雄の血液学的検査値、血液生化学適検査値の変化がみられた。これらを参考に、がん原性試験の投与濃度は、高用量は1000ppmと670ppmの間をとり800ppmとし、中用量を200ppm、低用量を許容濃度である50ppm(公比4.0)とした。

塩化メチルについて

< 構造式、分子量 >



分子量 : 50.49

CAS.No. : 74-87-3

< 名称と別名 >

名 称 : 塩化メチル (Methyl chloride)

別 名 : Chloromethyl

Monochloromethane

< 物理化学的性状等 >

性 状 : 無色透明のガス体、高濃度において甘味のあるクロロホルム様の臭気

沸 点 : -23.73°C

凝固点 : -97.70°C

比 重 : $d_4^{20} 0.920$

蒸気圧 : $10\text{mmHg} (-92.4^{\circ}\text{C})$

溶解性 : 水には難溶、アルコール、クロロホルム、ベンゼンに易溶

保存条件 : 室温、遮光条件下で気密容器に保存

<用途>

塩化メチルは脂肪族塩化物の中で最も熱安定性がよく、メチル化剤、冷媒、溶剤として用途があり、主としてシリコン類、ブチルゴム、四メチル鉛の製造に使用されており、その他、医薬品、農薬、発泡剤、不燃性フィルム、抽出剤など幅広く使用されている。(文献 1,2)

<生産量>

塩化メチルの日本での生産量は、1988年には約8万2千ton、1989年には約9万3千ton、1991年には約10万1千tonである。(文献 3,4,5)

<許容濃度>

作業環境中での塩化メチルの許容濃度は日本では、50ppm(日本産業衛生学会、1992年)、アメリカでは 50ppm(ACGIH、1991～1992年)である。(文献 6,7)

<人への影響>

反復暴露例としては、2～3週間にわたって 300ppm前後の塩化メチル蒸気に1日8～16時間暴露を受けた6名の症例のうち、第1例では判断力の低下、誤った自動車運転、視覚低下、摂食及び嚥下困難、頭痛、平衡失調が10日間ほど続いたため入院したが、臨床検査成績では軽度の高血圧以外には特に異常を認めず、3ヶ月間の入院で症状の改善をみた。第2例の場合も譫妄状態、失見当識、及び攻撃的性格のために入院したが、臨床検査成績は正常であった。他の症状は発泡プラスチック生産に従事していた作業者であって、複視、不眠、下痢、記憶力低下などを訴え会話速度が遅延していた。これらの症状は数週間ないし数ヶ月後には消褪した。これらの症例から慢性塩化メチル中毒では症状が特徴的ではなく、臨床検査や神経学的検査によってもしばしば異常が見い出されず、中毒の診断には暴露歴の解析が有用であることが指摘されている。(文献 2)

<動物試験>

動物試験による報告を次頁に示す。

試験の種類	動物種	投与期間	投与経路	内容	文献番号
単回投与	ラット	1回	吸入	L C ₅₀ =152000mg/m ³ /30分 (72727.3ppm/30分) T C L ₀ =1500ppm/6時間 T C L ₀ =2000ppm/6時間 T C L ₀ =3000ppm/6時間	(文献 8)
				T C L ₀ =1500ppm/6時間	(文献 9)
				L C L ₀ =3000ppm/4時間	(文献 2)
	マウス	1回	吸入	L C ₅₀ =3081.5ppm/7時間	(文献 10)
				L C ₅₀ =3146ppm/7時間	(文献 11)
				T C L ₀ =500ppm/6時間 T C L ₀ =750ppm/6時間	(文献 12)
				L C L ₀ =3146ppm/7時間	(文献 2)
	ネズミ	1回	吸入	L C ₅₀ =6500mg/m ³	(文献 1)
	モルモット	1回	吸入	L C ₅₀ =20000ppm/2時間	(文献 2)
反復投与	ラット	6日間、6時間/日	吸入	2000ppm ・50%が15日以内に死亡	(文献 13)
		9日間 (12日間試験) 6時間/日	吸入	2000ppm～5000ppm ・肝臓、腎臓、小脳に変性および精巣、精細管、精巣上体の変性	(文献 14)
		F344 12週間(繁殖試験)	吸入	150、475、1500ppm ・0～10週、5日間/週、6時間/日 ・475ppm :雌雄で57日で体重増加抑制 ・1500ppm:雌雄で2週間で10～20%の体重抑制 ・11～12週、7日間/週、6時間/日 ・1500ppm:雄で左右精巣の重度の変性と精巣上体の肉芽腫	(文献 15)
	F344	24ヶ月、5日間、 6時間/日	吸入	50、225、1000ppm ・225ppm :雌で24週間体重増加抑制 ・1000ppm:雌雄で24週間体重増加抑制、 脳の実重量減少 雄で精巣の精細管の両側性の 瀰漫性の変性と萎縮 雌で心臓の体重比増加	(文献 16)
	マウス	6日間、6時間/日	吸入	2000ppm ・50%が3日以内に死亡	(文献 13)
		12日間、6時間/日	吸入	500～2000ppm ・肝臓、腎臓、小脳に変性	(文献 14)

試験の種類	動物種	投与期間	投与経路	内容	文献番号
	マウス C57BL/6	11日間、 5.5時間/日	吸入	雌の15、50、100、150、200ppm ・50ppm :影響なし ・100ppm:小脳の顆粒細胞層の変性	(文献 17)
	C57BL/6	11日間、 5.5時間/日	吸入	雌の150、400、800、1600、2400ppm ・150ppm :影響なし ・400ppm :小脳の顆粒細胞層の変性 ・2400ppm:小脳の変性に加え、腎臓と造血 作用への影響、血色素尿症	(文献 17)
	B6C3F ₁	24ヶ月、5日間、 6時間/日	吸入	50、225、1000ppm ・1000ppm:雌雄で心臓の体重比増加、脳の実重量減少、脾臓のリンパ球の減少と萎縮、小脳の顆粒細胞層の変性と萎縮 雄で18週間体重増加抑制、肝細胞の変性、空胞化、巨核化、巨大化、多角化、腎腫瘍の増加、腎細尿管上皮の過形成と巨大化	(文献 16)

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

2 週 間 試 験 : P91031

1 3 週 間 試 験 : 83610

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

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した塩化メチルは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、計算値、及び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、2週間試験は Appendix A 6-1、13週間試験は Appendix B 11-1 に示した。

I - 2 - 2 安定性

被験物質として使用した塩化メチルは各ロット毎に使用開始前時及びその使用終了時に、赤外吸収スペクトル測定、ガスクロマトグラフィーを実施し、安定であることを確認した。なお、それらの結果について、2週間試験は Appendix A 6-2、13週間試験は Appendix B 11-2 に示した。

I - 3 試験動物

動物は2週間試験、13週間試験ともに日本チャールス・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。

2週間試験では、ラット、マウスとも雌雄各72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60匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:111~136g、雌:95~109g/マウス雄:19.6~24.7g、雌:17.0~20.1g)を選別し、試験に供した。

13週間試験では、ラット、マウスとも雌雄各72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60匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:117~136g、雌:97~108g/マウス雄:21.8~25.6g、雌:16.9~20.6g)を選別し、試験に供した。

なお、F344/DuCrj(Fischer)ラット及びCrj:BDF₁マウスを選択した理由は、当該動物をがん原性試験において使用することが決定していたことによる。

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

2週間試験、13週間試験において、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に設定濃度の塩化メチルのガスを送り込み、全身暴露する事により行った。

各試験における投与期間及び暴露回数は以下の通りである。

2週間試験・・・・・・6時間/日，5日/週，10回/2週間

13週間試験・・・・・・6時間/日，5日/週

ラット：64回/13週間

マウス：63回/13週間

(祝祭日を除く)

Ⅱ - 1 - 2 投与濃度

2週間試験

2週間試験では、ラット、マウスとも高用量を3000ppmに設定し、それ以下1500ppm、750ppm、380ppm、190ppm(公比2.0)とした。

13週間試験

13週間試験では、ラットで高用量を3000ppmに設定し、それ以下1500ppm、750ppm、380ppm、190ppm(公比2.0)とした。

マウスでは、高用量を1500ppmに設定し、それ以下1000ppm、670ppm、440ppm、300ppm(公比1.5)とした。

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、フローメーターによって塩化メチル純ガスと清浄空気とを一定の割合で希釈混合し、その混合ガスを各吸入チャンバーのラインミキサーの上流側に供給した。次に、各吸入チャンバー内の塩化メチル濃度はガスクロマトグラフによる測定値を監視しながら、設定値になるようにその混合ガスの供給流量を調節した。

Ⅱ - 1 - 4 被験物質の濃度測定

各試験における吸入チャンバー内の塩化メチル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。

2週間試験は、Appendix A 7-1、13週間試験は、Appendix B 12-1 に測定結果を示した。

各試験とも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、2週間試験、13週間試験における結果(平均値±標準偏差)を記述すると、2週間試験のラットでは 3000ppm群:2999.4±27.0ppm、1500ppm群:1506.0±9.7ppm、750ppm群:753.0±7.0ppm、380ppm群:381.8±5.1ppm、190ppm群:189.6±1.9であり、マウスでは 3000ppm群:3040.6±48.1ppm、1500ppm群:1501.3±8.6ppm、750ppm群:750.5±7.1ppm、380ppm群:380.4±2.7ppm、190ppm群:188.6±3.0であり、13週間試験のラットでは 3000ppm群:3001.3±14.2ppm、1500ppm群:1495.8±5.4ppm、750ppm群:748.6±4.6ppm、380ppm群:380.2±1.9ppm、190ppm群:189.7±1.1であり、マウスでは 1500ppm群:1499.8±6.7ppm、1000ppm群:999.1±5.7ppm、670ppm群:669.7±2.8ppm、440ppm群:440.6±1.8ppm、300ppm群:299.3±1.5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 18)

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し、また、ゲージにも検疫、馴化個体番号を付けた。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、他の試験との区別は、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することにより行った。

