

N,N-ジメチルホルムアミドのマウスを用いた
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0297

CAS No. 68-12-2

2000年12月21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

N,N-ジメチルホルムアミドのマウスを用いた
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0297

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

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	7
II-3-2	体重測定	7
II-3-3	摂餌量測定	8
II-3-4	血液学的検査	8
II-3-5	血液生化学的検査	8
II-3-6	尿検査	8
II-3-7	病理学的検査	8
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	9
II-4-2	母数の取り扱い	9
II-4-3	統計処理	10
II-5	試資料の保管	10
III	試験成績	
III-1	生死状況	11
III-2	一般状態	11
III-3	体重	11
III-4	摂餌量	12
III-5	血液学的検査	12
III-6	血液生化学的検査	12
III-7	尿検査	13
III-8	病理学的検査	
III-8-1	剖検	13
III-8-2	臓器重量	13
III-8-3	病理組織学的検査	14
III-8-4	死因	16

IV 考察及びまとめ

IV-1 生死状況、死因、一般状態、体重、摂餌量	17
--------------------------------	----

IV-2 腫瘍性病変	17
------------------	----

IV-3 非腫瘍性病変	20
-------------------	----

IV-4 血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査	21
--------------------------------	----

IV-5 他の文献との比較	21
---------------------	----

V 結論	23
------------	----

VI 文献	24
-------------	----

TABLES

- TABLE 1 EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE
- TABLE 2 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE
- TABLE 3 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE
- TABLE 4 INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE
- TABLE 5 INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE
- TABLE 6 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE
- TABLE 7 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE
- TABLE 8 NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS IN MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE
- TABLE 9 NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS IN FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE

TABLES (CONTINUED)

TABLE 10 SELECTED NON NEOPLASTIC LESIONS OF MALE MICE IN
 THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE

TABLE 11 SELECTED NON NEOPLASTIC LESIONS OF FEMALE MICE IN
 THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE

TABLE 12 CAUSE OF DEATH OF MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF
 N,N-DIMETHYLFORMAMIDE

FIGURES

FIGURE 1 *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE VAPOR GENERATION SYSTEM AND INHALATION SYSTEM

FIGURE 2 SURVIVAL ANIMAL RATE OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE

FIGURE 3 SURVIVAL ANIMAL RATE OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE

FIGURE 4 BODY WEIGHT CHANGES OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE

FIGURE 5 BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE

FIGURE 6 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE

FIGURE 7 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE

PHOTOGRAPHS

- PHOTOGRAPH 1 LIVER : HEPATOCELLULAR ADENOMA
MALE, 200ppm, ANIMAL No. 0297-1131 (H&E)
- PHOTOGRAPH 2 LIVER : HEPATOCELLULAR ADENOMA
HIGHER MAGNIFICATION OF PHOTOGRAPH 1
- PHOTOGRAPH 3 LIVER : HEPATOCELLULAR CARCINOMA
MALE, 400ppm, ANIMAL No. 0297-1218 (H&E)
- PHOTOGRAPH 4 LIVER : HEPATOCELLULAR CARCINOMA
HIGHER MAGNIFICATION OF PHOTOGRAPH 3
- PHOTOGRAPH 5 LIVER : HEPATOBLASTOMA
MALE, 800ppm, ANIMAL No. 0297-1308 (H&E)
- PHOTOGRAPH 6 LIVER : HEPATOBLASTOMA
HIGHER MAGNIFICATION OF PHOTOGRAPH 5
- PHOTOGRAPH 7 LIVER : CLEAR CELL FOCUS
MALE, 200ppm, ANIMAL No. 0297-1107 (H&E)
- PHOTOGRAPH 8 LIVER : ACIDPHYLIC CELL FOCUS
MALE, 200ppm, ANIMAL No. 0297-1131 (H&E)
- PHOTOGRAPH 9 LIVER : SWELLING:CENTRAL
MALE, 800ppm, ANIMAL No. 0297-1315 (H&E)
- PHOTOGRAPH 10 LIVER : SINGLE CELL NECROSIS (A)
INFLAMMATORY CELL INFILTRATION (B)
NUCLEAR ENLARGEMENT (C)
MALE, 800ppm, ANIMAL No. 0297-1301 (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(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX K 2 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF
TUMORS-TIME RELATED, MOUSE : FEMALE(2-YEAR STUDY)
- 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 : METASTASIS OF TUMOR :
SUMMARY, MOUSE : MALE : ALL ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX N 2 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR :
SUMMARY, MOUSE : MALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX N 3 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR :
SUMMARY, MOUSE : MALE : SACRIFICED ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX N 4 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR :
SUMMARY, MOUSE : FEMALE : ALL ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX N 5 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR :
SUMMARY,MOUSE:FEMALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX N 6 HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR :
SUMMARY, MOUSE : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX O 1 IDENTITY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE IN THE 2-YEAR
INHALATION STUDY
- APPENDIX O 2 STABILITY OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE IN THE 2-YEAR
INHALATION STUDY
- APPENDIX P 1 CONCENTRATION OF *N,N*-DIMETHYLFORMAMIDE IN THE
INHALATION CHAMBER OF THE 2-YEAR INHALATION STUDY
- APPENDIX P 2 ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF INHALATION CHAMBER
IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF
N,N-DIMETHYLFORMAMIDE

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX Q 1 METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY AND
URINALYSIS IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF
N,N-DIMETHYLFORMAMIDE
- APPENDIX Q 2 UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND
BIOCHEMISTRY IN THE 2-YEAR INHALATION STUDY OF
N,N-DIMETHYLFORMAMIDE

要約

N,N-ジメチルホルムアミド（以下、DMF と記載）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:BDF₁ マウスを用い、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で雌雄各群 50 匹（合計 400 匹）を使用した。投与は DMF を 1 日 6 時間、1 週 5 日間、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 200ppm、400ppm、800ppm とした。また、観察、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。

