

部分翻訳

**European Union
Risk Assessment Report
CHLOROFORM**

CAS No: 67-66-3

May 2008

欧州連合
リスク評価書(2008年5月草稿版)
クロロホルム

CHLOROFORM

CAS No: 67-66-3

EINECS No: 200-663-8

RISK ASSESSMENT

Draft of May 2008

France

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2015年10月

本部分訳文書は、CHLOROFORM (CAS No: 67-66-3)に関する EU Risk Assessment Report, (2008)の、第 4 章「ヒト健康」のうち、第 4.1.2 項「影響評価：有害性の特定および用量(濃度)-反応(影響)関係」を翻訳したものである。原文(評価書全文)は、
http://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/risk_assessment/REPORT/chloroformreport047.pdf
を参照のこと。

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量(濃度)-反応(影響)関係

本リスク評価書の、有害性の特定に関するセクションの記載は、主として、国際専門家グループによって評価済み(ATSDR, 1997; IARC, 1999; WHO, 1999; US EPA, 2001 & 2004; WHO, 2004)の試験データに基づいている。試験の方法やガイドラインの情報については、原文献が入手可能な場合はそこから引用して追記したが、この国際専門家グループが実施した評価において引用した内容をそのまま掲載している部分もある。

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

4.1.2.1.1 動物試験

In vivo 試験

吸入

マウスおよびラットが、様々な濃度(マウスについては 49, 440 または 1790 mg/m³、ラットについては 460, 1740 または 5100 mg/m³)のクロロホルムに 6 日間吸入曝露され、その後 48 時間にわたって、呼気、尿、糞便、屠体および皮膚中の放射能が測定された。マウスとラットの両方で、低濃度において、代謝が広範に認められた。約 1800 mg/m³ で代謝が部分的に飽和することが示唆された(Corley *et al.*, 1990, WHO, 1994 の中で引用)。放射標識したクロロホルム(280 mg/kg 体重)にマウスを 10 分間吸入曝露した試験では、オートラジオグラフィにより、脂肪、血液、肺、肝臓、腎臓、脊髄・神経、髄膜および小脳皮質に高濃度で分布することが示された(Bergman, 1984, WHO, 1994 の中で引用)。動脈血中の濃度は、吸入濃度に正比例した。胎盤を移行することが示されており、それに伴って、非揮発性代謝物の蓄積が、マウスとモルモットでは胎仔の気道で(Danielsson *et al.*, 1986, WHO, 1994 の中で引用)、ラットでは胎仔の血中で(Withey and Karpinski, 1985, WHO, 1994 の中で引

用)、それぞれ認められた。

クロロホルムの代謝は、マウスの方がヒトよりもはるかに速く、代謝の最高速度の平均値は、 49 mg/m^3 の濃度で吸入曝露した場合、マウスではヒトの約 78 倍であると予測されている (Delic *et al.*, 2000、WHO, 1994 の中で引用)。

経皮

マウスの剃毛した腹部の皮膚に適用した試験では、経皮吸収速度が、 $329 \text{ nmol/分/cm}^2 (\pm 60 \text{ nmol/分/cm}^2)$ と算出されている (Tsuruta, 1975、ATSDR, 1997 の中で引用)。

Islam *et al.* (1995、ATSDR, 1997 の中で引用) は、無毛ラットの雄にクロロホルムを局所適用し、その消長を調べた。曝露は、4 分未満の場合は、剃毛した背部の皮膚にクロロホルムを含ませた水を塗布して行われ、4~30 分間の場合は、クロロホルムを含ませた水の入った恒温槽にラットを浸して行われた。皮膚の何箇所かにおいて、テープの付け剥がしによる角質採取が、様々な時間間隔を置いて何回か行われた。最初の 4 分間にかけて、皮膚中のクロロホルムは漸増しているように思われた。恒温槽中の濃度差に基づいて測定された取り込み量と比べたところ、失われたクロロホルムのうち約 88% は、角質層中に留まらず、全身性に吸収されたとみなされた。

経口

Withey *et al.* (1983、US EPA, 2001 の中で引用) は、水またはコーン油のいずれかを媒体として、クロロホルムの強制経口投与を行い、腸管吸収の速度や規模を比較した。雄の Wistar ラット 12 匹に、クロロホルムが、 75 mg/kg の用量で、単回強制経口投与された。クロロホルムの最高血中濃度到達時間は、どちらの媒体でも同様であったが、コーン油を媒体とした場合のクロロホルムの血中濃度は、水を媒体とした場合に比較して、すべての時点で低かった。著者は、この結果について、クロロホルムの吸収速度がコーン油からよりも水からの方が速いことを示唆するものであると解釈している。ただし、肝臓における初回通過代謝の速度の違いが、この試験において認められた媒体による違いの一因である可能性もある。

マウスおよびラットでは、経口投与されたクロロホルムのうち、45~88% がクロロホルムまたは二酸化炭素として肺から排泄され、1~5% が尿中に排泄された (US EPA, 2001)。

ラット、マウスおよびサルに、放射標識したクロロホルムを 60 mg/kg 体重の用量で経口投与した試験では、クロロホルムの排泄に種差が認められた。マウスでは、呼気中に、投与

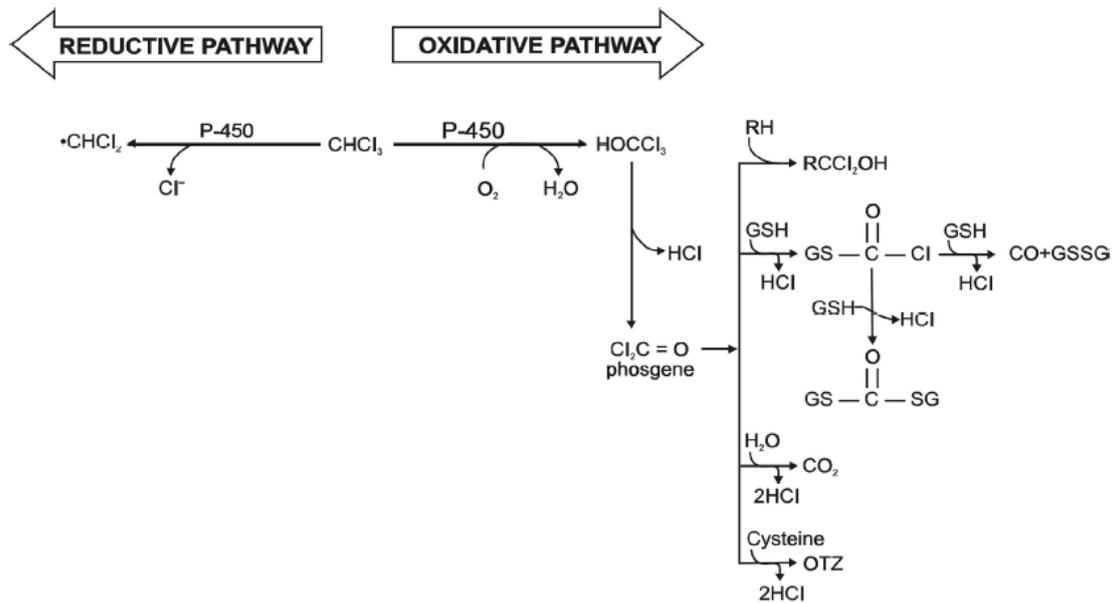
量の約 85%が二酸化炭素として、5%が未変化のままクロロホルムとして排泄されたが、サルでは、呼気中に二酸化炭素として排泄されたのは 18%のみで、79%はクロロホルムとして排泄された。ラットでは、67%が呼気中の二酸化炭素、20%がクロロホルムとして排泄され、マウスとサルの間であった。尿や糞便中への排泄は、合計しても、マウスとサルでは投与量の約 2~3%、ラットでは約 8%であった (Brown *et al.*, 1974、WHO, 1994 の中で引用)。

In vitro 試験

クロロホルムは、ヒトや動物では、シトクロム P450 依存性経路 (CYP2E1) によって代謝される。身体のおぼすべての組織がクロロホルムを代謝できるが、中でも代謝率が高いのは、肝臓、腎皮質、および鼻粘膜である (ILSI, 1997)。これらの組織は、クロロホルムの毒性の主要な標的部位でもあることから、クロロホルムの毒性の作用機序において、代謝が重要性を有することが示唆される。

酸素の存在下 (酸化代謝) における主要な生成物は、トリクロロメタノール (HOCCl_3) であり、この物質は急速に脱塩化水素化されて、ホスゲン (CCl_2O) が生成する。ホスゲンの生体内主反応は水による加水分解であり、これによって二酸化炭素と塩酸が生成する。ただし、ホスゲンは求電子性であり、細胞高分子 (酵素、蛋白質、リン脂質の極性頭部基など) との反応により、分子付加体が生成され得る。そうした付加体の生成によって、細胞機能の喪失と細胞死が起こる可能性がある。

酸素の非存在下 (還元代謝) における主要な生成物は、ジクロロメチルフリーラジカル (CHCl_2) である。この物質も極めて反応性が高く、フリーラジカル生成部位 (ミクロソーム膜中のシトクロム P450) に極めて近接していると思われるミクロソーム酵素やリン脂質脂肪酸末端と、共有結合付加体を形成する。その結果、ミクロソーム酵素の活性が全体的に失われ、さらに脂質の過酸化も生じ得る (US EPA, 2001)。



マウスの肝ミクロソームと腎ミクロソームを用いた *in vitro* 試験では、酸素分圧が比較的低い状態 (2.6%、肝臓における平均と同等) でも、リン脂質結合のうち 75% 超は、脂肪酸頭部基との結合によるものであることが示されている。リン脂質の付加体形成に関するこのような所見は、主要な反応種をフリーラジカルではなくホスゲンと考えると整合性が取れることから、代謝が主として酸化的経路によるものであることが示唆される (ILSI, 1997; US EPA, 2001)。

4.1.2.1.2 ヒトにおける試験

In vivo 試験

吸入

Morgan *et al.* (1970, WHO, 1994 の中で引用) は、ボランティアに約 5 mg の ³⁸Cl-クロロホルムを単回吸入投与し、約 80% が吸収されたことを示した。

Gordon *et al.* (1988, ATSDR, 1997 の中で引用) は、吸入曝露の場合の、クロロホルムのヒトにおける半減期を、7.9 時間と算出した。

Levesque *et al.* (1994, ATSDR, 1997 の中で引用) は、屋内プールでクロロホルムへの曝露を行い、クロロホルムの体内負荷量の定量化を試みた。スキューバダイバーが、クロロホル