II - 2 - 2 飼育条件

動物は、2週間試験、13週間試験とも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。各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2週間試験は Appendix A 7-2 に、13週間試験は Appendix B 12-2 に示した。各試験とも設定条件の範囲内であった。また、2週間試験、及び13週間試験における馴化期間、観察飼育期間の動物飼育は、温度 $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ (但し、各試験とも検疫期間の動物飼育は、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/時の環境の飼育室で行った。

各試験の検疫期間中は1ケージ当り1匹の単飼(ステンレス製2連型網ケージ、ラット：170W×294D×176H mm、マウス：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、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5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=30KGy-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、2週間試験の塩化メチル暴露中は給餌、給水をしなかった。

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

各試験とも、毎日1回以上、動物の一般状態の観察を行った。

Ⅱ－3－2 体重測定

2週間試験では、0日(投与開始直前)、1日(1週1日)、7日(1週7日)、及び14日(2週7日)、13週間試験では週1回、体重を測定した。

Ⅱ－3－3 摂餌量測定

2週間試験及び13週間試験では週1回、摂餌量を測定した。

Ⅱ－3－4 血液学的検査

各試験とも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、13週間試験の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 C 1 に示した。

Ⅱ－3－5 血液生化学的検査

各試験とも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、13週間試験の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 C 1 に示した。

Ⅱ - 3 - 6 尿検査

13週間試験の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。

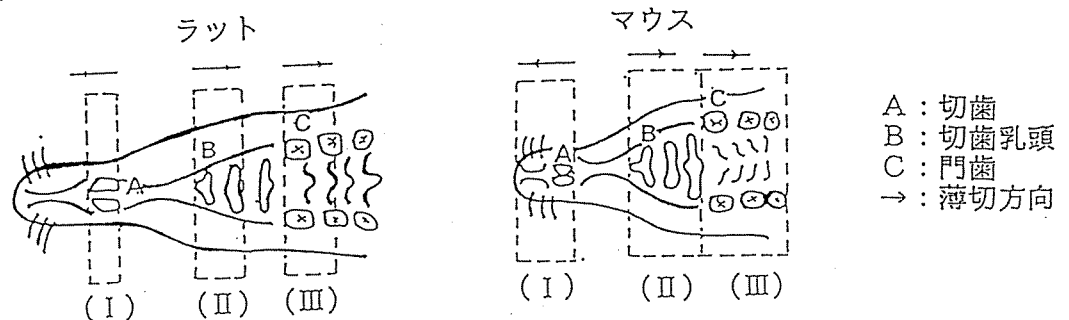
検査項目は Table 1、検査方法は Appendix C 1 に示した。

Ⅱ - 3 - 7 病理学的検査

各試験とも解剖時に全動物について肉眼的に観察を行った。2週間試験では雌雄各群の2例の動物の臓器を、13週間試験では全動物の臓器を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1)、切歯乳頭(レベル2)、第一臼歯の前端(レベル3)の3カ所で切り出し(横断)、検査した。

臓器重量は13週間試験の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。

切出し位置



Ⅱ - 4 数値処理と統計学的方法

(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 C 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。

(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。

(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13週試験では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。

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、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 2週間試験 (試験番号: 0174)

(1) 動物の状態観察

動物の死亡は認められなかった。

全投与群において特記すべき所見は認められなかった

体重の推移を Table 2, 3 及び Appendix A 2-1, 2 に示した。

雌雄とも 3000ppm群で1週7日以後最終計測日(2週7日)まで対照群と比較して体重増加の抑制が認められた。投与期間中、雌雄の 1500ppm以下の群では対照群と比較して顕著な差は認められなかった。最終計測日(2週7日)における各投与群の体重は対照群と比較して、雄では 3000ppm群:83%、1500ppm群:93%、750ppm群:94%、380ppm群:99%、190ppm群:99%、雌では 3000ppm群:91%、1500ppm群:95%、750ppm群:97%、380ppm群:102%、190ppm群:100%であった。

摂餌量(1日1匹当り)を Table 4, 5 及び Appendix A 3-1, 2 に示した。

雄の 3000ppm群で1週7日に、雌の 3000ppm群で最終計測日(2週7日)に、対照群と比較して低値が認められ、それらの摂餌量は対照群に対して、雌雄とも 3000ppm群:91%であった。

(2) 病理学的検査

剖検

雌雄とも投与群に特徴的な所見、あるいは対照群に比較して顕著に高い発生を示した所見は認められなかった。

病理組織学的検査

定期解剖動物では、各群、雌雄各2例について病理組織学検査を行った。その結果を Appendix A 5-1, 2 に示した。

雄

380、3000ppm群に精巣上体の細胞残屑と精子減少、これに加えて 3000ppm群では精巣上体の上皮細胞崩壊が認められた。

雌

3000ppm群に副腎の脂肪変性が認められた。

Ⅲ - 1 - 2 13週間試験 (試験番号:0 1 9 1)

(1) 動物の状態観察

動物の死亡は、雄の 3000ppm群において塩化メチルの投与開始後、13週目に1例認められた。

一般状態の観察結果を Appendix B 1-1,2 に示した。

雄の 3000ppm群に自発運動量減少、横臥、瘦削、立毛、異常呼吸、不整呼吸、及び体温低下の所見がみられた。雌の 1500ppm以上の群に、尿による外陰部周囲の汚染の所見がみられた。

体重の推移を Table 6,7 及び Appendix B 2-1,2 に示した。

雌雄の 750ppm以上の群で対照群と比較して体重増加の抑制が認められ、雄の 380ppm群では、13週目に体重増加の抑制が認められた。最終計測日(13週7日)まで生存した動物の体重値は対照群と比較して、雄で 3000ppm群:43%、1500ppm群:63%、750ppm群:79%、380ppm群:93%、雌で 3000ppm群:52%、1500ppm群:73%、750ppm群:88%であった。

摂餌量(1日1匹当り)を Table 8,9 及び Appendix B 3-1,2 に示した。

雌雄の 1500ppm以上の群で対照群と比較して摂餌量の低値が認められ、さらに、投与期間の後半には、雄の 750ppm群でも摂餌量の低値が認められた。それらの摂餌量は対照群に対して、雄では、3000ppm群:58~81%、1500ppm群:62~89%、750ppm群:75~87%、雌では、3000ppm群:51~80%、1500ppm群:73~89%であった。

(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

血液学的検査

血液学的検査の結果を Appendix B 4-1,2 に示した。

雄の 1500ppm以上の群で赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少、血小板数の増加が認められ、3000ppm群ではM C Vの増加、M C H C減少が認められた。

雌の 1500ppm以上の群でヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少が認められ、これに加えて 3000ppm群では赤血球数及びM C H Cの減少が認められた。

その他、雌の 3000ppm群で好酸球比の減少がみられたが、投与量に対応した変化ではなかった。また、M C Hは、雄の 3000ppm群で増加、雌の 1500ppm以上の群では減少と雌雄で相反する結果を示した。したがって、これらの変化はいずれも被験物質による影響とは考えられなかった。

血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix B 5-1,2 に示した。

雄の 750ppm以上の群でクレアチニンの減少、1500ppm以上の群でアルブミン、A/G比、総コレステロール及びリン脂質の増加、グルコースの減少、C P K活性の低下が認められ、これに加えて 3000ppm群ではトリグリセライドの減少、ナトリウム、カリウム、及びクロールの増加が認められた。

雌の 1500ppm以上の群で総コレステロール、リン脂質及びカリウムの増加が認められ、これに加えて 3000ppm群ではA/G比及びナトリウムの増加、L D H、A L P 及びγ-G T P 活性の上昇、クレアチニンの減少が認められた。

その他、雄の 1500ppm群でG O T、G P T及びA L P活性の低下、雌の 1500ppm群でG O T活性の低下がみられたが、いずれも投与量に対応した変化ではなく、被験物質による影響とは考えられなかった。

尿検査

尿検査の結果を Appendix B 6-1,2 に示した。

雌の 3000ppm群で蛋白の陽性度の増加及びケトン体の陽性例の増加がみられた。

その他には特に変化は認められなかった。

(3) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix B 7-1~3 に示した。

死亡／瀕死動物（3000ppm群：雄1例）に、胸腺の萎縮と赤色化が認められた。

定期解剖動物では、雄の 3000ppm群に肺の赤色化が認められた。雌では、投与群に特徴的な所見、あるいは対照群に比較して顕著に高い発生を示した所見は認められなかった。

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 B 8-1,2（実重量）、Appendix B 9-1,2（体重比）に示した。

1500ppm以上の群で雄の精巣の実重量と体重比の低値、雌の卵巣の実重量と体重比の低値が認められた。

その他、実重量では、雄の 750ppm以上と雌の 1500ppm以上の群に脳、胸

腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓あるいは副腎の低値、体重比では、雌雄の750ppm以上の群に脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓あるいは副腎の高値が認められたが、体重増加の抑制による影響と考えられた。

病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を Appendix B 10-1,2 に示した。

雄

死亡／瀕死動物（3000ppm:雄1例）に、肝臓の巣状壊死、精巣の萎縮、精巣上体の精子減少、及び脳（小脳）の顆粒細胞変性が認められた。

定期解剖動物では、1500ppm以上の群に副腎の脂肪変性、腎臓の好酸体の出現の減少、精巣上体の精子減少、精巣の萎縮と浮腫、これに加えて3000ppm群には脳（小脳）の顆粒細胞変性が認められた。

雌

定期解剖動物では、750ppm以上の群に副腎の脂肪変性（3000ppm群:10/10例、1500ppm群:9/10例、750ppm群:1/10例）が認められた。

Ⅲ - 2 マウスを用いた試験

Ⅲ - 2 - 1 2週間試験 (試験番号: 0 1 7 5)

(1) 動物の状態観察

動物の死亡は、雌雄の 3000ppm群、及び雄の 1500ppm群に認められ、雄では 3000ppm群:10/10例(1週1日:2例、1週2日8例—合計10例)、1500ppm群:1/10例(1週3日)、雌では 3000ppm群:10/10例(1週4日:2例、1週5日:7例、1週6日:1例—合計10例)が死亡した。また、雄の対照群で1例が事故(2週2日吸入チャンバーの気液分離装置水槽へ転落)により死亡した。