投与の結果、最終計測週（104 週）における生存率は、雄では投与群と対照群の間に差はなかったが、雌は 400ppm 以上の群で低下した。体重増加の抑制は雄の全投与群と雌の 800ppm 群にみられた。病理組織学的検査では肝臓の肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫の発生増加が雌雄ともに認められた。肺の細気管支-肺胞上皮腺癌の発生減少が雄に、下垂体の腺腫とリンパ節の悪性リンパ腫の発生減少が雌に認められた。非腫瘍性病変は、肝臓腫瘍の前腫瘍性変化と考えられる肝臓の好酸性小増殖巣の増加が雌雄に、明細胞性小増殖巣の増加が雄に認められた。さらに、雄には中心性の腫脹と核異型、単細胞壊死及び炎症性細胞集簇の増加が全投与群、雌には中心性の腫脹の増加が 200ppm 群と 800ppm 群、中心性の核異型の増加が 800ppm 群で認められた。その他、鼻腔、下垂体、副腎及び脾臓に変化がみられた。

以上のように、DMF の投与により、雌雄ともに肝臓の肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫の発生増加が認められ、この結果は DMF の Crj:BDF₁ マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。

N,N-ジメチルホルムアミドのがん原性試験における主な腫瘍発生 (マウス：雄)

	投 与 濃 度 (ppm)		0	200	400	800	ヘト- 検定	コラ アミテ-ジ 検定
	検 査 動 物 数		50	50	49	50		
良性腫瘍	肺	細気管支-肺胞上皮腫	2	7	4	7		
	肝臓	肝細胞腺腫	6	36**	41**	41**	↑ ↑	↑ ↑
悪性腫瘍	リンパ節	悪性リンパ腫	4	4	7	4		
	脾臓	血管肉腫	3	1	0	1		
	肝臓	肝細胞癌	2	12**	16**	16**	↑ ↑	↑ ↑
	肝臓	肝芽腫	0	13**	7**	4		
	肺	細気管支-肺胞上皮癌	8	6	3	2*		↓
	肝臓	肝細胞腺腫/肝細胞癌/肝芽腫	8	42**	46**	44**	↑ ↑	↑ ↑

N,N-ジメチルホルムアミドのがん原性試験における主な腫瘍発生 (マウス：雌)

	投 与 濃 度 (ppm)		0	200	400	800	ヘト- 検定	コラ アミテ-ジ 検定
	検 査 動 物 数		49	50	50	49		
良性腫瘍	皮下組織	血管腫	0	3	1	0		
	肝臓	血管腫	2	0	0	3		
	肝臓	肝細胞腺腫	1	42**	47**	48**	↑ ↑	↑ ↑
	下垂体	腺腫	7	9	6	0**		↓ ↓
	ハート腺	腺腫	1	4	1	1		
悪性腫瘍	脾臓	血管肉腫	1	0	3	3		
	肝臓	肝細胞癌	3	25**	32**	35**	↑ ↑	↑ ↑
	肝臓	肝芽腫	0	0	4	0		
	リンパ節	悪性リンパ腫	13	9	7	3**		↓ ↓
	全臓器	悪性リンパ腫	15	12	9	3**		↓ ↓
	肝臓	肝細胞腺腫/肝細胞癌/肝芽腫	3	45**	49**	49**	↑ ↑	↑ ↑

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

*:有意水準5%以下で有意

**:有意水準1%以下で有意 (フィッシャー検定)

↑:有意水準5%以下で有意増加

↑↑:有意水準1%以下で有意増加 (ヘト-、コラアミテ-ジ検定)

↓:有意水準5%以下で有意減少

↓↓:有意水準1%以下で有意減少 (コラアミテ-ジ検定)

I 試験材料

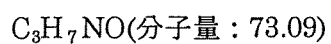
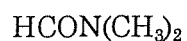
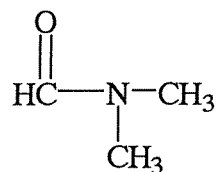
I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称

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

CAS No. : 68-12-2

I-1-2 構造式、示性式、分子量



I-1-3 物理化学的性状等

性 状 : 微アミン臭をもつ揮発性の無色透明の液体

沸 点 : 153°C (760 Torr)

融 点 : < -61°C

比 重 : 0.95 (20°C)

蒸 気 圧 : 356 Pa (20°C)

溶 解 性 : 水には溶解、各種有機溶剤に可溶

保存条件 : 室温、遮光条件下で気密容器に保管

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号：SKH4945（1995年11月14日～1996年10月30日）

LEK4984（1996年10月31日～1997年10月22日）

WTL5167（1997年10月23日～1997年11月10日）

製造元：和光純薬工業株式会社

グレード：和光特級

純度：99.8%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

被験物質の同一性は、ロットごとにマススペクトル、赤外吸収スペクトルの測定を実施した。測定した被験物質のマススペクトル及び赤外吸収スペクトルはそれぞれの文献値（文献1, 2）と比較し、被験物質の特性・同一性を確認した。なお、それらの結果については、APPENDIX O 1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質の安定性は、ロットごとに使用開始前及び使用終了後にガスクロマトグラフ分析を実施し、それぞれのデータを比較することにより確認した。なお、それらの結果については、APPENDIX O 2 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）の Crj:BDF1 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（導入時体重範囲、雄:13.3～19.1g、雌:11.6～19.2 g）、各 1 週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で一般状態の観察所見に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 200 匹（群構成時体重範囲、雄:21.2～24.0g、雌:17.4～20.1g）を選別し、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。すなわち吸入チャンバー内に設定濃度に調整した DMF を含む新鮮空気を送り込み、試験動物に全身暴露した。投与期間は 104 週間とし、1 日 6 時間、1 週 5 日間（祝祭日を除く）、暴露を行った。なお、対照群の動物には新鮮空気のみを暴露した。