ムを含む水と空気に、7 日間にわたり毎日曝露された。いずれの日の曝露も、被験者を 55 分間運動させることで行われた。水中のクロロホルムの平均濃度を、初回の運動期間から 6 回目の運動期間にかけて、159 $\mu\text{g/L}$ から 553 $\mu\text{g/L}$ まで増加させた。それに呼応して、空気中のクロロホルムの平均濃度は、597 ppb から 1630 ppb の範囲の値となった。運動開始前ならびに運動開始から 35 分後と 55 分後に、肺胞の空気試料が採取された。著者らは、試験の結果から、運動開始から 35 分後と 55 分後における、吸入による体内負荷量の平均割合は、それぞれ 76% と 78% であったと結論付けている。

工業地域に居住している授乳婦の母乳から、クロロホルムが検出されている。ただし、適切なデータがないため、授乳期間中におけるクロロホルムによる影響を評価するには限界がある (Lechner *et al.*, 1988)。

Fisher *et al.* (1997, Health Council of the Netherlands, 2000 の中で引用) は、授乳婦 (9 名) から提供された血液と母乳の試料を用いて、ヒトにおける血液/空気分配係数と母乳/空気分配係数を調べた。この試験の目的は、クロロホルム蒸気に職業曝露された母親から汚染された母乳を摂取することで生じ得る、乳児におけるクロロホルムへの曝露を検討することであった。乳児における曝露量を推算するため、ヒトの汎用的な生理学的薬物動態 (PB-PK) 授乳モデルが開発された。このモデルは、蒸気濃度を飲用水中のクロロホルムの許容上限濃度 (10 ppm) に等しく一定に保ち、それに母親が 8 時間曝露された場合を想定している。PB-PK 授乳モデルには、試験に基づいて決定された血液/空気分配係数と母乳/空気分配係数が用いられた。乳児によって 24 時間かけて摂取されるクロロホルムの予測量は、0.043 mg であった。ただし、このモデルはまだ検証されておらず、この曝露量がヒト乳児の発達にどのような関連性を有するかは不明である。

Corley *et al.* (1990, ATSDR, 1997 の中で引用) は、クロロホルムに関する PBPK モデルを開発した。簡単に述べると、モデルは一連の微分方程式で構成され、各式は、胃腸管、肺、動脈血、静脈血、肝臓、腎臓などの灌流速度の速い組織、および灌流速度の遅い組織や脂肪など、一連の身体コンパートメントのそれぞれにおける、クロロホルムの流入および流出速度を表している。

一般的に、各コンパートメントへの流入速度は、次の 3 つの値の積で表される。

- (a) コンパートメントに向かう血流速度
- (b) 動脈血中のクロロホルム濃度
- (c) 血液と組織間の分配係数

肺または胃から血液へのクロロホルムの吸収は、一次吸収の動態を想定してモデル化されている。胃から吸収された物質は、門脈系を経由して直接肝臓に流入すること (「初回通過

効果」が想定されるが、一方、肺から吸収された物質は、動脈血に入る。各組織コンパートメントでは、十分な混合が起こり、その組織から出て行く静脈血がその組織と平衡状態になると想定されている。クロロホルムの代謝は、肝臓と腎臓のいずれにおいても起こると想定されている。代謝速度は、飽和し得ると想定され、ミカエリス・メンテン型の式で表されている。クロロホルムの代謝によって、全代謝物の一部分が細胞高分子に結合するようになると想定されており、結合した量は組織に達した量の一つの指標となる。反応性代謝物が細胞高分子に結合して、それにより細胞の代謝能がいくらか失われることも想定されている。その後、正常レベルから減少した量に比例した速度で代謝酵素が再合成され、代謝能(代謝酵素量)が回復する。Corley *et al.* (1990)は、公表されている生理学的・生化学的データのレビューの結果や、モデルにおける各パラメータの推定値を求めることに特化して実施したいくつかの試験の結果に基づいて、3 生物種(マウス、ラット、ヒト)の各モデルにおける入力値に関し、推奨値を提供している。これらの入力値に基づくモデル化により、組織(肝臓または腎臓)1 kg により代謝されるクロロホルムの量は、単位用量に換算すると、マウスが最も多く、ヒトが最も少なく、ラットが中間であると考えられることが予想された。この種差は、代謝速度、換気率および心拍出量が、大型の動物種では、小型の動物種に比較して低いことに起因している。細胞分子に結合する代謝物の量が等しければ組織に対して等しい毒性が現れると仮定すると、クロロホルムの相対毒性強度は、マウス>ラット>ヒトであると予想される。

経皮

閉塞条件下の経皮試験で、情報が得られたものを、本リスク評価書でとり挙げた。

Dick *et al.* (1995、ATSDR, 1997 の中で引用)は、ヒトにおけるクロロホルムの経皮吸収性について、ボランティアを対象とした *in vivo* 試験と、腹部から切り取った新鮮な皮膚を用いた *in vitro* 試験で検討した。*In vivo* 試験では、蒸留水を媒体とした濃度 1000 µg/mL のクロロホルム溶液 50 µL (16.1 µg/cm²)、もしくはエタノールを媒体とした濃度 5000 µg/mL のクロロホルム溶液 50 µL (80.6 µg/cm²)のいずれかを、ボランティアの前腕に塗布し、呼気と尿を採取・分析した。溶液は、8 時間、皮膚に適用された状態に保たれた。水を媒体として適用した場合、総吸収量は、7.8 ± 1.4%であった。一方、エタノールを媒体として適用した場合、総吸収量は、わずか 1.6 ± 0.3%であった。*In vivo* 試験では、吸収された量の 95%を超える画分が肺から(88%以上が CO₂ として)排泄され、肺からの排泄は、塗布後 15 分~2 時間で最大に達した。

経皮吸収には、蒸気ではなく液体状のクロロホルムへの浸漬や接触が必要である (Davidson *et al.*, 1982、US EPA, 2004 の中で引用)。Gordon *et al.* (1998、US EPA, 2004 の中で引用)は、ヒトにおける経皮吸収を、清浄な空気をフェイスマスクを介して呼吸しながら塩素処理水

に浸かる方法で検討した。40°C の塩素処理水に浸かった被験者では、6～9 分後にほぼ定常値に達し、呼気中に排泄されたクロロホルムの量は、同じ被験者が 30°C の塩素処理水に浸かった場合の約 30 倍であった。著者らは、この差について、低温では、身体が体温を保とうとして皮膚への血流が減少したため、クロロホルムが血液と接触する前に、はるかに長い経過時間を要し、その間に拡散を余儀なくされたことによるものであろうと結論づけている。

Levesque *et al.* (1994、ATSDR, 1997 の中で引用)は、屋内プールでクロロホルムへの経皮および吸入曝露を行い、クロロホルムの体内負荷量の定量化を試みた。男性スキューバダイバーが、クロロホルムを含む水と空気に、7 日間にわたり毎日曝露された。いずれの日の曝露も、被験者を 55 分間運動させることで行われた。試験 6 日目には、被験者に潜水用呼吸装置を装着させ、経皮曝露による体内負荷率が測定できるようにした。潜水用呼吸装置の装着があった 6 日目では、運動開始から 35 分後と 55 分後の肺胞空気中の濃度は、それぞれ 196 ppb と 209 ppb であった。このデータから、経皮曝露による体内負荷率の平均は、運動開始から 35 分後と 55 分後で、それぞれ、24%と 22%であったと思われた。

Corley *et al.* (2000、ATSDR, 1997 の中で引用)は、ヒトにおけるクロロホルムの経皮吸収を検討した。ボランティアを、水浴(濃度 100 ppb 未満)による皮膚のみの曝露に供し、クロロホルムの呼気中動態を、生理学的薬物動態(PBPK)モデルを用いて分析した。曝露温度が 30°C から 40°C へ上昇されるのに伴い、呼気中のクロロホルム(すなわち生物学的利用能)の有意な増加が認められた。皮膚への血流量と皮膚の有効透過係数(Kp)は、どちらも変動し、生理学的動態および呼気中動態が温度依存性に変化することを示していた。40°C では、男女差は認められなかった。この結果、皮膚血流量を心拍出量の 18%とした場合の Kp 値が算出された(0.06 cm/時)。30°C および 35°C では、呼気中のクロロホルムは男性の方が女性よりも多く、したがって、女性の有効 Kp 値は低く算出された。30°C および 35°C では、皮膚への血流量も減少した。35°C および 40°C で曝露された男女で吸収されたクロロホルムの総量は、平均すると、男性では、それぞれ 41.9 mg と 43.6 mg、女性では、それぞれ 11.5 mg と 39.9 mg であった。30°C では、男性で 5 名中 2 名のみ、女性で 5 名中 1 名のみ、呼気中に検出可能な濃度のクロロホルムが認められた。被験者が、この試験で用いられた濃度で 2 L の水を経口摂取した場合、クロロホルムの総摂取量の予測値は、79～194 mg となると考えられた。したがって、40°C で 30 分間水浴し、2 L の水を摂取した場合、総体内負荷量に対するクロロホルムの経皮吸収量の相対寄与率は、平均で約 18%と推定された。35°C では、総体内負荷量に対する経皮吸収量の寄与率は、男性で 17%、女性で 6%と予想された。最も低い温度の 30°C では、経皮吸収量は、総体内負荷量のわずか 1～7%であった。

経口

胃腸管からの吸収は、迅速かつ大規模になされると思われる。経口投与量の 90%を超える分量が、8 時間以内に呼気から(未変化のクロロホルムとして、または二酸化炭素として)回収されたという結果が得られている。ヒトに 0.5 g のクロロホルム(オリーブ油に溶解してゼラチンカプセルに充填)を単回経口投与したところ、投与量の約 50~52%は吸収・代謝されて二酸化炭素になり、17.8~66.6%は未変化のクロロホルムとして、8 時間にわたって肺から排泄された。血中濃度は、1.5 時間後にピークに達した後、2-コンパートメントモデルに準じた低下を示し、その半減期は、初期相が 13 分、第 2 相が 90 分であった(Fry *et al.*, 1972、US EPA, 2001 の中で引用)。

クロロホルムは、代謝が飽和する動態を示し(US EPA, 2001)、したがって、クロロホルムの投与量が多いほど、代謝率は小さくなる。

脂肪組織ではクロロホルムが相当量取り込まれて保持される可能性があり、日常的に曝露されると、特に肥満の人では、蓄積が起こる可能性がある。クロロホルムが胎盤を通過すること、およびヒトの初乳や成熟母乳に含まれる得ることを示す証拠が得られている(Davidson *et al.*, 1982、US EPA, 2004 の中で引用)。このレビューからは、様々な集団での定量的データは得られなかった。