一般状態の観察結果を Appendix A 1-1,2 に示した。

雄の 190ppm群、及び 750ppm以上の群に立毛、これに加えて 1500ppm以上の群では自発運動量減少、異常呼吸、及び不整呼吸の所見がみられた。

雌の 3000ppm群に自発運動量減少、立毛、異常呼吸、不整呼吸、呼吸緩徐、深呼吸、血尿、赤色尿、体温低下、及び円背位の所見がみられた。

体重の推移を Table 10,11 及び Appendix A 2-3,4 に示した。

雌雄の 3000ppm群では最終計測値(2週7日)まで生存した動物はいなかったが、雄の 3000ppm群、1500ppm群、雌の 3000ppm群で1週1日に体重の低下、もしくは対照群と比較して体重増加の抑制が認められた。雌の 1500ppm群では1週7日以後、最終計測日(2週7日)まで継続して体重増加の抑制がみられた。投与期間中、雌雄の 750ppm以下の群では対照群と比較して顕著な差は認められなかった。最終計測日(2週7日)における各投与群の体重は対照群と比較して、雄では 1500ppm群:94%、750ppm群:98%、380ppm群:99%、190ppm群:99%、雌では 1500ppm群:96%、750ppm群:100%、380ppm群:101%、190ppm群:102%であった。

摂餌量(1日1匹当り)を Table 12,13 及び Appendix A 3-3,4 に示した。

雄の 1500ppm群に、1週7日に対照群と比較して低値が認められ、その摂餌量は対照群に対して83%であった。最終計測日(2週7日)では各投与群とも対照群と比較して顕著な差は認められなかった。

(2) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix A 4-1~3 に示した。

死亡動物では、雄の 3000ppm群に肺の赤色化と赤色斑が認められた。雌では著変を認めなかった。

定期解剖動物では、雄の 1500ppm群に肝臓の白色斑と白色点が認められた。雌では、投与群に特徴的な所見、あるいは対照群と比較して顕著に高い発生を示した所見は認められなかった。

病理組織学的検査

死亡／瀕死動物では、雄3例（3000ppm群:2例、1500ppm群:1例）、雌2例（3000ppm群:2例）、定期解剖動物では、3000ppm群を除く各群、雌雄各2例について病理組織学検査を行った。その結果を Appendix A 5-3~6 に示した。

雄

死亡動物では、3000ppm群に肝臓の中心性壊死、唾液腺の腫脹、胸腺の萎縮と核崩壊、1500ppm群にはこれに加えて心臓の壊死と胃の出血が認められた。なお、死因は肝臓の病変であった。

定期解剖動物では、1500ppm群に肝臓の単細胞壊死と腎臓の好塩基性変化が認められた。

雌

死亡動物では、腎臓の尿細管壊死、肺の浮腫、胸腺と脾臓の萎縮、唾液腺の腫脹、前胃の糜爛、肝臓の中心性壊死、及び副腎のX域細胞崩壊の所見が認められた。なお、死因は腎臓の病変であった。

定期解剖動物では、1500ppm群に腎臓の好塩基性変化が認められた。

Ⅲ - 2 - 2 13週間試験 (試験番号: 0 1 9 2)

(1) 動物の状態観察

動物の死亡は、雌雄の 1000ppm以上の群に認められ、雄では 1000ppm群:2/10例(11週:2例)、1500ppm群:10/10例(1週:4例、6週:1例、9週:1例、10週:4例—合計10例)、雌では 1000ppm群:1/10例(11週:1例)、1500ppm群:10/10例(8週:1例、9週:1例、10週:6例、11週:2例—合計10例)が死亡した。また、雌の対照群のうち2例が事故(14週、吸入チャンバーの気液分離装置水槽へ転落)より死亡した。

一般状態の観察結果を Appendix B 1-3,4 に示した。

雄の 1500ppm群に円背位、立毛、異常呼吸、及び不整呼吸の所見が認められた。雌の 1500ppm群に異常呼吸と不整呼吸の所見が認められた。

体重の推移を Table 14,15 及び Appendix B 2-3,4 に示した。

雌雄の 670ppm以上の群で対照群と比較して体重増加の抑制が認められ、さらに、投与期間の初期以降には、全投与群について体重増加の抑制がみられた。最終計測日(13週7日)まで生存した動物の体重値は対照群に対して、雄で 1000ppm群:73%、670ppm群:75%、440ppm群:80%、300ppm群:84%、雌で 1000ppm群:87%、670ppm群:89%、440ppm群:92%、300ppm群:94%であった。また、1500ppm群では、最終計測日(13週7日)まで生存した動物はいなかったが、生存中は引き続いて対照群と比較して体重増加の抑制が認められた。

摂餌量(1日1匹当たり)を Table 16,17 及び Appendix B 3-3,4 に示した。

雌雄の 670ppm以上の群で投与初期に対照群と比較して摂餌量の低値が認められた。また、雌雄の 1500ppm群においては、最終計測日(13週7日)まで生存した動物はいなかったが、生存中、雄では対照群と比較して高値が認められた。

(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

血液学的検査

血液学的検査の結果を Appendix B 4-3,4 に示した。

雄の 670、1000ppm群で赤血球数の減少、M C V 及び M C H の増加、1000ppm群で血小板数の増加が認められた。

雌の各投与群で M C V の増加、これに加えて 1000ppm群では血小板数の増加が認められた。

血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix B 5-3,4 に示した。

雄の各投与群でグルコース及びトリグリセライドの減少が認められ、これに加えて 670、1000ppm群ではアルブミン、A/G比の増加、及びALP活性の上昇が認められた。

雌の各投与群で総コレステロールの増加、これに加えて 1000ppm群ではA/G比の増加が認められた。

その他、雄の 300ppm群でCPK活性の低下、440ppm群で尿素窒素の増加がみられたが、投与量に対応した変化ではなく、被験物質による影響とは考えられなかった。

尿検査

尿検査の結果を Appendix B 6-3,4 に示した。

雌雄ともに、特に変化は認められなかった。

(3) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix B 7-4~6 に示した。

死亡/瀕死動物では、雄の 1500ppm群に肺の赤色斑と肝臓の白色斑が認められた。雌では、著変が認められなかった。

定期解剖動物では、雌雄とも投与群に特徴的な所見、あるいは対照群に比較して顕著に高い発生を示した所見は認められなかった。

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 B 8-3,4 (実重量)、B 9-3,4 (体重比) に示した。

実重量では、雄の 670ppm以上の群に肝臓、1000ppm群に脳、雌の 300ppm以上の群に心臓、440ppm以上の群に脳、670ppm群に腎臓、さらに、1000ppm群に脾臓の低値が認められた。

体重比では、雄の各投与群に心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、440ppm以上の群に脳、440、670ppm群に精巣の高値、雌の各投与群に肝臓、670ppm以上の群に胸腺、1000ppm群に腎臓の高値が認められたが、体重増加の抑制による影響と考えられた。

病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を Appendix B 10-4～6 に示した。

雄

死亡／瀕死動物では、1500ppm群に肝臓の中心性壊死、石灰沈着、及び中心性の空胞変性、腎臓の尿細管壊死が認められた。

定期解剖動物では、1000ppm群に肝臓の中心性の空胞変性が認められた。

雌

死亡／瀕死動物に著変を認めなかった。定期解剖動物では投与群に特徴的な所見、あるいは対照群に比較して顕著に高い発生を示した所見は認められなかった。

IV 考察及びまとめ

ーラットー

< 2 週間試験 >

ラットの2週間試験の結果、全投与群とも死亡はみられなかった。高用量の3000ppm群で、雌雄とも対照群と比較して体重増加の抑制（最終体重は雄:83%、雌:91%）、摂餌量で雌に低値、病理組織学的に雄の精巣上体、雌の副腎に変化が観察されたが軽度なものであった。1500ppm以下の群では、体重、摂餌量とも対照群と比較して有意な差は認められず、病理組織学的に雄の380ppm群に精巣上体の軽度な変化が観察されたほかは著変を認めなかった。

これらの結果から、13週間試験の投与濃度を設定するに当たり、3000ppm群での体重増加の抑制率を指標として、高用量を3000ppmとしても、13週間の連続投与に耐え得るものと考えられること、また、低用量の190ppmでは13週間試験でも変化のする可能性が少ないであろうことを考慮にいれ、13週間試験の投与濃度は2週間試験の投与濃度と同等とし、高用量を3000ppmとし、以下、1500ppm、750ppm、380ppm、190ppm（公比2.0、1の位四捨五入）と設定した。

< 13 週間試験 >

13週間試験の結果、雄の3000ppm群において死亡が1例みられた。1500ppm以上の群で、雌雄とも対照群と比較して体重増加の抑制（最終体重は3000ppm群:雄43%、雌52%、1500ppm群:雄63%、雌73%）と摂餌量の低値、雄の精巣、及び雌の卵巣の実重量と体重比の低値が認められ、病理組織学的には、雄に副腎、腎臓、精巣、精巣上体の変化（3000ppm群ではこれに加えて小脳の変化）、雌に副腎の変化が観察された。臨床検査では、雄の1500ppm以上の群に血液学的検査で貧血傾向、血液生化学的検査で、雌の3000ppm群に尿蛋白の陽性度の変化や、ケトン体陽性例の増加がみられた。750ppm群では、体重増加の抑制（最終体重は雄79%、雌88%）、不連続ではあるが摂餌量の低値、病理組織学的に雌で副腎の変化、血液生化学的検査で雄にクレアチニンの減少がみられたが、380ppm以下の群では、雄の体重増加の抑制（最終体重は93%）の他、著変を認めなかった。

以上の結果より、1500ppm以上の群では、対照群に比べ体重増加の抑制も著しく、病理学的検査でも致死的とはいえないものの、明かな変化を認め、2年間の反復投与には耐えられないと考えられた。しかし、750ppm群では対