投与期間中の総暴露回数は 104 週間で 488 回であった。

II-1-2 投与濃度及びその設定理由

13 週間試験（試験番号：0276）の結果（文献 3）、雌雄とも死亡はみられず、800ppm 群で雌雄ともに体重増加の抑制、肝臓の重量増加及び肝臓の単細胞壊死や中心性腫脹などが認められ、投与の影響はおもに 800ppm の肝臓にみられた。しかし、肝臓は障害に対して自己再生能の高い臓器であることから、800ppm の濃度でも 2 年間の投与に耐える可能性が高いと考えられた。また、Malley ら（文献 4）は 400ppm の濃度で 18 ヶ月間の実験を行っており、生存数や一般症状に対する影響がなく、腫瘍の発生がないという報告をしている。これらのことを考慮し、がん原性試験の設定濃度は、雌雄とも最高濃度を 800ppm とし、以下 400ppm、200ppm（公比 2）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 に示した。各設定濃度のうち 200ppm と 400ppm を発生する際は、発生容器内の DMF を循環式恒温槽で加熱（50℃）しながら、加熱（40℃）した清浄空気のパブリングにより蒸発させた。800ppm を発生する際は、発生容器内の DMF を循環式恒温槽で加熱（50℃）しながら、加熱（40℃）した清浄空気により噴霧ノズルで発生容器内に噴霧し、蒸発させた。蒸発した DMF は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。吸入チャンバー内の DMF の濃度はガスクロマトグラフにより監視しながら、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 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の DMF 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。測定結果を APPENDIX P 1 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、200ppm 群：201.7±5.2ppm、400ppm 群：397.8±7.8ppm、800ppm 群：790.6±18.3ppm であり、各投与群ともに設定濃度に近似した値であった。

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 50 匹の動物を用いた。

群番号	群名称	雄使用動物数（動物番号）	雌使用動物数（動物番号）
0	対照群	50 匹(1001-1050)	50 匹(2001-2050)
1	200ppm 群	50 匹(1101-1150)	50 匹(2101-2150)
2	400ppm 群	50 匹(1201-1250)	50 匹(2201-2250)
3	800ppm 群	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 5）。

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を行い、またケージにも個体識別番号を付けた。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、動物はバリア区域内の独立した室に収容し、各室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他の試験及び異種動物と区別した。

II-2-3 飼育条件

動物は検疫室で 1 週間の検疫飼育を行った後、馴化期間及び投与期間中は、動物を吸入

チャンバー内で飼育した。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、その計測結果を APPENDIX P 2 にそれぞれ示した。吸入チャンバー室の環境条件は、温度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、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、吸入チャンバー内の環境条件は、温度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ 、飼育中換気回数 12 ± 1 回/時、暴露中換気回数 6 ± 0.5 回/時に設定した。その結果、吸入チャンバーの環境はすべて設定条件の範囲内であった。

また、検疫期間中（ステンレス製二連網ケージ、 $112\text{W}\times 212\text{D}\times 120\text{H mm}$ ）、馴化期間中（ステンレス製六連網ケージ、 $95\text{W}\times 116\text{D}\times 120\text{H mm}$ ）、投与期間中（ステンレス製五連網ケージ、 $100\text{W}\times 116\text{D}\times 120\text{H mm}$ ）はいずれも単飼とした。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（ $3\text{Mrad}=30\text{KGy}$ - γ 線照射滅菌飼料）を全飼育期間を通して、固型飼料給餌器により自由摂取させた。

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、紫外線照射し自動給水装置により自由摂取させた。

なお、飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)の自社分析データを、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、また飲料水については(財)食品薬品安全センター（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

投与期間中は毎日 1 回、動物の生死及び瀕死動物を確認した。さらに、一般状態の観察を全動物について週 1 回行った。

II-3-2 体重測定

投与開始 1 週目は 2 回、その後 14 週間までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（104 週にも測定）、体重を測定した。なお、動物の死亡発見時、切迫屠殺時及び定期解剖の搬出時にも体重を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

投与開始後 14 週間は週に 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（104 週にも測定）給餌量と残餌量を測定し、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。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 Q 1 に示した。

II-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より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 Q 1 に示した。

II-3-6 尿検査

投与期間後期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 Q 1 に示した。

II-3-7 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について肉眼観察により剖検した。

(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、定期解剖時の体重に対する百分率（体重比）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がみられた組織を、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。

なお、鼻腔については切歯の後端（第 1 レベル）、切歯乳頭（第 2 レベル）、第一臼歯の前端（第 3 レベル）の 3 ヶ所で切り出し（横断）、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 位までを測定し、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。

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、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 Q 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、欠測となったデータについては母数より除いた。

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、検査不能臓器をもつ動物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 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。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto 検定 (文献 6)、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。

χ^2 検定と Fisher 検定は対照群と各投与群間の検定である。

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、直接死因に係わっていた腫瘍

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 10 年間とする。

III 試験成績

III-1 生死状況

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

雄では、最終計測週（104 週）における生存数（生存率）は、対照群：37/50 例(74.0%)、200ppm 群：33/50 例(66.0%)、400ppm 群：37/49 例(75.5%)、800ppm 群：40/50 例(80.0%)であり、投与群と対照群との間に差はなかった。

雌の最終計測週（104 週）における生存数（生存率）は、対照群：29/49 例(59.2%)、200ppm 群：30/50 例(60.0%)、400ppm 群：21/50 例(42.0%)、800ppm 群：22/49 例(44.9%)であり、400ppm 群と 800ppm 群が対照群に比べて低かった。

なお、雄の 400ppm 群の 1 例（動物番号 0297-1231）及び雌の対照群の 1 例（動物番号 0297-2036）と 800ppm 群の 1 例（動物番号 0297-2321）は事故死亡のため、有効動物数から除いた。

III-2 一般状態

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

投与期間を通しての内部腫瘍の発生動物数は、雄では対照群：10/50 例、200ppm 群：17/50 例、400ppm 群：38/49 例、800ppm 群：44/50 例、雌では対照群：12/49 例、200ppm 群：37/50 例、400ppm 群：46/50 例、800ppm 群：44/49 例であり、雌雄ともに全投与群ではほぼ投与濃度に対応して増加していた。

投与期間を通しての外部腫瘍の発生動物数は、雄では対照群：2/50 例、200ppm 群：4/50 例、400ppm 群：3/49 例、800ppm 群：5/50 例、雌では対照群：2/49 例、200ppm 群：5/50 例、400ppm 群：2/50 例、800ppm 群：2/49 例であり、雌雄ともに投与群と対照群との間に顕著な差がなかった。