In vitro 試験

¹⁴C-クロロホルムの代謝が、雄の F344 ラット、Osborne-Mendel ラット、B6C3F1 マウス、シリアゴールデンハムスター、およびヒトから調製された肝ミクロソームと腎ミクロソームにおいて、生成される ¹⁴CO₂ を捕捉する方法により測定された。肝ミクロソームにおける ¹⁴C-クロロホルムの代謝速度は、ハムスター>マウス>ラット>ヒトの順で速かった。いずれの動物種についても、腎ミクロソームの活性は、肝ミクロソームのものよりも低かった。腎ミクロソームにおける ¹⁴C-クロロホルムの代謝活性は、マウスが最大で、以下ハムスター、ラット、ヒトの順であり、ヒトの腎ミクロソームでは検出不能であった(Corley *et al.*, 1990)。Amet *et al.*(1997)の試験では、ヒトの肝臓から CYP 2E1 が検出されたが、腎臓からは検出されなかった(IARC, 1999)。

Dick *et al.*(1995、ATSDR, 1997 の中で引用)は、ヒトにおけるクロロホルムの経皮吸収性を、ボランティアを対象とした *in vivo* 試験と、腹部から切り取った新鮮な皮膚を用いた *in vitro* 試験で検討した。*In vitro* 試験では、皮膚を腹部から円盤状に切り取ってフロースルー型拡散セルに取り付け、その皮膚に、蒸留水を媒体として、クロロホルムを塗布した。クロロホルムの用量は、0.4 µg/mL(低用量、0.62 µg/cm²、1.0 mL 塗布)、もしくは 900 µg/mL(高用

量、70.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、50 μL 塗布)であった。HEPES 緩衝ハンクス平衡塩類溶液で灌流を行い、塗布から 4 時間後に洗浄を行った。*In vitro*(経皮 + 灌流液)で吸収されたクロロホルムの塗布用量に対する割合は、低用量では $5.6 \pm 2.7\%$ 、高用量では $7.1 \pm 1.4\%$ であった。

4.1.2.1.3 トキシコキネティクス、代謝、および分布の要約

哺乳類では、経口、吸入、経皮曝露のいずれにおいても、クロロホルムの吸収、代謝、排泄は良好である。したがって、クロロホルムは、血液循環によって全身に幅広く分配され、その脂質溶解性のため、特に脂肪組織や脳に蓄積される。

吸入曝露の場合、ヒトにおけるクロロホルムの半減期は、7.9 時間と算出されている (Gordon *et al.*, 1988, ATSDR, 1997 の中で引用)。また、経口試験では、クロロホルムのほとんどが、投与後 8 時間以内に排泄されることが示されている (Fry *et al.*, 1972, ATSDR, 1997 の中で引用)。

クロロホルムは主に肝臓で代謝される。クロロホルムの肝臓での代謝については、*in vivo* でのデータは少ないが、酸化的経路と還元的経路の両方が特定されている。主要な代謝産物は二酸化炭素で、*in vivo* では酸化的経路で生成される。この主経路では、ホスゲンなどの反応性代謝物も生成される。還元的経路では、ジクロロメチルカルベンのフリーラジカルが生成される。両経路とも、シトクロム P450 依存性の酵素的活性化の段階を経て進行し、両経路のバランスは、動物種、組織、用量および酸素分圧に左右される。クロロホルムの酸化的脱塩素反応によってトリクロロメタノールが生成し、トリクロロメタノールが自然に脱塩化水素化されて、ホスゲンが生成する (WHO, 2004)。

求電子性代謝物であるホスゲンは、組織蛋白質の求核性成分と共有結合し、他の細胞求核分子とも相互作用し、また、ある程度、リン脂質の極性頭部基とも結合する。さらに、ホスゲンは、水と反応して、二酸化炭素と塩酸を放出することもある。得られた文献のデータによると、クロロホルムの毒性はその代謝物に起因するものであり、ホスゲンは、肝臓成分と不可逆的に結合して毒性を示すと考えられる (WHO, 2004)。

クロロホルムは胎盤を通過することができ、マウスでは経胎盤移行が報告されており (Danielsson *et al.*, 1986, WHO, 1994 の中で引用)、ラットでは胎仔血中から検出されている (Withey and Karpinski, 1985, WHO, 1994 の中で引用)。また、ヒトの初乳や成熟母乳中に分泌されると考えられている (Lechner *et al.*, 1988; Fisher *et al.*, 1997, Health Council of the Netherlands, 2000 の中で引用; Davidson *et al.*, 1982, US EPA, 2004 の中で引用)。

報告されたデータから、動物におけるクロロホルムの吸入、経皮、経口による吸収率は、それぞれ、80%、10%、100%であると考えられる。

ヒトにおける試験のデータによると、クロロホルムの吸入吸収率は 80%、経皮吸収率は 10%である。クロロホルムの経口吸収率は 100%であると考えられる。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物における試験

In vivo 試験

吸入

Bonnet(1980)は、ラットにおける 6 時間吸入曝露の LC₅₀として、9.2 g/m³という値を報告している。ラットでは、急性吸入の主症状として中枢神経系の機能低下が認められ、2.1 g/m³の濃度での 4 時間曝露により、軽度の麻酔作用が認められている (Frantik *et al.*, 1998)。雌マウスにおける 6 時間吸入曝露の LC₅₀として、6.2 g/m³という値が報告されている (Gradiski *et al.*, 1978) (WHO, 1994 の中で引用されているまゝを引用)。

Kasai *et al.*(2002)は、F344 ラットおよび BDF1 マウスを、クロロホルム蒸気 (500、1000、2000、4000 もしくは 8000 ppm、すなわち 2440、4880、9760、19520 もしくは 39040 mg/m³)に、1 日 6 時間、週 5 日で、2 週間にわたって曝露した。雄マウスは、急性毒性に対する感受性が雌よりも高かった。ラット、マウスともに、2000 ppm 以上の群では、48 時間以内の死亡率が 100%であった (Table 4.17 を参照)。

Table 4.17 Mortality rates for rats and mice of both sexes exposed to chloroform for 2 wk by inhalation (Kasai *et al.*, 2002)

Exposed concentration	Mice		Rats	
	Male	Female	Male	Female
0 ppm	0	0	0	0
500 ppm	9 (9/2 nd)	0	0	0
1000 ppm	9 (9/2 nd)	9 (4/4 th) (4/5 th) (1/6 th)	0	0
2000 ppm	10 (10/2 nd)	10 (6/2 nd) (2/4 th) (2/5 th)	10 (9/1 st) (1/2 nd)	10 (8/1 st) (2/2 nd)
4000 ppm	10 (1/1 st) (9/2 nd)	10 (10/2 nd)	10 (9/1 st) (1/2 nd)	10 (9/1 st) (1/2 nd)
8000 ppm	10 (10/1 st)	10 (10/1 st)	10 (10/1 st)	10 (10/1 st)

The fraction within parenthesis indicates the number of dead animals as the numerator/the day of repeated exposure at death as the denominator.

経皮

Torkelson *et al.* (1976) の試験では、ウサギ(2 匹/群)の腹部の毛を刈り、1.0、2.0 もしくは 3.98 g/kg の用量のクロロホルムを塗布し、その周りを不浸透性のプラスチック製カフで気密に覆い、24 時間の単回適用を行った。その結果、死亡例は生じなかった。しかし、いずれの用量でも、広範囲にわたる皮膚の壊死と、かなりの体重減少が認められた。被験動物を、適用処置から 2 週間後に剖検した。被験物質が適用された全てのウサギにおいて、腎尿細管の退行性変化が、濃度に応じた重症度で認められた。肝臓には、肉眼的影響は認められなかった。全身的影響に関する経皮 LOAEL は、1.0 g/kg である(Torkelson *et al.*, 1976)。

経口

ラットの急性経口 LD₅₀ については、450～2000 mg/kg 体重の範囲の値が報告されている(Kimura *et al.*, 1971; Chu *et al.*, 1980、WHO, 2004 の中で引用)。雄の Wistar ラットに、クロロホルムを、オリーブ油を媒体として 0、67、135 もしくは 338 mg/kg 体重の用量で強制経口投与したところ、肝小葉中心領域における壊死性肝細胞数の用量依存的な増加と、血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)濃度の有意な上昇が認められた(Nakajima *et al.*, 1995、WHO, 2004 の中で引用)。

クロロホルムを、コーン油を媒体として 180 mg/kg/日の用量で、強制経口投与された雄の Osborne-Mendel ラットでは、腎腫瘍の発生が認められた(NCI, 1976) (IARC, 1999 の中で引用)。雄の F-344 ラットでは、クロロホルムにより、腎臓に、細胞毒性と再生性細胞増殖が誘発された(Templin *et al.*, 1996b)。雄の Osborne-Mendel ラットと F-344 ラットで、クロロホルムに対する急性感受性を比較するため、両系統のラットに、0、10、24、90、180 もしくは 477 mg/kg 体重の用量で、クロロホルムが単回強制経口投与され、48 時間後に剖検が行われた。標的であることが分かっている組織について、組織学的変化が調べられた。再生性細胞増殖については、細胞核へのプロモデオキシウリジン取り込みを測定して標識率("labeling index" LI、すなわち S 期細胞の割合)を求めることで検討された。腎皮質の近位尿細管の上皮細胞が、細胞毒性および再生性細胞増殖の主要な標的細胞であった。腎臓における LI の用量依存的な増加が、Osborne-Mendel ラットでは 10 mg/kg 以上の群で、F-344 ラットでは 90 mg/kg 以上の群で認められた。LI は、477 mg/kg 群で最も増加し、対照群と比較して、Osborne-Mendel ラットでは 4.5 倍、F-344 ラットでは 3.7 倍に達した。肝細胞における LI の増加は、F-344 ラットの 477 mg/kg 群でのみ認められた。両系統とも 90 mg/kg 以上の群で、鼻腔に浮腫と骨膜細胞の過形成が認められた。これらのデータから、Osborne-Mendel ラットと F-344 ラットは、クロロホルムによる腎毒性に対する感受性がほぼ同じであることが示唆される。これらの結果は、F-344 ラットにおけるクロロホルムの毒性の作用機序に関する広範囲に及ぶデータベースを、Osborne-Mendel ラットに結びつけるための

基盤となるものであり、また、Osborne-Mendel ラットにおける腎腫瘍の誘発には、クロロホルムによる細胞致死影響や再生性細胞増殖に続発する事象が介在しているという仮説を裏付けるものである。