照群に比べ体重増加の抑制、病理組織学的検査で雌に1例副腎の変化がみられたものの、その他において、生存に影響をおよぼすような明らかな変化は認められなかった。また、Paukovらは、F344ラットを用いて2年間の反復投与試験の結果、1000ppm群で、投与開始以後24週間の体重増加の抑制、及び精巣の変化が認められたが、定期解剖時までの動物の生存率は高かったと報告している(文献 16)。そこで、がん原性試験の高用量は、明かな影響がみられた 1500ppmと体重増加の抑制はみられたものの、わずかな変化しか示さなかった 750ppmの間である 1000ppmが適当であると判断した。また、低用量については、日本産業衛生学会、及びACGIHによる許容濃度は 50 ppmであり、これを低用量とする意義は十分にあるものと判断した。以上の事から、ラットのがん原性試験の用量を 1000ppm、224ppm、50ppm (公比 4.48、有効桁数3桁) に設定した。

－ マウス －

< 2 週間試験 >

マウスの2週間試験の結果、高用量の 3000ppm群で雌雄とも10/10例、雄の 1500ppm群で1/10例の死亡がみられた。なお、雄の死因は肝臓の病変、雌の死因は腎臓の病変と考えられた。定期解剖動物についても 1500ppm群では雌に体重増加の抑制、病理学的検査には、雄に肝臓と腎臓の変化、雌に腎臓の変化が認められ、これらの変化は重篤なものではなかった。750ppm以下の群では、雌雄とも対照群と比較して、著変を認めなかった。

これらの結果から、13週間試験の投与濃度を設定するにあたり 1500ppm群では体重増加の抑制率、摂餌量の低下率が深刻ではなく、さらに病理組織学的にも変化が重度なものではないこと、750ppm以下の群では何の変化もみられなかった為に、750～1500ppm間の動物の変化を観察する必要性が生じたこと、これに加えて、マウスはラットに比べ塩化メチルに関して感受性が高いことがわかり、公比を小さくすべきであることを考慮に入れ、高用量を1500ppmとし、以下、1000ppm、670ppm、440ppm、300ppm (公比 1.5、1の位四捨五入) と設定した。

< 13 週間試験 >

13週間試験の結果、高用量の 1500ppm群で雌雄とも10/10例、1000ppm群の雄で2/10例、雌で1/10例の死亡がみられ、病理組織学的には雄に肝臓と腎臓の変化が観察された。定期解剖動物についても 1000ppm群では雌雄とも対照群と比較して体重増加の抑制が認められ、病理組織学的には雄の肝

臓に変化が観察された。さらに、臨床検査では血液学的に血小板数の増加等変化、血液生化学的に雄に体重増加の抑制による変化と雌にA/G比、ALP活性の上昇等の変化が認められた。670ppm群では雌雄とも体重増加の抑制（最終体重は雄75%、雌89%）、臨床検査では血液学的にMCVの増加等変化、血液生化学的に雄のアルブミンの増加等変化が認められた。440ppm以下の群では、体重増加の抑制（最終体重は440ppm群：雄80%、雌92%、300ppm群：雄84%、雌94%）の他、著変は認めなかった。

以上の結果より、1000ppm群では雄に2例、雌に1例の死亡、対照群と比較して体重増加の抑制、また、病理組織学的にも雄の肝臓に明らかな変化を認めた。しかし、670ppm群では死亡はみられず、体重増加の抑制、臨床検査値の変化は認められたものの、病理組織学的変化等明らかな変化は認められなかった。また、Paukovらは、B6C3F₁マウスを用いた2年間の反復投与試験の結果、1000ppmでは雄で投与開始後、18週間の体重増加の抑制、肝臓の変化及び腎腫瘍増加、雌雄で脾臓及び小脳に変化が認められたが、定期解剖時までの動物の生存率は低かったと報告している（文献16）。そこで、がん原性試験の高用量は、死亡を含む明かな影響がみられた1000ppmと体重増加の抑制はみられたものの病理組織学的検査で明かな障害を示さなかった670ppmの中間値をとり800ppmが適当であると判断した。さらに、ラットと同様、低用量は許容濃度である50ppmとした。以上の事から、マウスのがん原性試験の用量を800ppm、200ppm、50ppm（公比4.0）に設定した。

V 文献

1. 浅原照三、戸倉仁一郎、大河原信、熊野谿従、妹尾学 編(1980)
溶剤ハンドブック(第3刷)
pp. 244-245, 講談社, 東京.
2. 後藤 稠、池田正之、原 一郎 編(1982)
産業中毒便覧(増補版)
pp. 569-570, 医歯薬出版, 東京.
3. 化学工業日報社(1990)
11290の化学商品
pp. 671-672, 化学工業日報社, 東京.
4. 化学工業日報社(1991)
11691の化学商品
pp. 698, 化学工業日報社, 東京.
5. 化学工業日報社(1993)
12093の化学商品
pp. 717-718, 化学工業日報社, 東京.
6. 日本産業衛生学会(1992)
許容濃度の勧告(1992)
産業医学, 34, 370
7. American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
ACGIH化学物質と物理因子のTLV化学物質のBEI(1991~1992年度使用)
日測協資料 No. 30, pp. 24, 日本作業環境測定協会.
8. Sweet, D. V(ed) (1987)
Registry of Toxic Effects of Chemical Substance(1985-1986)
Vol. 3A, pp. 107
NIOSH, U. S. Dept. Health and Human Services, Washington, D. C.
9. Wolkowski-Tyl, R., Phelps, M. and Davis, J. K. (1983)
Structural teratogenicity evaluation of methyl chloride in
rats and mice after inhalation exposure
Teratology 27, 181-195

10. von Oettingen, W. F., Powell, C. C., Sharpless, N. E., Alford, W. C. and Pecora, L. J. (1950)
Comparative studies of the toxicity and pharmacodynamic action of chlorinated methanes with special reference to their physical and chemical characteristics
Arch. int. Pharmacodyn., 81, 17-34
11. von Oettingen, W. F., Powell, C. C., Sharpless, N. E., Alford, W. C. and Pecora, L. J. (1949)
Relation between the toxic action of chlorinated methanes and their chemical and physicochemical properties
National Institutes of Health Bulletin, No. 191, pp. 1-85
12. Wolkowski-Tyl, R., Lawton, A. D., Phelps, M. and Hamm, T. E., Jr. (1983)
Evaluation of heart malformations in $B_6C_3F_1$ mouse fetuses induced by in utero exposure to methyl chloride
Teratology, 27, 197-206
13. Smith, W. W. and von Oettingen, W. F. (1947)
The acute and chronic toxicity of methyl chloride
Journal of Industrial Hygiene and Toxicology, 29, 47-52
14. Morgan, K. T., Swenberg, J. A., Hamm, T. E., Jr., Wolkowski-Tyl, R. and Phelps, M. (1982)
Histopathology of acute toxic response in rats and mice exposed to methyl chloride by inhalation
Fundamental and Applied Toxicology, 2, 293-299
15. Hamm, T. E., Jr., Raynor, T. H., Phelps, M. C., Auman, C. D., Adams, W. T., Proctor, J. E. and Wolkowski-Tyl, R. (1985)
Reproduction in Fischer-344 rats exposed to methyl chloride by inhalation for two generations
Fundamental and Applied Toxicology, 5, 568-577
16. Paukov, K. L., Kerns, W. D., Chrisp, C. E., Thake, D. C., Persing, R. L., Harroff, H. H. and Gralla, E. J. (1982)
Major findings in a twenty-four month inhalation toxicity study of methyl chloride in mice and rats
Toxicologist, 2(1), A566. [Abstract]

17. Landry, T. D., Quast, J. F., Gushow, T. S. and Mattsson, J. L. (1985)
Neurotoxicity of methyl chloride in continuously versus
intermittently exposed female C57BL/6 mice
Fundamental and Applied Toxicology, 5, 87-98
18. 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
適正層別方式の確立
薬理と治療, 14, 7285-7302

要 旨

塩化メチルの吸入による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)の試験を実施するにあたり、その投与濃度を検索するために、本予備試験(2週間試験、13週間試験)を実施した。

2週間試験、及び13週間試験のラット、マウスとも被験物質投与群を5群、対照群1群の6群構成で行った。投与濃度は2週間試験のラット、マウスの雌雄とも、3000ppm、1500ppm、750ppm、380ppm、190ppmとし、13週間試験のラットは雌雄とも、3000ppm、1500ppm、750ppm、380ppm、190ppmとし、マウスは雌雄とも、1500ppm、1000ppm、670ppm、440ppm、300ppmとした。投与は塩化メチルを全身暴露することにより行った。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(13週間試験)、血液生化学的検査(13週間試験)、尿検査(13週間試験)、剖検、臓器重量測定(13週間試験)、及び病理組織学的検査を行った。

ラットでは2週間試験の結果、死亡がみられず、雌雄の3000ppmに体重増加の抑制、雌の3000ppm群に摂餌量の低下、雄の3000ppm群に精巣上体(細胞残屑、上皮細胞崩壊)の変化、雌の3000ppm群に副腎(脂肪変性)の変化がみられた。これらの結果より、3000ppm群で対照群と比較して、体重(雄:83%、雌:91%)、摂餌量(雄:91~93%、雌:91~95%)とも著しい変化がみられず、病理学的検査結果が軽度であり、他の群も著変がみられなかったため、13週間試験の投与濃度は2週間試験と同じ濃度の塩化メチルを投与し、動物の変化をみる目的で、3000ppm、1500ppm、750ppm、380ppm、190ppm(公比2.0)の5濃度を設定した。