その他の一般状態には、雌雄とも投与群と対照群との間に顕著な差を認めなかった。

III-3 体重

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

雄では全投与群で投与濃度に対応した体重増加の抑制がみられた。200ppm 群は全期間を通して低めに推移し、また、400ppm 群は 9 週以降、800ppm 群では全期間を通して対照群と比較して有意な低値で推移した。

雌では 200ppm 群と 400ppm 群は 26 週以降で対照群より低めに推移したが、200ppm 群は最終計測時では対照群と変わらない値であった。また、800ppm 群では 2 週以降の全期間を通して対照群と比較して有意な低値で推移した。

なお、最終計測時の体重は、対照群に対して雄は 200ppm 群：87%、400ppm 群：78%、800ppm 群：70%、雌は 200ppm 群：100%、400ppm 群：95%、800ppm 群：81%であった。

III-4 摂餌量

投与期間中における群別の摂餌量（1 日 1 匹当たりの摂餌量）を TABLE 6, 7、FIGURE 6, 7 及び APPENDIX C 1, 2 に示した。

雄では投与開始から 1 週目に全投与群で摂餌量の有意な低値がみられた。その後、200ppm 群と 400ppm 群は対照群に近い値で推移し、800ppm 群は 2 週及び 5 週から 78 週の期間で低値であった。

雌では投与開始から 1 週目に全投与群で摂餌量の低値がみられた。その後、200ppm 群と 400ppm 群は対照群に近い値で推移したが、400ppm 群では 68 週から 96 週まで対照群と比べ高値であった。800ppm 群では 30 週までと 102 週及び 104 週で低値であった。

III-5 血液学的検査

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

雄では、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCV、MCH、MCHC 及び好酸球比の減少及び血小板数の増加が全投与群に認められた。なお、杆状核好中球比やその他の異常球比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。

雌では、MCV、MCH、MCHC、好酸球比及びリンパ球比の減少及び血小板数の増加が全投与群に、分葉核好中球比の増加が 400ppm 以上の群に認められた。なお、ヘモグロビン濃度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-6 血液生化学的検査

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

雄では、総蛋白、総コレステロール及びカルシウムの増加、GOT 活性、GPT 活性、LDH 活性、ALP 活性及びCPK 活性の上昇ならびにカリウムの減少が全投与群に認められた。また、アルブミンと尿素窒素の増加及びグルコースの減少が 400ppm 以上の群で認められた。さらに、総ビリルビンの増加が 800ppm 群に認められた。その他、トリグリ

セライド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。

雌では、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、総コレステロール、カルシウム及び尿素窒素の増加ならびにGOT活性、GPT活性、LDH活性、ALP活性及びCPK活性の顕著な上昇が全投与群に認められた。また、無機リンの増加とクロールの減少が400ppm以上の群に認められた。

III-7 尿検査

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

雄では、蛋白の陽性度とケトン体の陽性例の減少が400ppm以上の群に認められた。

雌では、蛋白の陽性度の減少とpHの統計的有意差が800ppm群に認められた。

III-8 病理学的検査

III-8-1 剖検

解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX G 1~6 に示した。

雌雄とも、全投与群で多くの動物の肝臓に結節がみられた(雄:対照群;14/50例、200ppm群;44/50例、400ppm群;48/49例、800ppm群;48/50例、雌:対照群;12/49例、200ppm群;46/50例、400ppm群;42/50例、800ppm群;43/49例)。その他、雌の投与群では肝臓の腫大、下垂体の腫大、皮下の腫瘍や浮腫、リンパ節の腫大、脾臓の腫大、卵巢の嚢胞や腫大、腹水及び胸水がみられる動物数が減少していた。

III-8-2 臓器重量

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

雄では肝臓の実重量と体重比が全投与群で顕著な高値を示し、脾臓にも実重量と体重比の高値が全投与群で認められた。なお、心臓、肺、腎臓及び脳の体重比の高値が全投与群で、精巣の体重比の高値が400ppm以上の群、副腎の体重比の高値が800ppm群で認められたが、これらの臓器の実重量は腎臓が800ppm群で低値、副腎と脳が400ppm以上の群で低値を示し、200ppm群の心臓にのみ実重量の高値がみられた。なお、解剖時体重は400ppm以上の群で有意な低値を示し、200ppm群でも統計学的な有意差は認められないものの対照群より低い値であった。

雌でも肝臓の実重量と体重比が全投与群で顕著な高値を示した。また、腎臓と心臓に実重量の高値が200ppm群と400ppm群、体重比の高値が400ppm以上の群で認められた。卵巢には実重量と体重比の低値が400ppm以上の群で認められた(ただし、卵巢腫瘍によ

り極端に重い例があることで 400ppm 群の平均値は高いが、Dunnett 検定では有意な低値である)。副腎は実重量のみの低値が全投与群でみられた。また、肺と脳の体重比の高値が 800ppm 群で認められたが、脳の実重量は 400ppm 以上の群で低値を示していた。なお、解剖時体重は 800ppm 群で有意な低値を示した。

III-8-3 病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果を APPENDIX J 1~6 に示した。腫瘍性病変の結果は APPENDIX K 1, 2 に担腫瘍動物数と腫瘍数、APPENDIX L 1, 2 に腫瘍の種類別の発生数、APPENDIX M 1, 2 に統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定)、APPENDIX N 1~6 に転移性病変について示した。

—主な腫瘍性病変—

主な腫瘍の発生を、TABLE 8, 9 に示した。

<肝臓>

雄の肝細胞腺腫 (対照群: 6/50 例、200ppm 群: 36/50 例、400ppm 群: 41/49 例、800ppm 群: 41/50 例) と肝細胞癌 (対照群: 2/50 例、200ppm 群: 12/50 例、400ppm 群: 16/49 例、800ppm 群: 16/50 例) の発生は Peto 検定 (有病率法、死亡率法+有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定では全投与群とも対照群と比較して有意な増加を示した。また、肝芽腫の発生 (対照群: 0/50 例、200ppm 群: 13/50 例、400ppm 群: 7/49 例、800ppm 群: 4/50 例) が Fisher 検定で 200ppm 群と 400ppm 群に有意な増加を示した。なお、これら肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫を合わせた発生 (対照群: 8/50 例、200ppm 群: 42/50 例、400ppm 群: 46/49 例、800ppm 群: 44/50 例) も Peto 検定 (有病率法、死亡率法+有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定では全投与群に有意な増加を示した。