Keegan *et al.* (1998) の試験では、90 日齢の雄の Fischer 344 ラットに、クロロホルムが、10% Alkamuls EL-620 を媒体として、14.9、22.4、29.8、59.7、89.5、119.4 もしくは 179.1 mg/kg 体重の用量(容量 5 mL/kg 体重)で、強制経口投与された。強制経口投与後 24 時間の時点で血液が採取され、血清における肝損傷の臨床生化学的指標の分析に供された。その結果、クロロホルムによる濃度依存性の肝毒性が認められ、179.1、119.4 および 59.7 mg/kg 群では、血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、およびソルビトールデヒドロゲナーゼが、対照群よりも有意に上昇していた。29.8、22.4 および 14.9 mg/kg 群では、測定したいずれの評価項目についても、対照群に比較して有意な増加は認められなかった。肝損傷の指標となる血清酵素変化に関し、30 mg/kg 体重という NOAEL が確立された。

マウスでも LD₅₀ の範囲は大きく、36~1366 mg/kg 体重という値が報告されている。クロロホルムによる死亡は、腎損傷によって死亡する非常に感受性の高い系統の雄のマウスを除き、肝損傷によるものが一般的である。そのような系統のマウス (DBA、C3H、C3Hf、CBA、Balb/c、C3H/He など) では、クロロホルムの急性毒性に対する高い感受性は、遺伝子的に制御されている。マウスでも、肝臓および腎臓の細胞増殖や病変が認められている (Gemma *et al.*, 1996; Reitz *et al.*, 1982; Moore *et al.*, 1982、WHO, 1994 の中で引用)。

In vitro 試験

試験の報告は得られていない。

4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

In vivo 試験

吸入

適切に管理しながら行われたクロロホルムへのヒトの曝露に関するデータのほとんどは、クロロホルムを麻酔剤として使用した臨床症例から得られたものである。クロロホルムの麻酔剤としての臨床適用は、1847 年にはすでに報告されている (Simpson, 1847)。空气中濃度が 24~73 g/m³ のクロロホルム蒸気の吸入によって、麻酔状態が誘発されると考えられる。麻酔状態の維持には、12~48 g/m³ の濃度が必要である。実験動物と同様に、ヒトも、

クロロホルム麻酔によって、呼吸性不整脈、心不整脈、呼吸不全ならびに心不全で死亡する可能性がある。クロロホルムは、比較的高い頻度で「遅発性クロロホルム中毒」(肝毒性)を引き起こすことから、麻酔剤としての使用は断念されている。

クロロホルムは、ヒトが 60 分間曝露された場合、9960 mg/m³(2000 ppm)の濃度で重篤な毒性作用を、2490 mg/m³(500 ppm)の濃度で病的症状を、249 mg/m³(50 ppm)以下の濃度で不快感を引き起こし得ると報告されている(Verschuieren, 1983、WHO, 1994 の中で引用)。ヒトにおけるクロロホルムの LOAEC は、249 mg/m³以下であると推定される。(リスク総合判定に際し、重要な報告として考慮。)

経皮

試験の報告は得られていない。

経口

Schröder(1965)は、自殺未遂後に重篤な中毒状態となり、麻酔使用後と同じ症状の推移が認められた事例を複数報告している。感受性にはかなりの個人差が認められ、7.5 g のクロロホルムを経口摂取して重病に陥った事例もあれば、270 g のクロロホルムを摂取したが生残した事例もある。成人における平均経口致死量は、約 45 g と推定される(Winslow & Gerstner, 1978、WHO, 1994 の中で引用)。体重を 70 kg と仮定すると、7.5g の経口摂取の例に基づいて、LOAEL は 107 mg/kg と推定される。(リスク総合判定に際し、重要な報告として考慮。)

Hakim *et al.*(1992)は、クロロホルムを飲み込み(量は不明)、半意識状態で嘔吐を繰り返し、病院に収容された 16 歳の女性の事例を報告している。胃洗浄、制酸剤、グルコース静注、および制吐薬による治療が行われ、回復したように見えたため、退院を許可された。7 日後、肝腫大、ヘモグロビン値のわずかな低下、肝臓の超音波画像の異常所見が認められ、クロロホルムにより中毒性肝疾患が引き起こされたことが示唆された(ATSDR, 1997)。

33 歳の女性が 0.5 mL のクロロホルムを自分で静脈内に注射し、意識不明になった事例が報告されている。女性は約 12 時間後に目を覚まし、さらに 120 mL のクロロホルムを飲んだ。その女性には、高圧酸素、シメチジン(シトクロム P-450 の阻害とホスゲン生成の阻害のため)、および N-アセチルシスチン(グルタチオン貯蔵量を回復させるため)による治療が行われた。肝臓の血清酵素のアルカリホスファターゼ(ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、および乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)が上昇し、その上昇パターンは、肝細胞壊死を示唆していた。これらの

酵素は、おおむね 4 日目までにピークに達し、11 日までに減少した。総ビリルビンと直接ビリルビンの変化は検出されなかった。クロロホルムの摂取後 6~8 日目に、GGT(ガンマグルタミルトランスフェラーゼ、別名ガンマグルタミルトランスペプチターゼ)、アルファフェトプロテイン、およびレチノール結合蛋白が増加したが、ヒトにおける正常範囲内であった(Rao *et al.*, 1993、ATSDR, 1997 の中で引用)。

腎臓も、ヒトにおけるクロロホルム誘発毒性の主要な標的である。3,755 または 2,410 mg/kg のクロロホルムを経口摂取してから 1 日後に、乏尿が認められた事例が報告されている(Piersol *et al.* 1933; Schroeder 1965)。血中尿素窒素(BUN)とクレアチニンの値が上昇したことからも、腎損傷が示唆された。尿からアルブミンと円柱が検出された。クロロホルムへの経口曝露により死亡した 1 件の事例では、剖検時の病理組織学的検査で、腎尿管において、上皮の腫脹、ヒアリン変性および脂肪変性が認められた(Piersol *et al.* 1933、ATSDR, 1997 の中で引用)。

In vitro 試験

試験の報告は得られていない。

4.1.2.2.3 急性毒性の要約

クロロホルムの急性毒性について、ラットおよびマウスで吸入および経口曝露のデータが、ウサギで経皮曝露のデータ得られている。ヒトにおいても、臨床適用と偶発的曝露の事例が、いくつか報告されている。

急性毒性は、実験動物の系統、性別、媒体によって様相が異なる。クロロホルムの経口 LD₅₀ 値は、マウスでは 36~1366 mg/kg 体重であるが、ラットでは 450~2000 mg/kg 体重である。マウスおよびラットにおけるクロロホルムの 6 時間吸入曝露の LC₅₀ 値として、それぞれ、6.2 g/m³ と 9.2 g/m³ の値が報告されている(WHO, 1994)。クロロホルムの急性毒性に対する感受性は、経口曝露、吸入曝露ともに、マウスの方がラットより高い。閉塞条件下でクロロホルムに経皮曝露されたウサギでは、広範囲にわたる皮膚の壊死と腎尿管の退行性変化が認められ、全身および局所的な影響に関する LOAEL として、1.0 g/kg の値が報告されている(Torkelson *et al.*, 1976)。ラットにおける経口 NOAEL として、30 mg/kg 体重という値が報告されており、これは肝損傷を示唆する血清酵素の変化という影響に関するものである。(Keegan *et al.*, 1998)。Osborne-Mendel ラットを用いた試験では、10 mg/kg 以上の群で、腎臓における標識率の用量依存的な増加が認められた(Templin *et al.*, 1996b)。

細胞毒性および再生性細胞増殖に関しては、腎皮質の近位尿細管の上皮細胞が、主要な標的細胞であった。

一般に、クロロホルムは、ヒトにおいても実験動物と同じ毒性症状を引き起こす。成人における平均経口致死量は約 45 g と推定されるが、感受性には大きな個人差がある。ヒトでは、吸入 LOAEC は 249 mg/m³ 以下 (Verschueren, 1983、WHO, 1994 の中で引用)、経口 LOAEC は 107 mg/kg 未満 (Winslow & Gerstner, 1978、WHO, 1994 の中で引用) と推定されている。(リスク総合判定に際し、重要な報告として考慮。)

急性毒性に関するデータに基づき、クロロホルムは、リスク警句 R22「飲み込むと有害」および R20「吸入すると有害」を付与して、「有害」に分類することが提案される。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 皮膚

動物における試験

皮膚に及ぼす刺激性影響を評価するために実施された試験の情報はほとんど得られていないが、クロロホルムが刺激性影響を及ぼすことは広く知られている。まず、クロロホルムは強い刺激性物質であり、また、1000 mg/kg の用量で 24 時間適用すると、中等度の皮膚壊死が発生した (Duprat *et al.*, 1976、WHO, 1994 の中で引用)。この試験は報告内容が乏しく、これ以上の詳細な情報は得られていない。

Torkelson *et al.* (1976) は、ウサギの皮膚にクロロホルムを適用し、軽微～中等度の刺激症状が生じること、および、擦過処置を施した皮膚の場合、その治癒が遅延することを明らかにした。クロロホルムをウサギの耳に非閉塞適用した場合には、1～4 回の適用で軽微な充血と表皮剥脱が認められたが、これより重度の損傷は、10 回適用しても認められなかった。同じウサギの腹部を剪毛して、クロロホルム浸漬綿パッドをあてて包帯で巻いた場合には、1 回または 2 回の 24 時間適用により、軽微な充血および中等度の壊死とそれに伴う焼痂の形成が認められた。この部位においても、擦過処置を施してクロロホルム浸漬綿パッドで 24 時間被覆した部位と同様に、治癒の遅延が認められた。2 匹のウサギの腹部を剪毛して、1.0、2.0 もしくは 3.98 g/kg のクロロホルムを塗布し、不浸透性のプラスチック製カフで機密に覆って 24 時間単回適用した場合は、いずれの濃度群でも、広範囲にわたる皮膚の壊死が認められた。

Chiaki *et al.* (2002)は、クロロホルムの感作試験において、刺激反応が認められたことを日本語で報告している(英語では要約のみ入手)。この試験は、クロロホルムの皮膚感作能を評価する目的でデザインされ、さらにモルモットマキシミゼーション・テスト(GPMT)と局所リンパ節アッセイ(LLNA、RI法)での結果の差を検討する目的で行われた。GPMTは、Magnusson and Kligman法に従って行われ、一方、LLNAは、Kimber法に従って行われた。試験の結果、どちらの方法でも、陽性反応は認められなかった。

ヒトにおける知見

クロロホルムに皮膚が接触すると、化学性皮膚炎(症状：刺激徴候、発赤、水疱形成および熱傷)が引き起こされる(WHO, 1994)。

4.1.2.3.2 眼

動物における試験

Duprat *et al.* (1976)は、New Zealand 白ウサギ 6 匹の眼に、クロロホルム原液を投与した。全てのウサギにおいて、散瞳や角膜炎とともに、重度の眼刺激症状が認められた。4 匹において角膜に半透明領域が認められ、化膿性・出血性滲出物も(例数は不明であるが)報告されている。これらの影響は、投与から 3 週間が経過しても角膜混濁が認められた 1 匹を除き、投与後 2~3 週間で消失した。