13週間試験の結果、雄の3000ppm群に死亡が1例みられた。雄の380ppm以上の群、雌の750ppm以上の群に体重増加の抑制(雄:43~93%、雌:52~88%)、雄の750ppm以上の群、雌の1500ppm以上の群に摂餌量の低下がみられた。また、雄の1500ppm以上の群に腎臓(好酸体)、副腎(脂肪変性)、精巣(萎縮、浮腫)、精巣上体(精子減少)の変化、3000ppm群に肺(うっ血)、脾臓(ヘモジデリン沈着)、脳(顆粒細胞変性)の変化がみられ、雌では1500ppm以上の群に副腎(脂肪変性)の変化、3000ppm群に脾臓(ヘモジデリン沈着)の変化がみられた。雌雄とも1500ppm以上の群に軽度の貧血傾向、生化学的検査値の変化、雌の3000ppm群に尿検査値の変化がみられた。これらを参考に、がん原性試験における投与濃度を、高用量を1000ppm、中用量を224ppm、低用量を許容濃度である50ppm(公比4.48有効数値3桁)と設定した。

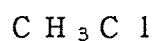
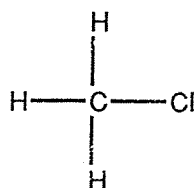
マウスでは2週間試験の結果、雌雄の3000ppm群に10/10例、雄の1500ppm群に1/10例の死亡がみられた。雌の1500ppm群に体重増加の抑制(96%)、雌雄の1500ppm群に腎臓(好塩基性変化)の変化、雄の1500ppm群に肝臓

(単細胞壊死)の変化がみられた。750ppm以下の群では著変を認めず、1500ppm群の変化も、雄で1例の死亡がみられたものの病理学的検査結果が軽度であるため、13週間試験の高用量を1500ppmとした。さらに750ppm群～1500ppm群間の動物の変化をみるため1000ppm群を設定し、以下、670ppm、440ppm、300ppm(公比1.5)の5濃度を設定した。

13週間試験の結果、1500ppm群の雌雄とも10/10例、1000ppm群の雄で2/10例、雌で1/10例の死亡をみた。雌雄の300ppm以上の群で体重増加の抑制(雄:73～84%、雌:87～94%)、雄の300ppm以上の群、雌の670ppm以上の群で摂餌量の低下がみられた。雄の1000ppm群に肝臓(空胞変性)、雌雄の血液学的検査値、血液生化学適検査値の変化がみられた。これらを参考に、がん原性試験の投与濃度は、高用量は1000ppmと670ppmの間をとり800ppmとし、中用量を200ppm、低用量を許容濃度である50ppm(公比4.0)とした。

塩化メチルについて

< 構造式、分子量 >



分子量 : 50.49

CAS. No. : 74-87-3

< 名称と別名 >

名 称 : 塩化メチル (Methyl chloride)

別 名 : Chloromethyl

Monochloromethane

< 物理化学的性状等 >

性 状 : 無色透明のガス体、高濃度において甘味のあるクロロホルム様の臭気

沸 点 : -23.73°C

凝固点 : -97.70°C

比 重 : $d_4^{20} 0.920$

蒸気圧 : $10\text{mmHg} (-92.4^{\circ}\text{C})$

溶解性 : 水には難溶、アルコール、クロロホルム、ベンゼンに易溶

保存条件 : 室温、遮光条件下で気密容器に保存

<用途>

塩化メチルは脂肪族塩化物の中で最も熱安定性がよく、メチル化剤、冷媒、溶剤として用途があり、主としてシリコン類、ブチルゴム、四メチル鉛の製造に使用されており、その他、医薬品、農薬、発泡剤、不燃性フィルム、抽出剤など幅広く使用されている。(文献 1,2)

<生産量>

塩化メチルの日本での生産量は、1988年には約8万2千ton、1989年には約9万3千ton、1991年には約10万1千tonである。(文献 3,4,5)

<許容濃度>

作業環境中での塩化メチルの許容濃度は日本では、50ppm(日本産業衛生学会、1992年)、アメリカでは 50ppm(ACGIH、1991～1992年)である。(文献 6,7)

<人への影響>

反復暴露例としては、2～3週間にわたって 300ppm前後の塩化メチル蒸気に1日8～16時間暴露を受けた6名の症例のうち、第1例では判断力の低下、誤った自動車運転、視覚低下、摂食及び嚥下困難、頭痛、平衡失調が10日間ほど続いたため入院したが、臨床検査成績では軽度の高血圧以外には特に異常を認めず、3ヶ月間の入院で症状の改善をみた。第2例の場合も譫妄状態、失見当識、及び攻撃的性格のために入院したが、臨床検査成績は正常であった。他の症状は発泡プラスチック生産に従事していた作業者であって、複視、不眠、下痢、記憶力低下などを訴え会話速度が遅延していた。これらの症状は数週間ないし数ヶ月後には消褪した。これらの症例から慢性塩化メチル中毒では症状が特徴的ではなく、臨床検査や神経学的検査によってもしばしば異常が見い出されず、中毒の診断には暴露歴の解析が有用であることが指摘されている。(文献 2)

<動物試験>

動物試験による報告を次頁に示す。

試験の種類	動物種	投与期間	投与経路	内容	文献番号
単回投与	ラット	1回	吸入	LC ₅₀ =152000mg/m ³ /30分 (72727.3ppm/30分) TCLO=1500ppm/6時間 TCLO=2000ppm/6時間 TCLO=3000ppm/6時間	(文献 8)
				TCLO=1500ppm/6時間	(文献 9)
				LCLO=3000ppm/4時間	(文献 2)
	マウス	1回	吸入	LC ₅₀ =3081.5ppm/7時間	(文献 10)
				LC ₅₀ =3146ppm/7時間	(文献 11)
				TCLO=500ppm/6時間 TCLO=750ppm/6時間	(文献 12)
				LCLO=3146ppm/7時間	(文献 2)
	ネズミ	1回	吸入	LC ₅₀ =6500mg/m ³	(文献 1)
	モルモット	1回	吸入	LC ₅₀ =20000ppm/2時間	(文献 2)
反復投与	ラット	6日間、6時間/日	吸入	2000ppm ・50%が15日以内に死亡	(文献 13)
		9日間 (12日間試験) 6時間/日	吸入	2000ppm～5000ppm ・肝臓、腎臓、小脳に変性および精巣、精細管、精巣上体の変性	(文献 14)
	F344	12週間(繁殖試験)	吸入	150、475、1500ppm ・0～10週、5日間/週、6時間/日 ・475ppm :雌雄で57日で体重増加抑制 ・1500ppm:雌雄で2週間で10～20%の体重抑制 ・11～12週、7日間/週、6時間/日 ・1500ppm:雄で左右精巣の重度の変性と精巣上体の肉芽腫	(文献 15)
		24ヶ月、5日間、6時間/日	吸入	50、225、1000ppm ・225ppm :雌で24週間体重増加抑制 ・1000ppm:雌雄で24週間体重増加抑制、 脳の実重量減少 雄で精巣の精細管の両側性の 慢性の変性と萎縮 雌で心臓の体重比増加	(文献 16)
	マウス	6日間、6時間/日	吸入	2000ppm ・50%が3日以内に死亡	(文献 13)
		12日間、6時間/日	吸入	500～2000ppm ・肝臓、腎臓、小脳に変性	(文献 14)

試験の種類	動物種	投与期間	投与経路	内容	文献番号
	マウス C57BL/6	11日間、 5.5時間/日	吸入	雌の15、50、100、150、200ppm ・50ppm :影響なし ・100ppm:小脳の顆粒細胞層の変性	(文献 17)
	C57BL/6	11日間、 5.5時間/日	吸入	雌の150、400、800、1600、2400ppm ・150ppm :影響なし ・400ppm :小脳の顆粒細胞層の変性 ・2400ppm:小脳の変性に加え、腎臓と造血作用への影響、血色素尿症	(文献 17)
	B6C3F ₁	24ヶ月、5日間、 6時間/日	吸入	50、225、1000ppm ・1000ppm:雌雄で心臓の体重比増加、脳の実重量減少、脾臓のリンパ球の減少と萎縮、小脳の顆粒細胞層の変性と萎縮 雄で18週間体重増加抑制、肝細胞の変性、空胞化、巨核化、巨大化、多角化、腎腫瘍の増加、腎細尿管上皮の過形成と巨大化	(文献 16)

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

2 週 間 試 験 : P91031

13 週 間 試 験 : 83610

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

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した塩化メチルは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、計算値、及び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、2週間試験は Appendix A 6-1、13週間試験は Appendix B 11-1 に示した。

I - 2 - 2 安定性

被験物質として使用した塩化メチルは各ロット毎に使用開始前時及びその使用終了時に、赤外吸収スペクトル測定、ガスクロマトグラフィーを実施し、安定であることを確認した。なお、それらの結果について、2週間試験は Appendix A 6-2、13週間試験は Appendix B 11-2 に示した。

I - 3 試験動物

動物は2週間試験、13週間試験ともに日本チャールス・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。

2週間試験では、ラット、マウスとも雌雄各72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60匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:111~136g、雌:95~109g/マウス雄:19.6~24.7g、雌:17.0~20.1g)を選別し、試験に供した。

13週間試験では、ラット、マウスとも雌雄各72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60匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:117~136g、雌:97~108g/マウス雄:21.8~25.6g、雌:16.9~20.6g)を選別し、試験に供した。

なお、F344/DuCrj(Fischer)ラット及びCrj:BDF₁マウスを選択した理由は、当該動物をがん原性試験において使用することが決定していたことによる。

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

2週間試験、13週間試験において、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に設定濃度の塩化メチルのガスを送り込み、全身暴露する事により行った。

各試験における投与期間及び暴露回数は以下の通りである。

2週間試験・・・6時間/日，5日/週，10回/2週間

13週間試験・・・6時間/日，5日/週

ラット：64回/13週間

マウス：63回/13週間

(祝祭日を除く)