雌の肝細胞腺腫 (対照群: 1/49 例、200ppm 群: 42/50 例、400ppm 群: 47/50 例、800ppm 群: 48/49 例) と肝細胞癌 (対照群: 3/49 例、200ppm 群: 25/50 例、400ppm 群: 32/50 例、800ppm 群: 35/49 例) の発生は Peto 検定 (有病率法、死亡率法+有病率法、加えて肝細胞癌は死亡率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定では全投与群とも有意な増加を示した。また、肝芽腫の発生が、400ppm 群の 4/50 例にみられた。なお、これらの肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫を合わせた発生 (対照群: 3/49 例、200ppm 群: 45/50 例、400ppm 群: 49/50 例、800ppm 群: 49/49 例) は Peto 検定 (死亡率法、有病率法、死亡率法+有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定では全投与群に有意な増加を示した。

<下垂体>

雌の腺腫の発生（対照群：7/49 例、200ppm 群：9/50 例、400ppm 群：6/50 例、800ppm 群：0/50 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定では 800ppm 群に有意な減少を示した。

<肺>

雄の細気管支－肺胞上皮癌の発生（対照群：8/49 例、200ppm 群：6/50 例、400ppm 群：3/50 例、800ppm 群：2/50 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fischer 検定で 800ppm 群に有意な減少が認められた。

<リンパ節>

雌のリンパ節での悪性リンパ腫の発生（対照群：13/49 例、200ppm 群：9/50 例、400ppm 群：7/50 例、800ppm 群：3/49 例）と全臓器を合わせた悪性リンパ腫の発生（対照群：15/49 例、200ppm 群：12/50 例、400ppm 群：9/50 例、800ppm 群：3/49 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 800ppm 群に有意な減少が認められた。

その他、雄の一部の群で、全臓器を合わせた血管肉腫の発生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。

－非腫瘍性病変－

主な非腫瘍性病変の発生を、TABLE 10, 11 に示した。

<肝臓>

雄では、好酸性小増殖巣、明細胞性小増殖巣、中心性の腫脹と核異型、単細胞壊死及び炎症性細胞集簇巣が全投与群で増加した。なお、巣状壊死は 800ppm 群で減少した。

雌では、好酸性小増殖巣が全投与群で増加し、中心性の腫脹が 200ppm 群と 800ppm 群で増加し、400ppm 群でも統計学的な有意差を示さないものの対照群より発生が多かった。また、中心性の核異型が 800ppm 群で増加した。

<鼻腔>

骨の肥厚が雌雄とも 800ppm 群の多くの例にみられた（雄：44/50 例、雌：46/49 例）。また、雄では嗅上皮の呼吸上皮化生の増加が 800ppm 群で、嗅上皮のエオジン好性変化の減少が全投与群で認められた。雌では嗅上皮の呼吸上皮化生の増加が全投与群で、鼻腺の呼吸上皮化生、嗅上皮のエオジン好性変化及び呼吸上皮のエオジン好性変化の増加が 800ppm 群で認められた。

<肺>

泡沫細胞の出現が雄の 800ppm 群で増加し、炎症性細胞浸潤が雌の 800ppm 群で減少した。

<腎臓>

硝子滴が雄の 400ppm 以上の群で増加した。

<下垂体>

過形成が雌の 800ppm 群で減少した。

<副腎>

皮質の過形成が雄の 400ppm 以上の群で減少し、紡錘形細胞増生が雌の全投与群で減弱した。

<脾臓>

髄外造血の増加が雄の全投与群と雌の 400ppm 以上の群で増加した。

<卵巣>

嚢胞が雌の 800ppm 群で減少した。

<子宮>

嚢胞状内膜増生が雌の 800ppm 群で減弱した。

その他、雄の一部の群で、副腎の皮質過形成と鼻腺の呼吸上皮化生、雌の一部の群で肝臓の単細胞壊死と炎症性細胞集簇巣、腎臓の硝子円柱及び心臓の鉍質沈着の発生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-8-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 12 に示した。

雄では投与群に特徴的な死因はみられなかった。

雌では投与群に肝臓腫瘍を死因とした例が多くみられた（対照群：1/20 例、200ppm 群：5/20 例、400ppm 群：11/29 例、800ppm 群：15/27 例）。なお、白血病を死因とする例は 800ppm 群で減少していた（対照群：6/20 例、200ppm 群：6/20 例、400ppm 群：7/29 例、800ppm 群：1/27 例）。

IV 考察及びまとめ

IV-1 生死状況、死因、一般状態、体重、摂餌量

雄の生存率には投与群と対照群の間に差はみられなかった。雌は 400ppm 以上の群で生存率が低下した。雌の投与群に特徴的な死因は肝臓の腫瘍であり、400ppm 以上の群で特に多くみられたことから、雌の生存率の低下は肝臓腫瘍による死亡の増加によるものと考えた。なお、雌では白血病を死因とする例が 800ppm 群で減少した。

体重については、雄の全投与群に投与濃度に対応した体重増加の抑制がみられ、雌では 800ppm 群に体重増加の抑制がみられた。

摂餌量は、投与開始から 1 週目では雌雄とも全投与群で低値がみられ、その後、400ppm 以下の群は対照群に近い値で推移するが、雄の 800ppm 群では 5 週から 78 週まで低値がみられ、雌の 800ppm 群では 30 週までと 102 週及び 104 週で低値がみられた。

IV-2 腫瘍性病変

肝臓の肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫の発生増加が雌雄に、また、肺の細気管支-肺胞上皮腺癌の発生減少が雄に、下垂体の腺腫とリンパ節の悪性リンパ腫の発生減少が雌にみられた。