液体クロロホルムがウサギ 3 匹の眼に滴下投与された試験では、結膜に軽度の刺激症状が引き起こされ、これは投与から 1 週間後、かろうじて検出が可能であった。また、フルオレセイン染色による検査で、軽微であるが明確な角膜損傷も認められた。投与から 2 日後に、化膿性滲出物が認められた。クロロホルムの滴下から 30 秒後、各ウサギの片方の眼が流水で洗浄されたが、洗浄しなかった方の眼に比較して、反応に有意な相違は認められなかった(Torkelson *et al.*, 1976)。

ヒトにおける知見

液体クロロホルムと接触したヒトの事例で、灼熱感、流涙および結膜の炎症が報告されている。多くの事例で角膜への可逆的影響が認められ、それ以外の場合でも再生は速かった(3 週間未満)(Grant and Schuman, 1993)。

Oettel(1936)および Winslow and Gerstner(1978)によれば、高濃度のクロロホルム蒸気に曝露されると、眼部刺痛が引き起こされる。クロロホルムの液体がはねて眼に入ると、灼熱感、疼痛および結膜組織の発赤が引き起こされる。角膜上皮の損傷がしばしば認められるが、数日以内に完全に回復する(WHO, 1994)の中で引用)。

4.1.2.3.3 気道

動物における試験

クロロホルムに曝露されたラットとマウスにおいて、嗅上皮の病変や細胞増殖、および鼻腔の変化が認められている(Kasai *et al.*, 2002)。クロロホルム蒸気に2週間にわたり(500、1000、2000、4000もしくは8000 ppm、1日6時間、週5日)曝露されたマウスでは、雄に嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生が認められ、雌に嗅上皮および呼吸上皮の変性、壊死ならびに配列不整が認められた。マウスと同じ条件(500、1000、2000、4000もしくは8000 ppm、1日6時間、週5日、2週間)で曝露されたラットでは、いずれの濃度群でも、嗅上皮の剥離、萎縮、配列不整の他に、鼻腔の粘膜固有層の浮腫も認められた。この2週間試験におけるマウスおよびラットのLOAECは、500 ppm(2.5 g/m³)である。

同じ著者が、より低濃度でもう1件、13週間試験を行っている(マウスでは12、25、50、100もしくは200 ppm、ラットでは25、50、100、200もしくは400 ppm、1日6時間、週5日)(Kasai *et al.*, 2002)。鼻腔において、以下に述べる病変の有意な増加が認められた。マウスでは、25 ppm以上の群の雄で、嗅上皮の変性が認められ、12 ppm以上の群の雌で、鼻中隔の骨の肥厚と、嗅上皮および呼吸上皮の好酸性変化が認められた。ラットでは、雌雄とも、25 ppm群において、嗅上皮の石灰化と萎縮が認められ、200 ppm以上の群の雄で、壊死が認められた。鼻への影響に関しては、雌のマウスにおけるLOAECを12 ppm(60 mg/m³)、雄のマウスにおけるNOAECを12 ppm(60 mg/m³)、雌雄のラットにおけるLOAECを25 ppm(125 mg/m³)と導出することができる。

Larson *et al.*(1996、ATSDR, 1997の中で引用)は、雌のB6C3F1マウスを用いて、クロロホルム蒸気への急性曝露によって引き起こされる、肝臓や腎臓ならびに鼻腔における毒性影響および再生性細胞増殖について検討した。各群は、5匹ずつで構成され、0、0.3、2、10、30もしくは90 ppmのクロロホルムに、1日6時間、4日間連続して吸入曝露された。この試験では、クロロホルムに4日間曝露されたマウスに、明らかな毒性の臨床徴候は認められなかったが、10、30および90 ppm群で、鼻腔組織の後腹側領域に、軽度の一過性変化がいくつか認められた。病変は、骨の肥厚を伴う骨膜の軽度の増殖性反応を特徴とし、それに隣接する粘膜では、ボーマン腺の腺房消失と血管の鬱血も認められた。US EPA(2001)

は、この試験から、鼻腔病変に関する NOAEC を 90 ppm(450 mg/m³)と判定している。NOAEC としてこの値が選択されたことについて、これ以上の詳細な情報は示されていない。

雌雄の F-344 ラットを用いた試験では、被験動物が、0、2、10、30、90 もしくは 300 ppm のクロロホルムを含む空気に、1 日 6 時間、4 日連続して、または週 7 日で、3、6 もしくは 13 週間にわたり曝露された。追加の曝露群が設けられ、週 5 日で、13 週間にわたり曝露されるか、または 6 週間にわたり曝露された後 13 週目まで飼育された。クロロホルムによる鼻腔病変の重症度と種類は、曝露の濃度と期間の両方に依存していた。病変は主に、嗅上皮で覆われた鼻道の篩骨部に限局して認められた。曝露の初期の時点では、10 ppm 以上の群で、鼻の篩骨甲介において、骨増殖の亢進と固有層の細胞過形成が認められた。曝露が続くとともに、病変が、鼻の篩骨部全体にわたって認められるようになった。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。Table 4.21 参照。) 90 日の時点では、2 ppm 以上の群において、篩骨甲介全体の萎縮が認められた。LOAEC は 2 ppm とされた (Templin *et al.*, 1996a)。

雌の B6C3F1 マウスと雄の Fischer 344 ラットを用いた急性曝露試験では、クロロホルムが、被験動物の鼻部に、部位特異的な生化学的変化を引き起こす能力を有することが明らかにされた (Mery *et al.*, 1994, ATSDR, 1997 の中で引用)。生化学的変化を実証するため、マウスは 1.2、3、10、29.5、101 もしくは 288 ppm の濃度で、ラットは 1.5、3.1、10.4、29.3、100 もしくは 271 ppm の濃度で、1 日 6 時間、7 日間にわたりクロロホルムに曝露され、鼻腔の部位特異的病変や、細胞変化誘発・細胞増殖の発生頻度について、クロロホルム濃度との関連の観点から、検討が行われた。雄のラットでは、100 および 271 ppm 群で、鼻咽道の呼吸上皮杯細胞が増大しているのが認められた他、中性と酸性両方のムコ多糖体の増加も認められた。患部の上皮は、最大で正常値の 2 倍まで厚くなっていた。10.4 ppm 以上の群で、鼻腔内の骨新生が顕著に認められ、濃度反応関係を示していた。29.3 および 100 ppm 群では、第一内鼻甲介の起始部に骨棘の新生が認められ、271 ppm 群では、新生骨の幅は対照群のほぼ 2 倍であった。ボーマン腺の大きさは、著しく減少していた。シトクロム P-450-2E1 の染色では、対照群の嗅上皮支持細胞の細胞質とボーマン腺腺房細胞で、最も顕著な反応が認められた。全般的に、曝露された被験動物における P-450 染色量は、クロロホルム濃度の増加に伴って低下する傾向が認められた。クロロホルムへの曝露により、増殖性の反応を伴って S 期核の数が劇的に増加し、その増殖性反応は、骨形成(球形)細胞や前骨形成(紡錘形)細胞などの、活性化した骨膜細胞に限局して認められた。第一内鼻甲介の近位および中央領域で、細胞増殖が最も増強されていた。興味深いことに、雌のマウスで検出できた曝露に関連した組織学的変化は、第一内鼻甲介の近位部における骨新生の軽微な徴候だけであり、それは、288 ppm 群の 1 匹で認められたものであった。S 期核の

増加反応は、10.4 ppm 以上の群で認められた。著者らは、結論として、同様の鼻腔変化がヒトで生じれば、嗅覚が変化する可能性があるとしている。US EPA(2001)では、誘発された組織学的な細胞増殖に基づいて、NOAEC を 3 ppm としている。

ヒトにおける試験

No Data available データは得られていない。

4.1.2.3.4 刺激性の要約

クロロホルムは、皮膚、眼および上気道に対して刺激性を示す物質である。ウサギを用いた経皮試験では、軽微～強度の刺激性を有することが示された。ヒトでは、クロロホルムとの皮膚接触によって皮膚炎が生じた。液体クロロホルムを用いた動物試験では、重篤な眼刺激症状が認められている。これらの試験では様々な影響が報告されているが、ウサギを用いた 1 件の試験では、軽微であるが明らかな角膜損傷が認められている。ヒトでは、眼が液体クロロホルムと接触した事例で、角膜上皮に一過性損傷が引き起こされた。反復曝露試験では、主として嗅上皮における刺激作用やクロロホルム誘発性病変ならびに細胞増殖が報告されているが、骨増殖も報告されている。マウスとラットの気道では、クロロホルムの吸入によって、嗅上皮と鼻腔に病変や細胞増殖が生じた。初期(曝露 4 日)の時点で鼻篩骨甲介の固有層に認められた骨増殖亢進と細胞過形成に基づき、それらの影響に関するラットの LOAEC として、10 ppm(50 mg/m³)という値が報告されている(Templin *et al.*, 1996a)。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。)

Table 4.18 Study summary for irritation

Animal species & strain	Number of animals	Doses	Result	Reference
Rabbit Dermal	Not reported	Liquid chloroform 24h, occlusive 10 applications for ears 2 applications for bellies	ear: hyperemia and exfoliation after 1 to 4 applications belly: slight hyperemia with moderate necrosis and eschar formation delayed healing of the skin	Torkelson et al., 1976 in WHO 2004
Rabbit, NZW Ocular	6	Undiluted chloroform, doses not specified	6/6 severe eye irritation, with mydriasis and keratitis 4/6 translucent zones in the cornea	Duprat et al., 1976
Rabbit Ocular	3	Undiluted chloroform, doses not specified 1 eye rinsed after 30s	Slight irritation of the conjunctiva slight but definite corneal injury	Torkelson et al., 1976
Rat, F344 Inhalation	10/sex/dose	vapour, 6h/d, 5d/week, 13 weeks 25, 50, 100, 200, 400 ppm	25 ppm (125 mg/m ³): mineralization and atrophy of the olfactory epithelium 200 ppm (1000 mg/m ³): necrosis of olfactory epithelium in males	Kasai et al., 2002
Rat, F344 Inhalation	10/sex/dose	vapour, 6h/d, 5d/week, 2 weeks 500, 1000, 2000, 4000, 8000 ppm	All doses desquamation, atrophy and disarrangement of the olfactory epithelium, edema of the lamina propria of the nasal cavity	Kasai et al., 2002
Rat, F344 Inhalation	Not reported	1.2, 3, 10, 29.5, 101, and 288 ppm 6 hr/day for 7 days	NOAEC= 3 ppm (15 mg/m ³) atrophy of Bowman's glands, new bone formation, and increased labeling index in S phase periosteal cells	Mery et al., 1994
Rat, F-344 rats Inhalation	10/sex/dose	0, 2, 10, 30, 90, or 300 ppm 6 h/day, 7 d/week or 5d/week, 13 weeks	Early time points (4 days) LOAEC= 10 ppm Enhanced bone growth, hypercellularity in the lamina propria 13 weeks LOAEC= 2 ppm Enhanced bone growth hypercellularity in the lamina propria of the ethmoid turbinates	Templin et al., 1996a