Ⅱ－1－2 投与濃度

2週間試験

2週間試験では、ラット、マウスとも高用量を3000ppmに設定し、それ以下1500ppm、750ppm、380ppm、190ppm(公比2.0)とした。

13週間試験

13週間試験では、ラットで高用量を3000ppmに設定し、それ以下1500ppm、750ppm、380ppm、190ppm(公比2.0)とした。

マウスでは、高用量を1500ppmに設定し、それ以下1000ppm、670ppm、440ppm、300ppm(公比1.5)とした。

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、フローメターによって塩化メチル純ガスと清浄空気とを一定の割合で希釈混合し、その混合ガスを各吸入チャンバーのラインミキサーの上流側に供給した。次に、各吸入チャンバー内の塩化メチル濃度はガスクロマトグラフによる測定値を監視しながら、設定値になるようにその混合ガスの供給流量を調節した。

Ⅱ－１－４ 被験物質の濃度測定

各試験における吸入チャンバー内の塩化メチル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。

2週間試験は、Appendix A 7-1、13週間試験は、Appendix B 12-1 に測定結果を示した。

各試験とも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、2週間試験、13週間試験における結果(平均値±標準偏差)を記述すると、2週間試験のラットでは 3000ppm群:2999.4±27.0ppm、1500ppm群:1506.0±9.7ppm、750ppm群:753.0±7.0ppm、380ppm群:381.8±5.1ppm、190ppm群:189.6±1.9であり、マウスでは 3000ppm群:3040.6±48.1ppm、1500ppm群:1501.3±8.6ppm、750ppm群:750.5±7.1ppm、380ppm群:380.4±2.7ppm、190ppm群:188.6±3.0であり、13週間試験のラットでは 3000ppm群:3001.3±14.2ppm、1500ppm群:1495.8±5.4ppm、750ppm群:748.6±4.6ppm、380ppm群:380.2±1.9ppm、190ppm群:189.7±1.1であり、マウスでは 1500ppm群:1499.8±6.7ppm、1000ppm群:999.1±5.7ppm、670ppm群:669.7±2.8ppm、440ppm群:440.6±1.8ppm、300ppm群:299.3±1.5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 18)

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し、また、ゲージにも検疫、馴化個体番号を付けた。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、他の試験との区別は、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することにより行った。

Ⅱ - 2 - 2 飼育条件

動物は、2週間試験、13週間試験とも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。各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2週間試験は Appendix A 7-2 に、13週間試験は Appendix B 12-2 に示した。各試験とも設定条件の範囲内であった。また、2週間試験、及び13週間試験における馴化期間、観察飼育期間の動物飼育は、温度 $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ (但し、各試験とも検疫期間の動物飼育は、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/時の環境の飼育室で行った。

各試験の検疫期間中は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、ラット：170W×294D×176H mm、マウス：112W×212D×120H 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、ラット：125W×216D×176H mm、マウス：95W×116D×120H mm)、投与期間中は1ケージ当たり1匹の単飼(ステンレス製5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=30KGy-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、2週間試験の塩化メチル暴露中は給餌、給水をしなかった。

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

各試験とも、毎日1回以上、動物の一般状態の観察を行った。

Ⅱ－3－2 体重測定

2週間試験では、0日(投与開始直前)、1日(1週1日)、7日(1週7日)、及び14日(2週7日)、13週間試験では週1回、体重を測定した。

Ⅱ－3－3 摂餌量測定

2週間試験及び13週間試験では週1回、摂餌量を測定した。

Ⅱ－3－4 血液学的検査

各試験とも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、13週間試験の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 C 1 に示した。

Ⅱ－3－5 血液生化学的検査

各試験とも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、13週間試験の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 C 1 に示した。

Ⅱ－3－6 尿検査

13週間試験の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。

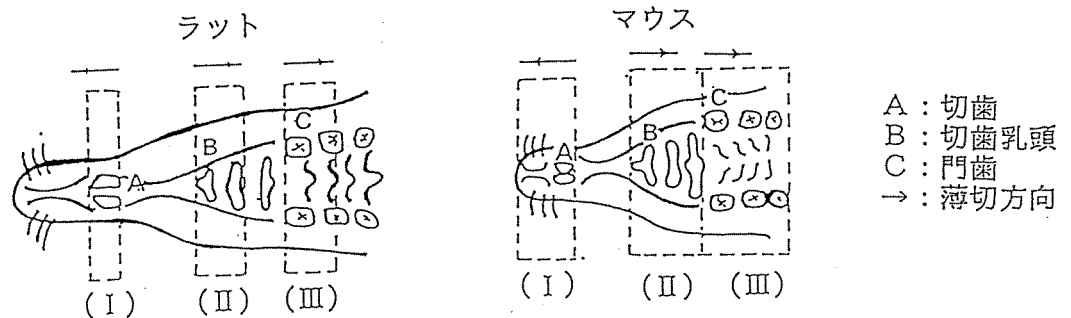
検査項目は Table 1、検査方法は Appendix C 1 に示した。

Ⅱ－3－7 病理学的検査

各試験とも解剖時に全動物について肉眼的に観察を行った。2週間試験では雌雄各群の2例の動物の臓器を、13週間試験では全動物の臓器を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1)、切歯乳頭(レベル2)、第一臼歯の前端(レベル3)の3カ所で切り出し(横断)、検査した。

臓器重量は13週間試験の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。

切出し位置



Ⅱ - 4 数値処理と統計学的方法

(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 C 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。

(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。

(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13週試験では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。

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、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 2週間試験 (試験番号:0174)

(1) 動物の状態観察

動物の死亡は認められなかった。

全投与群において特記すべき所見は認められなかった

体重の推移を Table 2,3 及び Appendix A 2-1,2 に示した。

雌雄とも 3000ppm群で1週7日以後最終計測日(2週7日)まで対照群と比較して体重増加の抑制が認められた。投与期間中、雌雄の 1500ppm以下の群では対照群と比較して顕著な差は認められなかった。最終計測日(2週7日)における各投与群の体重は対照群と比較して、雄では 3000ppm群:83%、1500ppm群:93%、750ppm群:94%、380ppm群:99%、190ppm群:99%、雌では 3000ppm群:91%、1500ppm群:95%、750ppm群:97%、380ppm群:102%、190ppm群:100%であった。

摂餌量(1日1匹当り)を Table 4,5 及び Appendix A 3-1,2 に示した。

雄の 3000ppm群で1週7日に、雌の 3000ppm群で最終計測日(2週7日)に、対照群と比較して低値が認められ、それらの摂餌量は対照群に対して、雌雄とも 3000ppm群:91%であった。

(2) 病理学的検査

剖検

雌雄とも投与群に特徴的な所見、あるいは対照群に比較して顕著に高い発生を示した所見は認められなかった。

病理組織学的検査

定期解剖動物では、各群、雌雄各2例について病理組織学検査を行った。その結果を Appendix A 5-1,2 に示した。

雄

380、3000ppm群に精巣上体の細胞残屑と精子減少、これに加えて 3000ppm群では精巣上体の上皮細胞崩壊が認められた。

雌

3000ppm群に副腎の脂肪変性が認められた。

Ⅲ - 1 - 2 13週間試験 (試験番号:0191)

(1) 動物の状態観察

動物の死亡は、雄の3000ppm群において塩化メチルの投与開始後、13週目に1例認められた。

一般状態の観察結果を Appendix B 1-1,2 に示した。

雄の3000ppm群に自発運動量減少、横臥、瘦削、立毛、異常呼吸、不整呼吸、及び体温低下の所見がみられた。雌の1500ppm以上の群に、尿による外陰部周囲の汚染の所見がみられた。

体重の推移を Table 6,7 及び Appendix B 2-1,2 に示した。

雌雄の750ppm以上の群で対照群と比較して体重増加の抑制が認められ、雄の380ppm群では、13週目に体重増加の抑制が認められた。最終計測日(13週7日)まで生存した動物の体重値は対照群と比較して、雄で3000ppm群:43%、1500ppm群:63%、750ppm群:79%、380ppm群:93%、雌で3000ppm群:52%、1500ppm群:73%、750ppm群:88%であった。

摂餌量(1日1匹当り)を Table 8,9 及び Appendix B 3-1,2 に示した。

雌雄の1500ppm以上の群で対照群と比較して摂餌量の低値が認められ、さらに、投与期間の後半には、雄の750ppm群でも摂餌量の低値が認められた。それらの摂餌量は対照群に対して、雄では、3000ppm群:58~81%、1500ppm群:62~89%、750ppm群:75~87%、雌では、3000ppm群:51~80%、1500ppm群:73~89%であった。

(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

血液学的検査

血液学的検査の結果を Appendix B 4-1,2 に示した。

雄の1500ppm以上の群で赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少、血小板数の増加が認められ、3000ppm群ではM C Vの増加、M C H C減少が認められた。

雌の1500ppm以上の群でヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少が認められ、これに加えて3000ppm群では赤血球数及びM C H Cの減少が認められた。

その他、雌の3000ppm群で好酸球比の減少がみられたが、投与量に対応した変化ではなかった。また、M C Hは、雄の3000ppm群で増加、雌の1500ppm以上の群では減少と雌雄で相反する結果を示した。したがって、これらの変化はいずれも被験物質による影響とは考えられなかった。

血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix B 5-1,2 に示した。

雄の 750ppm以上の群でクレアチニンの減少、1500ppm以上の群でアルブミン、A/G比、総コレステロール及びリン脂質の増加、グルコースの減少、C P K活性の低下が認められ、これに加えて 3000ppm群ではトリグリセライドの減少、ナトリウム、カリウム、及びクロールの増加が認められた。

雌の 1500ppm以上の群で総コレステロール、リン脂質及びカリウムの増加が認められ、これに加えて 3000ppm群ではA/G比及びナトリウムの増加、L D H、A L P及びγ-G T P活性の上昇、クレアチニンの減少が認められた。

その他、雄の 1500ppm群でG O T、G P T及びA L P活性の低下、雌の 1500ppm群でG O T活性の低下がみられたが、いずれも投与量に対応した変化ではなく、被験物質による影響とは考えられなかった。