<肝臓>

雄：

肝細胞腺腫の発生（対照群：6/50 例、200ppm 群：36/50 例、400ppm 群：41/49 例、800ppm 群：41/50 例）と肝細胞癌の発生（対照群：2/50 例、200ppm 群：12/50 例、400ppm 群：16/49 例、800ppm 群：16/50 例）は投与濃度に対応して増加しており、Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で全投与群に有意な増加が認められた。当センターで行われた試験の対照群における発生（ヒストリカルコントロールデータ：文献 7）では、雄の肝細胞腺腫の各試験における発生率は 2-30.6%（平均 15.3%、137/897 例）の範囲であり、全投与群でこの上限を超えていることから、本試験における肝細胞腺腫の発生増加は被験物質の投与による影響と考えた。また、ヒストリカルコントロールデータでは、肝細胞癌の発生率は 2-36.7%（平均 21.6%、194/897 例）の範囲であり、肝細胞癌の発生はこの上限を超えていないものの 200ppm 以上の群で平均値より高く、発生の増加が投与濃度に対応していること、肝細胞癌の前段階である肝細胞腺腫が投与群で顕著に増加していることから、本試験における肝細胞癌の発生増加も被験物質の投与による影響と考えた。さらに、肝芽腫が対照群 0/50 例に対し、200ppm 群の 13/50 例、400ppm 群の 7/49 例、800ppm 群の 4/50 例に発生し、統計学的にも Fisher 検定で 200ppm 群と 400ppm

群に有意な増加が認められた。肝芽腫は自然発生が稀な腫瘍で、当センターのヒストリカルコントロールデータでも発生は 2/897 例（平均 0.2%）であり、各投与群の発生は顕著に高かった。したがって、本試験における肝芽腫の発生増加も被験物質の投与による影響と考えた。なお、肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫を合わせた発生（対照群：8/50 例、200ppm 群：42/50 例、400ppm 群：46/49 例、800ppm 群：44/50 例）は投与群で顕著に増加しており、Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定では全投与群に有意な増加を示した。

以上のように、雄では *N,N*-ジメチルホルムアミド（DMF）の投与によって肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫の発生が増加した。良性腫瘍である肝細胞腺腫の発生は投与濃度に対応して増加しており、顕著に高い発生であった。また、悪性腫瘍である肝細胞癌の発生は投与濃度に対応して増加した。この肝細胞癌は肝細胞腺腫が悪性化した腫瘍であり（文献 8）、肝細胞腺腫の一部が肝細胞癌に移行したと考えられる。さらに、肝芽腫の発生は投与濃度に対応していなかったが、稀な腫瘍であり、投与群のみに顕著に発生した。この肝芽腫は肝細胞腺腫や肝細胞癌と組織型が異なるが、これらの腫瘍と同様に、肝細胞から発生すると考えられている悪性腫瘍であり（文献 9）、この腫瘍の増加も肝細胞由来の悪性腫瘍が増加することを示す証拠と考えた。これらの結果は、NTP のがん原性の評価基準（文献 10）における明確な証拠（clear evidence）の条件、すなわち「良性腫瘍と悪性腫瘍をあわせた腫瘍の投与濃度に対応した顕著な発生増加」に相当し、肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫の発生増加は DMF のマウスの雄に対するがん原性を示す明らかな証拠（clear evidence）と考えた。

雌：

肝細胞腺腫の発生（対照群：1/49 例、200ppm 群：42/50 例、400ppm 群：47/50 例、800ppm 群：48/49 例）と肝細胞癌の発生（対照群：3/49 例、200ppm 群：25/50 例、400ppm 群：32/50 例、800ppm 群：35/49 例）は投与濃度に対応して顕著に増加しており、Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で全投与群に有意な増加が認められた。当センターのヒストリカルコントロールデータでは、雌の肝細胞腺腫の各試験における発生率は 2-10%（平均 5.0%、45/899 例）、肝細胞癌の発生率は 0-8%（平均 2.2%、20/899 例）の範囲であり、いずれも全投与群でこの上限を超えていた。これらのことから、本試験における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と考えた。また、肝芽腫が 400ppm 群のみに 4/50 例みられ、当センターのヒストリカルコントロールデータでは、現在まで 899 例を検索した中に発生が一例もなく、極めて稀であることから、雌の肝芽腫の発生は被験物質の投与により誘発されたと考えた。なお、肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫を合わせた発生（対照群：3/49 例、200ppm 群：45/50 例、400ppm 群：49/50 例、800ppm 群：49/49 例）も投与濃度に対応して顕著に増加しており、Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。

以上のように、雌でも DMF の投与によって肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫の発生が増加した。良性腫瘍の肝細胞腺腫と悪性腫瘍の肝細胞癌の発生はともに投与濃度に対応して増加しており、顕著に高い発生であった。また、肝芽腫は 400ppm 群のみに発生し、投与濃度に対応した増加ではなかったが、肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加と同様に、DMF の投与によって肝細胞由来の悪性腫瘍が増加することを裏付ける証拠と考えられた。これらの結果は、NTP のがん原性の評価基準（文献 10）における明確な証拠（clear evidence）の条件、すなわち「悪性腫瘍の投与濃度に対応した顕著な発生増加」と「良性腫瘍と悪性腫瘍をあわせた腫瘍の投与濃度に対応した顕著な発生増加」の両方に相当し、肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加は DMF のマウスの雌に対するがん原性を示す明らかな証拠（clear evidence）と考えた。

<肺>

雄の細気管支－肺胞上皮癌の発生（対照群：8/49 例、200ppm 群：6/50 例、400ppm 群：3/50 例、800ppm 群：2/50 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定でも 800ppm 群に有意な減少が認められた。当センターのヒストリカルコントロールデータでは、細気管支－肺胞上皮癌の各試験における発生率は 0-22%（平均 10.0%、90/896 例）の範囲であり、本試験ではいずれの群もこの範囲内にある。しかしながら、400ppm 以上の群は平均を下まわり、投与濃度に対応して減少することから、本試験における雄の細気管支－肺胞上皮癌の発生減少は被験物質の投与による影響と考えた。

<下垂体>

雌の腺腫の発生（対照群：7/49 例、200ppm 群：9/50 例、400ppm 群：6/50 例、800ppm 群：0/50 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定でも 800ppm 群に有意な減少が認められた。当センターのヒストリカルコントロールデータでは、腺腫の各試験における発生率は 2-34.7%（平均 15.1%、135/894 例）の範囲であり、800ppm 群の腺腫の発生率はこの下限を下まわっていた。以上のことから、本試験における雌の腺腫の発生減少は被験物質の投与による影響と考えた。