Animal species & strain	Number of animals	Doses	Result	Reference
Mouse, BDF1 Inhalation	10/sex/dose	vapour, 6h/d, 5d/week, 13 weeks 12, 25, 50, 100, 200 ppm	25 ppm (125 mg/m ³): degeneration of the olfactory epithelium in males 12 ppm (60 mg/m ³): thickening of the bone in nasal septum, eosinophilic changes of olfactory and respiratory epithelia in females	Kasai et al., 2002
Mouse, B6C3F1 Inhalation	10/sex/dose	vapour, 6h/d, 5d/week, 2 weeks 500, 1000, 2000, 4000, 8000 ppm	All doses atrophy and respiratory metaplasia of olfactory epithelium in males degeneration, necrosis and disarrangement of olfactory and respiratory epithelia in females	Kasai et al., 2002
Mouse, B6C3F1 Inhalation	Female	0.3, 2, 10, 30, and 90 ppm 6 h/d, 4 days	NOAEC = 90 ppm (441 mg/m ³) nasal lesions	Larson et al., 1996
Mouse, B6C3F1 Inhalation	Not reported	1.2, 3, 10, 29.5, 101, and 288 ppm 6 hr/day for 7 days	NOAEC= 3 ppm (15 mg/m ³) increased labeling index in S phase periosteal cells	Mery et al., 1994

得られたデータに基づき、クロロホルムは、リスク警句 R38「皮膚に刺激性がある」、R36「眼に刺激性がある」、および R37「呼吸器系に刺激性がある」を付与して、「刺激性物質」に分類することが提案される。

4.1.2.4 腐食性

データは得られていない。

4.1.2.5 感作性

クロロホルムについては、職業曝露による感作事例やヒトを対象とした感作試験の報告が見当たらず、ヒトにおける感作性に関するデータは得られなかった。

クロロホルムの感作性試験について、日本語で報告されており (Chiaki *et al.*, 2002)、英語ではその要約のみが入手できている。この試験は、クロロホルムの皮膚感作能を評価する目的でデザインされ、さらにモルモットマキシミゼーション・テスト (GPMT) と局所リンパ節

アッセイ (LLNA、RI 法)での結果の差を検討する目的で行われた。GPMT は、Magnusson and Kligman 法に従って行われた。クロロホルムと免疫賦活剤のフロイント完全アジュバントが、モルモット 5 匹に、一次感作処置として皮内投与された(1 日目)。感作を増強するため、二次感作処置として 10%ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)が非閉塞適用され、その翌日に、クロロホルムが、閉塞パッチの形で 48 時間適用された(パッチ感作処置は 9 日目であった)。感作惹起の際には、無曝露のモルモットのうち 3 匹が対照群として用いられ、感作群のモルモット 5 匹と共に、クロロホルムが、前述と同様に閉塞パッチにより 24 時間適用された(22 日目)。感作惹起の開始から 48 および 72 時間後に、Draize 基準に従って評価が行われた。クロロホルムの皮内投与(1 日目)の後、二次感作処置の時点(9 日目)で、対照群と比較して、有意な体重増加抑制が認められた($P < 0.01$)。皮内投与翌日から、クロロホルムが投与された部位に広範な壊死が認められ、皮内投与後 1 週間の間、立毛と自発運動低下が認められた。感作惹起開始から 48 および 72 時間後の評価では、対照群を含む 8 匹すべてにおいて、紅斑(スコア 1 または 2、軽微～軽度)が認められた。感作惹起部位に生じたこの反応は、感作惹起開始から 8 日目まで認められ、対照群を含む 8 匹すべてにおいて、時間の経過とともに紅斑が強くなる傾向も認められた。このことから、クロロホルムは、強い刺激性を有する有機塩素系溶剤であることが確認された。この強い刺激反応のため、感作性を明確に評価することはできなかったが、皮膚反応はクロロホルム感作群と対照群とで同等であったことから、GPMT では、クロロホルムの感作性は陰性と判定された。

一方、LLNA は、Kimber 法に従って行われた。LLNA では、ヘキシルシンナムアルデヒド(HCA)が、陽性対照物質として用いられた。HCA は、クロロホルムもしくはアセトン・オリーブ油混合溶媒(AOO、アセトン:オリーブ油 = 4:1) に、いずれも 10%の濃度になるように溶解されて用いられた。マウス(5 匹/群、4 群)に、クロロホルム、AOO、10% HCA/クロロホルムもしくは 10% HCA/AOO が、一方の耳につき 25 μL の用量で、両耳介に 3 日間連続して塗布された。塗布から 3 日後、250 μL (2.96 MBq/mL) の ^3H -メチルチミジンが静脈内投与された。その 5 時間後に、マウスは頸椎脱臼法により安楽死され、耳介リンパ節が摘出され、HCA に対する反応が、クロロホルムを溶媒とした場合、および AOO を溶媒とした場合とで比較された。次にリンパ節から細胞が分離されて細胞懸濁液が調製され、ベータシンチレーションカウンターによる放射活性の測定が行われた。LLNA における評価は、刺激指数(SI)の算出により行われた。SI は、各被験物質の投与群における測定値の平均を、溶媒投与群(AOO 投与群やクロロホルム投与群)における測定値の平均で割って、算出された。クロロホルム単独の場合の SI は、AOO を溶媒投与群とした場合の値を用いて算出された。SI が 3 以上で、溶媒対照群と統計的に有意な差がある場合が、感作陽性と判定された。LLNA では、クロロホルムの方が、AOO より高い放射活性を示した。LLNA では、感作の指標としてリンパ球の増殖活性が用いられているが、リンパ球の増殖は、一次刺激

によっても炎症性サイトカインの作用を介して活性化され、生じた反応を区別することは難しいと言われている。この試験において認められたクロロホルムに対する反応は、感作によるものではなく、一次刺激によるものである可能性が非常に高い。

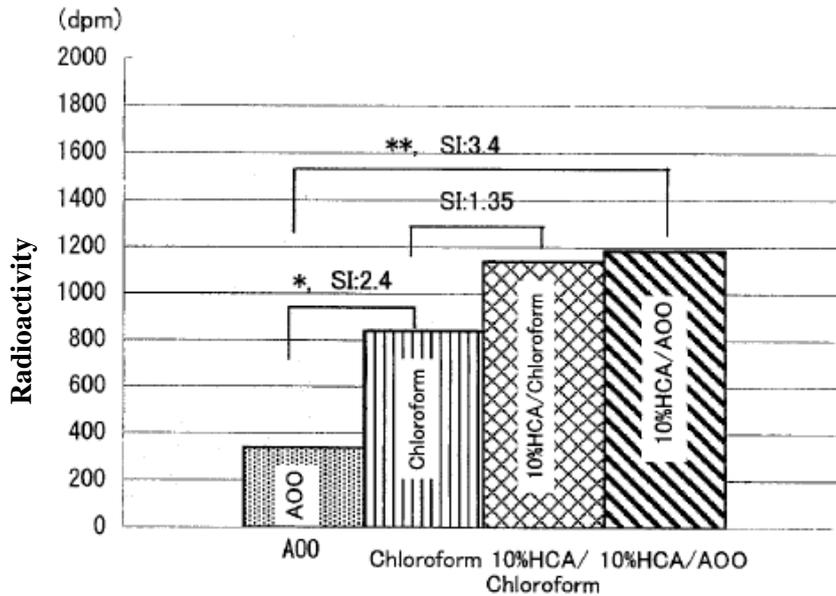


Figure 4.2 Comparison of LLNA radioactivity by difference in vehicle (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

感作性については、分類は提案されない。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物における試験

In vivo 試験

吸入

雄の F-344 ラットを、クロロホルム蒸気に 1、3、10、30、100 もしくは 300 ppm の濃度で 1 日 6 時間、連続 7 日吸入曝露し、8 日目に剖検を行い、クロロホルムへの 1 週間吸入曝露による毒性が調べられた (Larson *et al.*, 1994)。その結果、小葉中心部肝細胞の腫脹と軽度の空胞化が認められたことから、肝病変に関する NOAEC が 30 ppm (150 mg/m³)、近位尿細管が再生上皮に覆われているのが認められたことから、腎臓への影響に関する NOAEC が 100 ppm (500 mg/m³) と、それぞれ導出された。この他、ラット鼻腔の組織学的変化に関する NOAEC として、3 ppm (15 mg/m³) という値も示されている。

雌の B6C3F1 マウスを、クロロホルム蒸気に 1、3、10、30、100 もしくは 300 ppm の濃度で 1 日 6 時間、連続 7 日間曝露し、8 日目に剖検を行い、クロロホルムへの 1 週間吸入曝露による毒性が調べられた (Larson *et al.*, 1994)。その結果、肝細胞の壊死と空胞化が認められたことから、肝臓への影響に関する NOAEC が 10 ppm (50 mg/m³)、近位尿細管が再生上皮に覆われているのが認められたことから、腎病変に関する NOAEC が 100 ppm (500 mg/m³) と、それぞれ導出された。鼻の病変は、マウスでは認められなかった。

F344 ラットを、500、1000、2000、4000 もしくは 8000 ppm の濃度のクロロホルム蒸気に 1 日 6 時間、週 5 日、2 週間にわたり曝露した試験では、1000 ppm 以上の群において、雌雄両方が 48 時間以内にすべて死亡した。死亡したラットでは、おそらく心血管系毒性によるものと思われる、肺のうっ血と炎症が認められた。生き残った被験動物で、腎近位尿細管と肝中央部の空胞変化が認められたことに基づき、LOAEC は 500 ppm (2.5 mg/L) と判定された (Kasai *et al.*, 2002)。

BDF1 マウスを、500、1000、2000、4000 もしくは 8000 ppm の濃度のクロロホルム蒸気に 1 日 6 時間、週 5 日、2 週間にわたり曝露した試験では、雄は雌よりも、毒性に対する感受性が高かった。クロロホルムによって、雄では腎近位尿細管における壊死と細胞質の好塩基球増加が、雌では肝臓の小葉中心性壊死が生じた。2000 ppm 以上の群では、2 日以内の死亡率が雌雄とも 100% で、死因は、組織学的には、雄では近位尿細管の壊死、雌では肝臓の小葉中心性壊死であった。生き残ったで認められた病理組織学的変化に基づき、雄における腎臓の病変に関する LOAEC と雌における肝臓の病変に関する LOAEC として、500 ppm (2.5 mg/L) という値が導出された (Kasai *et al.*, 2002)。