尿検査

尿検査の結果を Appendix B 6-1,2 に示した。

雌の 3000ppm群で蛋白の陽性度の増加及びケトン体の陽性例の増加がみられた。

その他には特に変化は認められなかった。

(3) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix B 7-1~3 に示した。

死亡/瀕死動物(3000ppm群:雄1例)に、胸腺の萎縮と赤色化が認められた。

定期解剖動物では、雄の 3000ppm群に肺の赤色化が認められた。雌では、投与群に特徴的な所見、あるいは対照群に比較して顕著に高い発生を示した所見は認められなかった。

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 B 8-1,2 (実重量)、Appendix B 9-1,2 (体重比) に示した。

1500ppm以上の群で雄の精巣の実重量と体重比の低値、雌の卵巣の実重量と体重比の低値が認められた。

その他、実重量では、雄の 750ppm以上と雌の 1500ppm以上の群に脳、胸

腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓あるいは副腎の低値、体重比では、雌雄の 750ppm以上の群に脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓あるいは副腎の高値が認められたが、体重増加の抑制による影響と考えられた。

病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を Appendix B 10-1,2 に示した。

雄

死亡／瀕死動物（3000ppm:雄1例）に、肝臓の巣状壊死、精巣の萎縮、精巣上体の精子減少、及び脳（小脳）の顆粒細胞変性が認められた。

定期解剖動物では、1500ppm以上の群に副腎の脂肪変性、腎臓の好酸体の出現の減少、精巣上体の精子減少、精巣の萎縮と浮腫、これに加えて3000ppm群には脳（小脳）の顆粒細胞変性が認められた。

雌

定期解剖動物では、750ppm以上の群に副腎の脂肪変性（3000ppm群:10/10例、1500ppm群:9/10例、750ppm群:1/10例）が認められた。

Ⅲ - 2 マウスを用いた試験

Ⅲ - 2 - 1 2週間試験 (試験番号: 0 1 7 5)

(1) 動物の状態観察

動物の死亡は、雌雄の 3000ppm群、及び雄の 1500ppm群に認められ、雄では 3000ppm群:10/10例(1週1日:2例、1週2日8例—合計10例)、1500ppm群:1/10例(1週3日)、雌では 3000ppm群:10/10例(1週4日:2例、1週5日:7例、1週6日:1例—合計10例)が死亡した。また、雄の対照群で1例が事故(2週2日吸入チャンバーの気液分離装置水槽へ転落)により死亡した。

一般状態の観察結果を Appendix A 1-1,2 に示した。

雄の 190ppm群、及び 750ppm以上の群に立毛、これに加えて 1500ppm以上の群では自発運動量減少、異常呼吸、及び不整呼吸の所見がみられた。

雌の 3000ppm群に自発運動量減少、立毛、異常呼吸、不整呼吸、呼吸緩徐、深呼吸、血尿、赤色尿、体温低下、及び円背位の所見がみられた。

体重の推移を Table 10,11 及び Appendix A 2-3,4 に示した。

雌雄の 3000ppm群では最終計測値(2週7日)まで生存した動物はいなかったが、雄の 3000ppm群、1500ppm群、雌の 3000ppm群で1週1日に体重の低下、もしくは対照群と比較して体重増加の抑制が認められた。雌の 1500ppm群では1週7日以後、最終計測日(2週7日)まで継続して体重増加の抑制がみられた。投与期間中、雌雄の 750ppm以下の群では対照群と比較して顕著な差は認められなかった。最終計測日(2週7日)における各投与群の体重は対照群と比較して、雄では 1500ppm群:94%、750ppm群:98%、380ppm群:99%、190ppm群:99%、雌では 1500ppm群:96%、750ppm群:100%、380ppm群:101%、190ppm群:102%であった。

摂餌量(1日1匹当り)を Table 12,13 及び Appendix A 3-3,4 に示した。

雄の 1500ppm群に、1週7日に対照群と比較して低値が認められ、その摂餌量は対照群に対して83%であった。最終計測日(2週7日)では各投与群とも対照群と比較して顕著な差は認められなかった。

(2) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix A 4-1～3 に示した。

死亡動物では、雄の 3000ppm群に肺の赤色化と赤色斑が認められた。雌では著変を認めなかった。

定期解剖動物では、雄の 1500ppm群に肝臓の白色斑と白色点が認められた。雌では、投与群に特徴的な所見、あるいは対照群と比較して顕著に高い発生を示した所見は認められなかった。

病理組織学的検査

死亡／瀕死動物では、雄3例（3000ppm群:2例、1500ppm群:1例）、雌2例（3000ppm群:2例）、定期解剖動物では、3000ppm群を除く各群、雌雄各2例について病理組織学検査を行った。その結果を Appendix A 5-3～6 に示した。

雄

死亡動物では、3000ppm群に肝臓の中心性壊死、唾液腺の腫脹、胸腺の萎縮と核崩壊、1500ppm群にはこれに加えて心臓の壊死と胃の出血が認められた。なお、死因は肝臓の病変であった。

定期解剖動物では、1500ppm群に肝臓の単細胞壊死と腎臓の好塩基性変化が認められた。

雌

死亡動物では、腎臓の尿細管壊死、肺の浮腫、胸腺と脾臓の萎縮、唾液腺の腫脹、前胃の糜爛、肝臓の中心性壊死、及び副腎のX域細胞崩壊の所見が認められた。なお、死因は腎臓の病変であった。

定期解剖動物では、1500ppm群に腎臓の好塩基性変化が認められた。

Ⅲ - 2 - 2 13週間試験 (試験番号:0 1 9 2)

(1) 動物の状態観察

動物の死亡は、雌雄の 1000ppm以上の群に認められ、雄では 1000ppm群:2/10例(11週:2例)、1500ppm群:10/10例(1週:4例、6週:1例、9週:1例、10週:4例—合計10例)、雌では 1000ppm群:1/10例(11週:1例)、1500ppm群:10/10例(8週:1例、9週:1例、10週:6例、11週:2例—合計10例)が死亡した。また、雌の対照群のうち2例が事故(14週、吸入チャンバーの気液分離装置水槽へ転落)より死亡した。

一般状態の観察結果を Appendix B 1-3,4 に示した。

雄の 1500ppm群に円背位、立毛、異常呼吸、及び不整呼吸の所見が認められた。雌の 1500ppm群に異常呼吸と不整呼吸の所見が認められた。

体重の推移を Table 14,15 及び Appendix B 2-3,4 に示した。

雌雄の 670ppm以上の群で対照群と比較して体重増加の抑制が認められ、さらに、投与期間の初期以降には、全投与群について体重増加の抑制がみられた。最終計測日(13週7日)まで生存した動物の体重値は対照群に対して、雄で 1000ppm群:73%、670ppm群:75%、440ppm群:80%、300ppm群:84%、雌で 1000ppm群:87%、670ppm群:89%、440ppm群:92%、300ppm群:94%であった。また、1500ppm群では、最終計測日(13週7日)まで生存した動物はいなかったが、生存中は引き続いて対照群と比較して体重増加の抑制が認められた。

摂餌量(1日1匹当り)を Table 16,17 及び Appendix B 3-3,4 に示した。

雌雄の 670ppm以上の群で投与初期に対照群と比較して摂餌量の低値が認められた。また、雌雄の 1500ppm群においては、最終計測日(13週7日)まで生存した動物はいなかったが、生存中、雄では対照群と比較して高値が認められた。

(2) 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

血液学的検査

血液学的検査の結果を Appendix B 4-3,4 に示した。

雄の 670、1000ppm群で赤血球数の減少、M C V 及び M C H の増加、1000ppm群で血小板数の増加が認められた。

雌の各投与群で M C V の増加、これに加えて 1000ppm群では血小板数の増加が認められた。

血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Appendix B 5-3,4 に示した。

雄の各投与群でグルコース及びトリグリセライドの減少が認められ、これに加えて 670、1000ppm群ではアルブミン、A/G比の増加、及びALP活性の上昇が認められた。

雌の各投与群で総コレステロールの増加、これに加えて 1000ppm群ではA/G比の増加が認められた。

その他、雄の 300ppm群でCPK活性の低下、440ppm群で尿素窒素の増加がみられたが、投与量に対応した変化ではなく、被験物質による影響とは考えられなかった。

尿検査

尿検査の結果を Appendix B 6-3,4 に示した。

雌雄ともに、特に変化は認められなかった。

(3) 病理学的検査

剖検

解剖時に観察された剖検所見を Appendix B 7-4~6 に示した。

死亡/瀕死動物では、雄の 1500ppm群に肺の赤色斑と肝臓の白色斑が認められた。雌では、著変が認められなかった。

定期解剖動物では、雌雄とも投与群に特徴的な所見、あるいは対照群に比較して顕著に高い発生を示した所見は認められなかった。

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 B 8-3,4 (実重量)、B 9-3,4 (体重比) に示した。

実重量では、雄の 670ppm以上の群に肝臓、1000ppm群に脳、雌の 300ppm以上の群に心臓、440ppm以上の群に脳、670ppm群に腎臓、さらに、1000ppm群に脾臓の低値が認められた。

体重比では、雄の各投与群に心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、440ppm以上の群に脳、440、670ppm群に精巣の高値、雌の各投与群に肝臓、670ppm以上の群に胸腺、1000ppm群に腎臓の高値が認められたが、体重増加の抑制による影響と考えられた。

病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を Appendix B 10-4～6 に示した。

雄

死亡／瀕死動物では、1500ppm群に肝臓の中心性壊死、石灰沈着、及び中心性の空胞変性、腎臓の尿細管壊死が認められた。

定期解剖動物では、1000ppm群に肝臓の中心性の空胞変性が認められた。

雌

死亡／瀕死動物に著変を認めなかった。定期解剖動物では投与群に特徴的な所見、あるいは対照群に比較して顕著に高い発生を示した所見は認められなかった。

IV 考察及びまとめ

ーラットー

< 2 週間試験 >

ラットの2週間試験の結果、全投与群とも死亡はみられなかった。高用量の3000ppm群で、雌雄とも対照群と比較して体重増加の抑制（最終体重は雄:83%、雌:91%）、摂餌量で雌に低値、病理組織学的に雄の精巣上体、雌の副腎に変化が観察されたが軽度なものであった。1500ppm以下の群では、体重、摂餌量とも対照群と比較して有意な差は認められず、病理組織学的に雄の380ppm群に精巣上体の軽度な変化が観察されたほかは著変を認めなかった。