<リンパ節>

雌のリンパ節における悪性リンパ腫の発生（対照群：13/49 例、200ppm 群：9/50 例、400ppm 群：7/50 例、800ppm 群：3/49 例）と全臓器を合わせた悪性リンパ腫の発生（対照群：15/49 例、200ppm 群：12/50 例、400ppm 群：9/50 例、800ppm 群：3/49 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定でも 800ppm 群に有意な減少が認められた。当センターのヒストリカルコントロールデータでは、リンパ節の悪性リンパ腫の各試験における発生率は 12.2-42%（平均 25.0%、225/899 例）の範囲であり、800ppm 群の発生率はこの下限を下まわっていた。以上のことから、本試験における雌の悪性リン

パ腫の発生減少は被験物質の投与による影響と考えた。

以上のように、雄の細気管支－肺胞上皮癌、雌の下垂体腺腫及びリンパ節の悪性リンパ腫の減少がみられた。これらの腫瘍の減少は、雌雄とも摂餌量の減少に伴う体重増加抑制があり、この影響が考えられるが、投与群では雌雄とも肝臓腫瘍が多く発生していることから、肝臓腫瘍の発生で二次的に減少している可能性も考えられ、雌では肝臓腫瘍による生存率の低下が関与している可能性も考えられた。

IV-3 非腫瘍性病変

肝臓、鼻腔、下垂体、副腎及び脾臓の非腫瘍性病変に投与群と対照群の間で発生の差が認められた。

肝臓では、雄に好酸性小増殖巣、明細胞性小増殖巣、中心性の腫脹と核異型、単細胞壊死及び炎症性細胞集簇巣の増加が全投与群で、雌に好酸性小増殖巣の増加が全投与群、中心性の腫脹の増加が 200ppm 群と 800ppm 群、中心性の核異型の増加が 800ppm 群で認められた。これらの中で、好酸性小増殖巣や明細胞性小増殖巣は肝細胞腺腫や肝細胞癌の前段階である前腫瘍性病変とされている変化であり（文献 8）、DMF の投与によってこれらの前腫瘍性病変が 200ppm 群まで増加することが示された。小葉中心性の核異型も核の染色体に対する影響、すなわち肝臓腫瘍との関連を示唆する所見であったが、雌では 800ppm 群でのみ増加を示し、これより低濃度である 200ppm 群と 400ppm 群では肝臓腫瘍の増加があるにもかかわらず核異型の増加は認められなかった。本試験の投与濃度を設定するために行った 2 週間試験では雌雄とも 1600ppm の濃度で肝臓に単細胞壊死、13 週間試験では雌雄とも 800ppm の濃度で肝臓に単細胞壊死と中心性腫脹が観察されている（文献 3）。今回行った 104 週間試験では雄についてはこれらの所見が最低濃度である 200ppm 群まで観察され、投与期間の延長によって、DMF の肝臓への短期的影響がより低濃度まで発現した。これに対し、雌では中心性腫脹はより低濃度まで観察されたが、単細胞壊死については 800ppm の暴露でも増加しておらず、400ppm 群ではむしろ減少していた。

その他の臓器については、雄では鼻腔に嗅上皮のエオジン好性変化の減少が全投与群と、骨の肥厚の発生と嗅上皮の呼吸上皮化生の増加が 800ppm 群、肺に泡沫細胞の出現の増加が 800ppm 群、腎臓に硝子滴の増加が 400ppm 以上の群、脾臓に髄外造血の増加が全投与群でみられた。雌では鼻腔に嗅上皮の呼吸上皮化生の増加が全投与群と、骨の肥厚の発生、鼻腺の呼吸上皮化生、嗅上皮のエオジン好性変化及び呼吸上皮のエオジン好性変化の増加が 800ppm 群、肺に炎症性細胞浸潤の減少が 800ppm 群、下垂体に過形成の減少が 800ppm 群、副腎に紡錘形細胞増生の減弱が全投与群と皮質過形成の減少が 400ppm 以上の群、子宮に囊胞状過形成の減少が 800ppm 群、脾臓に髄外造血の増加が全投与群でみられた。これらの所見のうち、雌雄にみられた脾臓の髄外造血の増加は肝臓腫瘍の発生による失血に伴う二次的な変化、雌にみられた皮質過形成の減少は下垂体腫瘍の減少に関連した変化と

推察された。その他の所見に関しては、被験物質の投与による変化であることを否定できなかったが、毒性学的な意義については明らかでなかった。

以上のように、非腫瘍性病変についても顕著な影響が肝臓にみられた。雄では肝細胞腺腫や肝細胞癌の前腫瘍性病変とされる好酸性小増殖巣や明細胞性小増殖巣の増加あるいは小葉中心性の核異型が最低濃度である 200ppm 群まで認められた。また、2 週間試験や 13 週間試験で観察された肝臓の単細胞壊死や中心性腫脹も 200ppm 群まで観察された。雌にも前腫瘍性病変とされる好酸性小増殖巣の増加が 200ppm 群まで、中心性の核異型の増加が 800ppm 群にのみ認められた。また、中心性腫脹は 200ppm 群まで観察されたが、単細胞壊死の増加は認められなかった。

IV-4 血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査

血液学的検査で雄では、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCV、MCH、MCHC 及び好酸球比の減少と血小板数の増加が全投与群に認められ、雌では、MCV、MCH、MCHC、好酸球比及びリンパ球比の減少と血小板数の増加が全投与群に認められ、これらの変化は、明確な用量相関性を示さない項目もあるが、被験物質の投与による影響である可能性を否定できなかった。特に、雌雄にみられた血小板数の増加は 13 週間試験でも同様にみられていたことから、造血系に対する影響が継続して雌雄にみられたと考えたが、この意義については明らかではなかった。