ラットおよびマウス (それぞれ雌雄 10 匹ずつ、5 群) を用いて、クロロホルム蒸気への吸入曝露試験が実施されている。マウスは 12、25、50、100 もしくは 200 ppm の濃度で、ラットは 25、50、100、200 もしくは 400 ppm の濃度で、1 日 6 時間、週 5 日、13 週間にわたり曝露された (Kasai *et al.*, 2002)。曝露開始翌日の時点で、ラットと雌のマウスに死亡は見られなかったが、雄のマウスはほぼすべてが死亡した。クロロホルムが誘発したマウスの死亡の原因は、病理組織学的には、雄が腎近位尿細管壊死、雌が肝臓の小葉中心性壊死であった。生き残ったマウスのうち、雄では、腎尿細管における壊死と細胞質の好塩性増高および嗅上皮における壊死が、雌では、肝臓における壊死および鼻部における病変が認められた。ラットでは、雌雄ともに、腎病変 (近位尿細管の空胞変化)、肝損傷 (肝細胞消失やセロイド沈着)、鼻部病変が認められた。肝臓への影響に関し、ラットおよびマウスにおける NOAEC は、雌が 50 ppm (248 mg/m³)、雄が 100 ppm (496 mg/m³) であった。腎臓への影響に関しては、雄のマウスにおける LOAEC が 12 ppm (60 mg/m³)、雌のラットにおける NOAEC が、腎臓での空胞形成に基づいて、100 ppm (500 mg/m³) であった。鼻部病変に関しては、マウスにおける LOAEC が雌雄ともに 12 ppm (60 mg/m³)、ラットにおける

LOAEC が雌雄ともに 25 ppm (124 mg/m³) であった。

Templin *et al.* (1996a) の試験では、雌雄の F-344 ラットが、クロロホルムを 0、2、10、30、90 もしくは 300 ppm の濃度で含む空気に曝露された。雄のラットについては 4 日間、3、6、または 13 週間にわたり曝露される群が、雌のラットについては 3 週間または 13 週間にわたり曝露される群が設けられた。いずれの場合も、1 日 6 時間、週 7 日で曝露が実施された。週 7 日の曝露による影響を、通例の週 5 日の曝露による影響と比較するため、別の群が設けられ、30、90 もしくは 300 ppm の濃度で、1 日 6 時間、週 5 日で 13 週間にわたる曝露が実施された。クロロホルムに起因する変化の可逆性を調べるため、さらに別の群が設けられ、90 ppm ないしは 300 ppm のクロロホルムへの 1 日 6 時間、週 7 日で 6 週間にわたる曝露が実施され、その後の 7 週間は対照用チャンバー内で飼育された (6 週間曝露、曝露停止、7 週間維持飼育)。ラットの一部には、BrdU を投与して S 期の細胞を標識し (標識群)、それ以外のラットには BrdU を投与しなかった (非標識群)。

EURAR CHLOROFORM

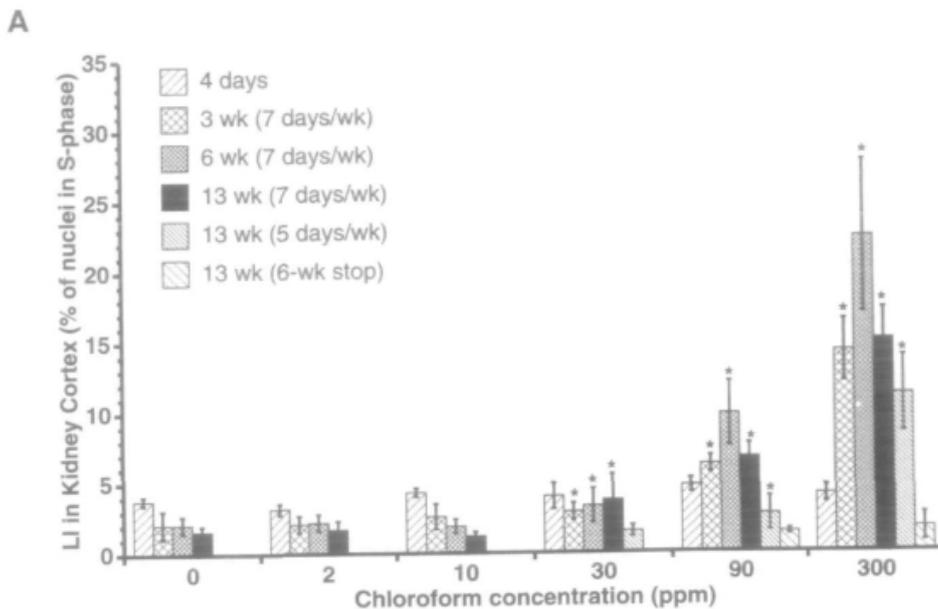
Table 4.19 Kidney Lesion Scores and Incidence in Male or Female F-344 Rats Exposed to Chloroform Vapors (Templin et al., 1996a)

Concentration (ppm)	4 days	3 weeks 7 days/week	6 weeks 7 days/week	13 weeks 7 days/week	13 weeks 5 days/week	13 weeks 6-week stop
Male rats						
0	0.0 (0.5) ^a	0.3 (4/13)	0.1 (1/12)	0.6 (8/14)	0.6 (8/14) ^b	0.6 (8/14) ^b
2	0.0 (0/5)	0.4 (5/13)	0.3 (4/13)	0.8 (10/15)	c	c
10	0.0 (0/5)	0.5 (6/13)	0.6 (8/13)	0.5 (7/15)	c	c
30	0.2 (1/5)	0.9 (12/13)	1.0 (11/13)	0.6 (9/14)	0.1 (2/15)	c
90	0.4 (2/5)	1.0 (10/10)	0.5 (5/10)	1.2 (14/15)	0.6 (6/13)	1.1 (8/8)
300	1.0(5/5)	1.9 (10/10)	2.0 (10/10)	1.4 (14/14)	2.8 (13/13)	1.4 (8/8)
Female rats						
0	—	0.0 (0/8) ^a	—	0.4 (6/14)	0.4 (6/14) ^b	0.4 (6/14) ^b
2	—	0.5 (4/8)	—	0.7 (10/15)	c	c
10	—	1.0 (8/8)	—	0.7 (10/15)	c	c
30	—	1.4 (8/8)	—	0.8 (12/15)	1.8 (13/13)	c
90	—	1.4 (5/5)	—	0.7 (10/15)	0.4 (5/13)	0.9 (7/8)
300	—	1.2 (5/5)	—	1.1 (14/14)	1.4 (13/13)	0.8 (6/8)

a: Chloroform-induced kidney histopathological changes were scored qualitatively for severity as follows: 0 = within normal limits, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, where 1 through 4 indicate increasing severity of the lesions ranging from vacuolation of proximal cell tubule (PCT) epithelium, enlarged PCT nuclei, pyknotic PCT nuclei, to individual tubule cell necrosis. Detailed descriptions of the lesions are given under Results. The first number in each box is the mean lesion score for the entire group of animals. The ratio in parentheses is that of the number of animals presenting with a lesion score of 1 or greater, relative to the total number of animals evaluated in that group.

b: Control animals are the same for all the 13-week studies.

c: Animals were not exposed at these time points.



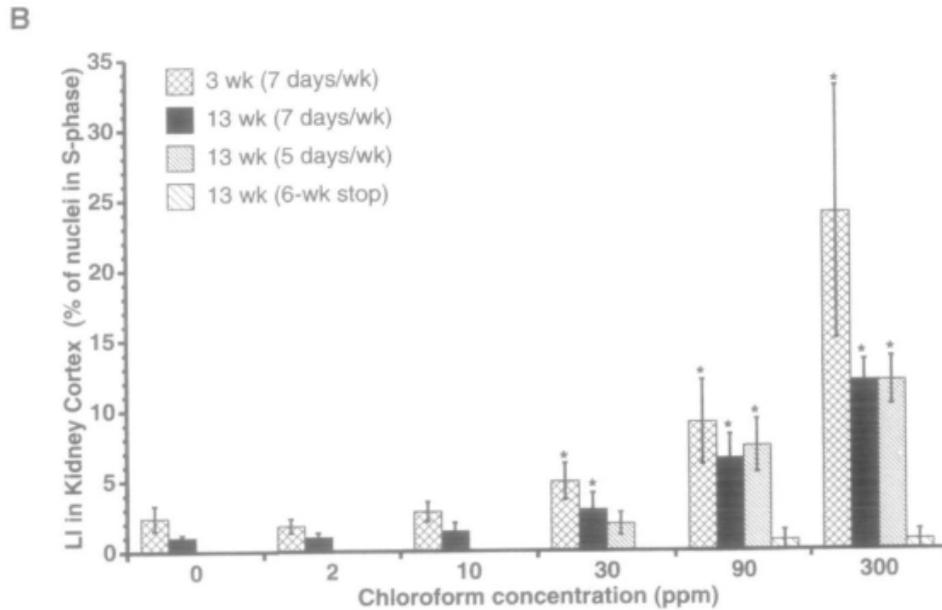


Figure 4.3 Labeling index (LI) in the kidney cortex of (A) male or (B) female F-344 rats exposed to chloroform vapors for 4 days or 3, 6, or 13 weeks (males) or 3 or 13 weeks (females).

Bars represent the mean LI \pm SD ($n = 5-10$ rats per group). The LI is the percentage of nuclei in S-phase identified in histological sections stained immunohistochemically for BrdU. Rats were exposed 6 hr/day for 7 or 5 days/week. Additional rats were exposed for 6 hr/day, 7 days/week for 6 weeks and then housed in the control chambers for the remaining 7 weeks (6-week stop).

Asterisks (*) denote groups that were statistically different from exposure- and duration-matched control groups (Williams test, $p < 0.05$).