これらの結果から、13週間試験の投与濃度を設定するに当たり、3000ppm群での体重増加の抑制率を指標として、高用量を3000ppmとしても、13週間の連続投与に耐え得るものと考えられること、また、低用量の190ppmでは13週間試験でも変化のする可能性が少ないであろうことを考慮にいれ、13週間試験の投与濃度は2週間試験の投与濃度と同等とし、高用量を3000ppmとし、以下、1500ppm、750ppm、380ppm、190ppm（公比2.0、1の位四捨五入）と設定した。

< 13 週間試験 >

13週間試験の結果、雄の3000ppm群において死亡が1例みられた。1500ppm以上の群で、雌雄とも対照群と比較して体重増加の抑制（最終体重は3000ppm群:雄43%、雌52%、1500ppm群:雄63%、雌73%）と摂餌量の低値、雄の精巣、及び雌の卵巣の実重量と体重比の低値が認められ、病理組織学的には、雄に副腎、腎臓、精巣、精巣上体の変化（3000ppm群ではこれに加えて小脳の変化）、雌に副腎の変化が観察された。臨床検査では、雄の1500ppm以上の群に血液学的検査で貧血傾向、血液生化学的検査で、雌の3000ppm群に尿蛋白の陽性度の変化や、ケトン体陽性例の増加がみられた。750ppm群では、体重増加の抑制（最終体重は雄79%、雌88%）、不連続ではあるが摂餌量の低値、病理組織学的に雌で副腎の変化、血液生化学的検査で雄にクレアチニンの減少がみられたが、380ppm以下の群では、雄の体重増加の抑制（最終体重は93%）の他、著変を認めなかった。

以上の結果より、1500ppm以上の群では、対照群に比べ体重増加の抑制も著しく、病理学的検査でも致死的とはいえないものの、明かな変化を認め、2年間の反復投与には耐えられないと考えられた。しかし、750ppm群では対

照群に比べ体重増加の抑制、病理組織学的検査で雌に1例副腎の変化がみられたものの、その他において、生存に影響をおよぼすような明らかな変化は認められなかった。また、Paukovらは、F344ラットを用いて2年間の反復投与試験の結果、1000ppm群で、投与開始以後24週間の体重増加の抑制、及び精巣の変化が認められたが、定期解剖時までの動物の生存率は高かったと報告している(文献 16)。そこで、がん原性試験の高用量は、明かな影響がみられた 1500ppmと体重増加の抑制はみられたものの、わずかな変化しか示さなかった 750ppmの間である 1000ppmが適当であると判断した。また、低用量については、日本産業衛生学会、及びACGIHによる許容濃度は 50 ppmであり、これを低用量とする意義は十分にあるものと判断した。以上の事から、ラットのがん原性試験の用量を 1000ppm、224ppm、50ppm (公比 4.48、有効桁数3桁) に設定した。

－ マウス －

< 2 週間試験 >

マウスの2週間試験の結果、高用量の 3000ppm群で雌雄とも10/10例、雄の 1500ppm群で1/10例の死亡がみられた。なお、雄の死因は肝臓の病変、雌の死因は腎臓の病変と考えられた。定期解剖動物についても 1500ppm群では雌に体重増加の抑制、病理学的検査には、雄に肝臓と腎臓の変化、雌に腎臓の変化が認められ、これらの変化は重篤なものではなかった。750ppm以下の群では、雌雄とも対照群と比較して、著変を認めなかった。

これらの結果から、13週間試験の投与濃度を設定するにあたり 1500ppm群では体重増加の抑制率、摂餌量の低下率が深刻ではなく、さらに病理組織学的にも変化が重度なものではないこと、750ppm以下の群では何の変化もみられなかった為に、750～1500ppm間の動物の変化を観察する必要性が生じたこと、これに加えて、マウスはラットに比べ塩化メチルに関して感受性が高いことがわかり、公比を小さくすべきであることを考慮に入れ、高用量を1500ppmとし、以下、1000ppm、670ppm、440ppm、300ppm (公比 1.5、1の位四捨五入) と設定した。

< 13 週間試験 >

13週間試験の結果、高用量の 1500ppm群で雌雄とも10/10例、1000ppm群の雄で2/10例、雌で1/10例の死亡がみられ、病理組織学的には雄に肝臓と腎臓の変化が観察された。定期解剖動物についても 1000ppm群では雌雄とも対照群と比較して体重増加の抑制が認められ、病理組織学的には雄の肝

臓に変化が観察された。さらに、臨床検査では血液学的に血小板数の増加等変化、血液生化学的に雄に体重増加の抑制による変化と雌にA/G比、ALP活性の上昇等の変化が認められた。670ppm群では雌雄とも体重増加の抑制（最終体重は雄75%、雌89%）、臨床検査では血液学的にMCVの増加等変化、血液生化学的に雄のアルブミンの増加等変化が認められた。440ppm以下の群では、体重増加の抑制（最終体重は440ppm群：雄80%、雌92%、300ppm群：雄84%、雌94%）の他、著変は認めなかった。

以上の結果より、1000ppm群では雄に2例、雌に1例の死亡、対照群と比較して体重増加の抑制、また、病理組織学的にも雄の肝臓に明らかな変化を認めた。しかし、670ppm群では死亡はみられず、体重増加の抑制、臨床検査値の変化は認められたものの、病理組織学的変化等明らかな変化は認められなかった。また、Paukovらは、B6C3F₁マウスを用いた2年間の反復投与試験の結果、1000ppmでは雄で投与開始後、18週間の体重増加の抑制、肝臓の変化及び腎腫瘍増加、雌雄で脾臓及び小脳に変化が認められたが、定期解剖時までの動物の生存率は低かったと報告している（文献16）。そこで、がん原性試験の高用量は、死亡を含む明かな影響がみられた1000ppmと体重増加の抑制はみられたものの病理組織学的検査で明かな障害を示さなかった670ppmの中間値をとり800ppmが適当であると判断した。さらに、ラットと同様、低用量は許容濃度である50ppmとした。以上の事から、マウスのがん原性試験の用量を800ppm、200ppm、50ppm（公比4.0）に設定した。

V 文献

1. 浅原照三、戸倉仁一郎、大河原信、熊野谿従、妹尾学 編(1980)
溶剤ハンドブック(第3刷)
pp.244-245, 講談社, 東京.
2. 後藤 稔、池田正之、原 一郎 編(1982)
産業中毒便覧(増補版)
pp.569-570, 医歯薬出版, 東京.
3. 化学工業日報社(1990)
11290の化学商品
pp.671-672, 化学工業日報社, 東京.
4. 化学工業日報社(1991)
11691の化学商品
pp.698, 化学工業日報社, 東京.
5. 化学工業日報社(1993)
12093の化学商品
pp.717-718, 化学工業日報社, 東京.
6. 日本産業衛生学会(1992)
許容濃度の勧告(1992)
産業医学, 34, 370
7. American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
ACGIH化学物質と物理因子のTLV化学物質のBEI(1991~1992年度使用)
日測協資料 No.30, pp.24, 日本作業環境測定協会.
8. Sweet, D.V(ed)(1987)
Registry of Toxic Effects of Chemical Substance(1985-1986)
Vol.3A, pp.107
NIOSH, U.S.Dept. Health and Human Services, Washington, D.C.
9. Wolkowski-Tyl, R., Phelps, M. and Davis, J.K. (1983)
Structural teratogenicity evaluation of methyl chloride in
rats and mice after inhalation exposure
Teratology 27, 181-195

10. von Oettingen, W. F., Powell, C. C., Sharpless, N. E., Alford, W. C. and Pecora, L. J. (1950)
Comparative studies of the toxicity and pharmacodynamic action of chlorinated methanes with special reference to their physical and chemical characteristics
Arch. int. Pharmacodyn., 81, 17-34
11. von Oettingen, W. F., Powell, C. C., Sharpless, N. E., Alford, W. C. and Pecora, L. J. (1949)
Relation between the toxic action of chlorinated methanes and their chemical and physicochemical properties
National Institutes of Health Bulletin, No. 191, pp. 1-85
12. Wolkowski-Tyl, R., Lawton, A. D., Phelps, M. and Hamm, T. E., Jr. (1983)
Evaluation of heart malformations in $B_6C_3F_1$ mouse fetuses induced by in utero exposure to methyl chloride
Teratology, 27, 197-206
13. Smith, W. W. and von Oettingen, W. F. (1947)
The acute and chronic toxicity of methyl chloride
Journal of Industrial Hygiene and Toxicology, 29, 47-52
14. Morgan, K. T., Swenberg, J. A., Hamm, T. E., Jr., Wolkowski-Tyl, R. and Phelps, M. (1982)
Histopathology of acute toxic response in rats and mice exposed to methyl chloride by inhalation
Fundamental and Applied Toxicology, 2, 293-299
15. Hamm, T. E., Jr., Raynor, T. H., Phelps, M. C., Auman, C. D., Adams, W. T., Proctor, J. E. and Wolkowski-Tyl, R. (1985)
Reproduction in Fischer-344 rats exposed to methyl chloride by inhalation for two generations
Fundamental and Applied Toxicology, 5, 568-577
16. Paukov, K. L., Kerns, W. D., Chrisp, C. E., Thake, D. C., Persing, R. L., Harroff, H. H. and Gralla, E. J. (1982)
Major findings in a twenty-four month inhalation toxicity study of methyl chloride in mice and rats
Toxicologist, 2(1), A566. [Abstract]

17. Landry, T. D., Quast, J. F., Gushow, T. S. and Mattsson, J. L. (1985)
Neurotoxicity of methyl chloride in continuously versus
intermittently exposed female C57BL/6 mice
Fundamental and Applied Toxicology, 5, 87-98
18. 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
適正層別方式の確立
薬理と治療, 14, 7285-7302