血液生化学的検査については、雄に総蛋白、総コレステロール及びカルシウムの増加、GOT 活性、GPT 活性、LDH 活性、ALP 活性及びCPK 活性の上昇ならびにカリウムの減少が全投与群で認められた。また、アルブミンと尿素窒素の増加及びグルコースの減少が 400ppm 以上の群で認められ、さらに、総ビリルビンの増加も 800ppm 群に認められた。雌では、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、総コレステロール、カルシウム及び尿素窒素の増加、GOT 活性、GPT 活性、LDH 活性、ALP 活性及びCPK 活性の顕著な上昇が全投与群に認められ、また、無機リンの増加とクロールの減少も 400ppm 以上の群に認められた。特に、雌雄共にみられた GOT 活性、GPT 活性、LDH 活性及び ALP 活性の上昇は顕著なものであり、被験物質投与による肝臓への影響を強く示すもので、肝臓の腫瘍性あるいは非腫瘍性病変の発生に対応した変化と考えた。

尿検査で雄では、蛋白の陽性度とケトン体の陽性例の減少が 400ppm 以上の群に認められた。雌では、蛋白の陽性度の減少が 800ppm 群に認められ、被験物質投与の投与による影響である可能性を否定できなかった。

IV-5 他の文献との比較

マウスを使用した DMF の吸入経路による長期実験は、Malley ら(1994) (文献 4) によ

って報告されている。Malley らは BR マウス(Crl:CD-1(ICR)BR マウス, 雌雄各群 78 匹) に対し、DMF を 0、25、100、400ppm の濃度で、1 日 6 時間、週 5 日間、18 ヶ月間の吸入暴露を行った。その結果、生存率に影響はなく、肝臓の重量増加が雄の 100ppm 以上の群と雌の 400ppm 群に認められ、病理組織学的検査では、肝臓に小葉中心性肥大が雄の 25ppm 以上と雌の 100ppm 以上の群、単細胞壊死の増加が雌雄の 25ppm 以上の群、クッパー細胞の増生や色素沈着が雄の 25ppm 以上と雌の 100ppm 以上の群、さらに、混合性小増殖巣が雄の 100ppm 以上の群でみられたが、DMF 投与による腫瘍の発生増加はなかったと報告している。

当センターで実施した今回のがん原性試験では、DMF の投与によりマウスの肝臓に腫瘍発生（肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫）がみられ、Malley らの報告とは異なる結果が得られた。両報告の実験条件を比較すると、使用したマウスの系統と吸入濃度が異なっていた。マウスの系統は Malley らが Crl:CD-1(ICR)マウスであるのに対し、当センターの試験では Crj:BDF₁ マウスであり、吸入濃度については Malley らが 25、100 及び 400ppm であるのに対し、当センターの試験では 200、400 及び 800ppm であった。しかし、当センターの試験では 200ppm まで肝臓腫瘍の増加が認められ、この濃度は Malley らの報告の最高濃度である 400ppm より低い濃度であることから、吸入濃度の差だけで試験の結果が異なったとは考えられなかった。

肝臓に対する腫瘍以外の影響について、Malley らの報告では、前腫瘍性病変と考えられる好酸性小増殖巣が雄にのみ 100ppm 以上でみられている。当センターの結果では好酸性小増殖巣が雌雄の 200ppm まで、雄ではこれに加え明細胞性小増殖巣が 200ppm までみられ、さらに、中心性の核異型が雌雄ともに 200ppm までみられている。また、その他の肝臓病変は、Malley らの報告では中心性肥大、クッパー細胞の過形成、クッパー細胞の色素出現が雄の 25ppm までと雌の 100ppm 以上、単細胞壊死が雌雄とも 25ppm までみられたのに対し、当センターの結果では中心性の腫脹が雄の 200ppm までと雌の 200ppm 群及び 800ppm 群、単細胞壊死と炎症性細胞集簇巣の増加が雄の 200ppm まで認められた。これらの肝臓の非腫瘍変化は、両報告ともに雄でより低い濃度からみられる傾向があった。また、肝臓重量の増加は、Malley らの報告では雄の 100ppm 以上と雌の 400ppm 群、当センターの結果では雌雄とも 200ppm まで認められ、やや異なる結果であった。

V 結論

Crj:BDF₁ マウスを用いて、*N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)の2年間(104週間)にわたる吸入によるがん原性試験を行った。

その結果、雌雄とも肝細胞腺腫、肝細胞癌及び肝芽腫の発生増加が認められ、この結果はDMFのCrj:BDF₁ マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠と考えられた。また、その前腫瘍性変化と考えられる肝臓の好塩基性小増殖巣の増加が雌雄に、明細胞性小増殖巣の増加が雄に認められた。

VI 文献

1. Heller,S.R. and Milne,G.W. A. (1978)
EPA/NIH Mass Spectral Data Base. Vol.1, p53
U.S. Government Printing Office, Washington.
2. 和光純薬工業からの提供資料(1987)
3. 日本バイオアッセイ研究センター (1996)
N,N-ジメチルホルムアミド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
日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川
4. Malley,L.A., Slone,T.W.,Jr., Van Pelt,C., Elliott,G.S., Ross,P.E., Stadler,J.C. and
Kennedy,G.L.,Jr. (1994)
Chronic Toxicity/Oncogenicity of Dimethylformamide in Rats and Mice Following
Inhalation Exposure.
Fundamental Applied Toxicology, 23, 268-279
5. 阿部正信 (1986)
長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の
確立
薬理と治療, 14, 7285-7302.
6. Peto,R., Pike,M.C., Day,N.E., Gray,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
Research on Cancer, Lyon.
7. 日本バイオアッセイ研究センター内部資料 (1984-1998)

8. Popp,J.A. and Cattley,R.C. (1991)
Hepatobiliary system.
In: Handbook of Toxicologic Pathology.
(Eds.: Haschek,W.M. and Rousseaux,C.G.)
pp.315-387, Academic Press, Inc., San Diego.
9. Turusov,V.S. and Takayama,S. (1979)
Tumours of the liver.
In: Pathology of Tumours in Laboratory Animals. Volume II- Tumours of the
Mouse.
(Ed.: Turusov,V.S.) pp.193-233, IARC, Lyon.
10. National Toxicology Program (1999)
Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ethylbenzene (CAS No.100-41-4) in
F344/N Rats and B6C3F₁ Mice.
National Toxicology Program Technical Report Series No.466, p10