クロロホルム蒸気に曝露されたラットの雌雄両方において、腎臓に影響が認められ、影響を受けたラットの数、組織学的変化の重症度、および標識率(LI)は、明らかに曝露濃度に依存して増加していた。6週間にわたり曝露された後、13週目まで飼育されたラットでは、雌雄のいずれにも細胞増殖の増高が認められなかったことから、細胞の増殖性反応は、クロロホルムの有無によって左右されていること、および、細胞死が繰り返された結果による再生性増殖を意味していることが示唆された。この試験では、雌雄のラットにおける、腎皮質の近位尿細管内部への影響に関するNOAECとして、10 ppmという濃度が導出された。10 ppmの濃度で週7日曝露したラットでは、雌雄いずれにおいても、顕微鏡的变化も近位尿細管上皮内のLIの増加も認められなかった。

EURAR CHLOROFORM

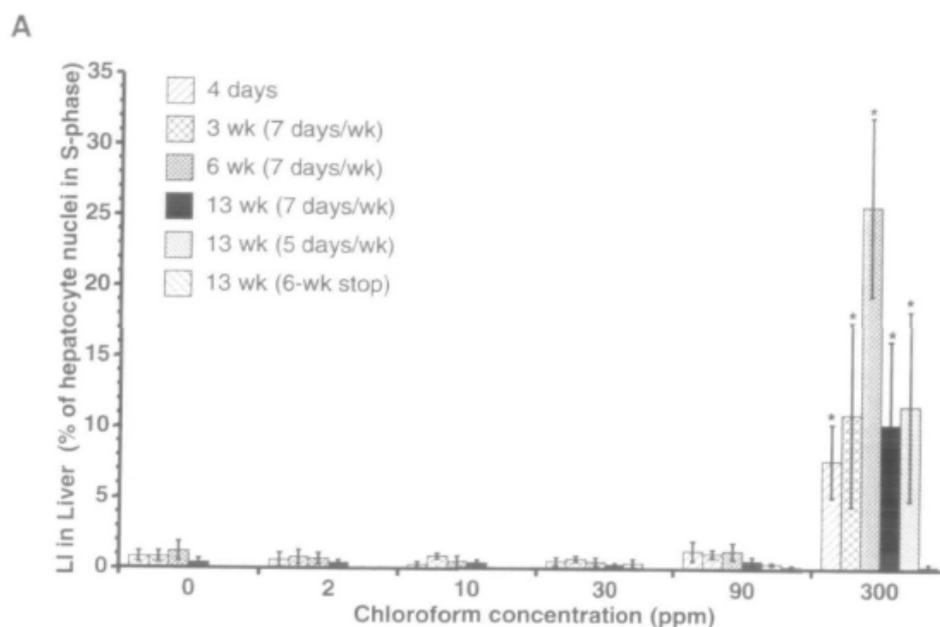
Table 4.20 Hepatic Lesion Scores and Incidence in Male or Female F-344 Rats Exposed to Chloroform Vapors (Templin et al., 1996a)

Concentration (ppm)	4 days	3 weeks 7 days/week	6 weeks 7 days/week	13 weeks 7 days/week	13 weeks 5 days/week	13 weeks 6-week stop
Male rats						
0	0.0 (0/5) ^a	0.0 (0/13)	0.2 (2/12)	0.1 (1/15)	0.1 (1/15) ^b	0.1 (1/15) ^b
2	0.0 (0/5)	0.0 (0/13)	0.1 (4/13)	0.2 (3/15)	c	c
10	0.4 (2/5)	0.1 (1/13)	0.2 (3/13)	0.0 (0/15)	c	c
30	0.4 (2/5)	0.0 (0/13)	0.0 (0/13)	0.1 (2/15)	0.0 (0/13)	c
90	0.3 (1/4)	0.2 (2/10)	0.3 (3/10)	1.0 (14/15)	0.3 (4/13)	0.0 (0/8)
300	0.0 (0/5)	1.8 (10/10)	2.0 (10/10)	3.9 (15/15)	2.4 (13/13)	0.0 (0/8)
Female rats						
0	—	0.0 (0/8) ^a	—	0.1 (1/14)	0.1 (1/15) ^b	0.1 (1/15) ^b
2	—	0.0 (0/8)	—	0.1 (1/14)	c	c
10	—	0.0 (0/8)	—	0.0 (0/14)	c	c
30	—	0.4 (3/8)	—	0.0 (0/15)	0.0 (0/13)	c
90	—	0.8 (4/5)	—	0.8 (12/15)	0.3 (4/13)	0.1 (1/8)
300	—	2.0 (5/5)	—	3.0 (15/15)	2.0 (13/13)	0.0 (0/8)

a: Chloroform-induced liver histopathological changes were scored qualitatively for severity as follows: 0 = within normal limits, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, where 1 through 4 indicate increasing severity of the lesions ranging from hepatocyte vacuolation, degenerative changes in hepatocytes, to hepatocyte necrosis. Detailed descriptions of the lesions are given under Results. The first number in each box is the mean lesion score for the entire group of animals. The ratio in parentheses is that of the number of animals presenting with a lesion score of 1 or greater, relative to the total number of animals evaluated in that group.

b: Control animals are the same for all the 13-week studies.

c: Animals were not exposed at these time points.



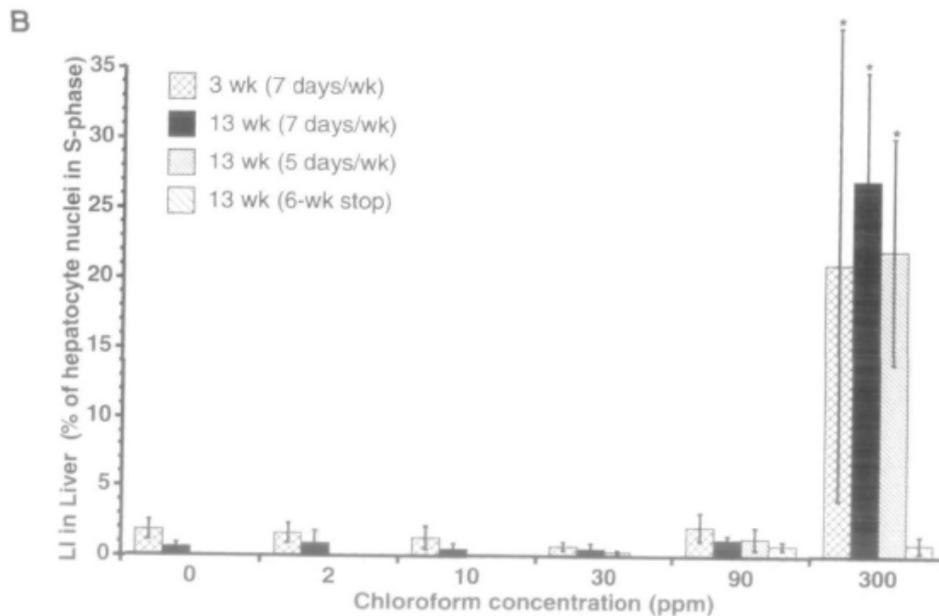


Figure 4.4 Hepatocyte labeling index (LI) in the livers of (A) male or (B) female F-344 rats exposed to chloroform vapors for 4 days or 3, 6, or 13 weeks (males) for 3 or 13 weeks (females).

Bars represent the mean LI \pm SD (n = 5-10 rats per group). The LI is the percentage of nuclei in S-phase identified in histological sections stained immunohistochemically for BrdU. Rats were exposed 6 hr/day for 7 or 5 days/week. Additional rats were exposed for 6 hr/day, 7 days/week for 6 weeks and then housed in the control chambers for the remaining 7 weeks (6-week stop).

Asterisks (*) denote groups that were statistically different from exposure- and duration-matched control groups (Williams test, $p < 0.05$).

肝細胞の変化は、雄においては 300 ppm 群と 90 ppm 群のラットでのみ認められ、300 ppm 群はすべての時点で、90 ppm 群では後半の時点で認められた。300 ppm で週 7 日曝露されたラットには、散在的で単細胞性の肝細胞変性、有糸分裂像、小葉中間帯の空胞化などの顕微鏡的所見が認められた。

300 ppm のクロロホルムに曝露された雌ラットの肝臓では、胆管周囲の線維化を伴う腸陰窩様腺管を特徴とする病変が、劇的に増加した。顕微鏡観察によって、病変が、腺構造を特徴とし、円柱上皮と杯細胞に覆われ、結合組織に取り囲まれているのが認められた。この病変の出現度と重症度は、肝の右葉と尾状葉において最も高かった。肝臓における変化の重症度は、雌のラットの方が、雄のラットよりも高かった。

鼻部の病変は主に、嗅上皮に覆われた鼻腔の篩骨部に限局して認められた。曝露の早い時点で、篩骨甲介の腹側と外側の領域に変化が認められたが、鼻甲介および鼻中隔の中央側面に変化は認められなかった。曝露期間が長くなるとともに、病変が鼻の篩骨部全体にわたって認められるようになった。鼻腔前部と呼吸上皮に覆われた後部では、比較的わずかな変化しか認められなかった。病変は、特定の曝露濃度や曝露期間の群では、ほとんどのラットで認められ、その種類、重症度および分布状況には、一貫性が認められた (Table 4.21

EURAR CHLOROFORM

を参照)。クロロホルム蒸気に 3 週間または 13 週間にわたり曝露されたラットでは、鼻腔に増殖性および萎縮性の変化が引き起こされたが、それらの変化は、雌雄のラットで同様に認められた。(LOAEC は 2 ppm とされた。)

Table 4.21 Severity of Nasal Lesions in Male F-344 Rats Exposed to Chloroform Vapors (Templin et al., 1996a)

Concentration (ppm)	4 days	3 weeks 7 days/week	6 weeks 7 days/week	13 weeks 7 days/week	13 weeks 5 days/week	13 weeks 6-week stop
0	1.0 (5/5) ^a	1.3 (6/8)	0.0 (0/7)	0.0 (0/10)	0.0 (0/10) ^b	0.0 (0/10) ^b
2	1.0 (5/5)	1.4 (5/8)	1.0 (7/8)	1.1 (10/10)	c	c
10	1.4 (5/5)	2.4 (8/8)	1.9 (8/8)	2.0 (10/10)	c	c
30	2.0 (5/5)	2.4 (8/8)	2.1 (8/8)	2.0 (10/10)	1.8 (8/8)	c
90	3.0 (5/5)	2.8 (8/8)	3.0 (5/5)	2.5 (10/10)	2.0 (8/8)	2.1 (5/8)
300	3.8 (5/5)	3.0 (8/8)	3.0 (5/5)	2.9 (10/10)	3.0 (8/8)	2.9 (8/8)

a: Chloroform-induced histopathological changes in the ethmoid region of the nasal passage were scored qualitatively for severity as follows: 0 = within normal limits, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, where 1 through 4 indicate increasing severity of the lesions. Nasal sections from rats exposed for 4 days or 3 weeks were assigned severity scores for lesions in the lamina propria ranging from edema and loss of Bowman's gland, penosteal hypercellularity, to mineralization of the basal lamina. In rats exposed for 6 or 13 weeks, severity scores were assigned for lesions ranging from edema and loss of Bowman's glands, olfactory metaplasia, basal lamina mineralization, to generalized atrophy of the ethmoid turbinates. The first number in each box is the mean lesion score for the entire group of animals. The ratio in parentheses is that of the number of animals presenting with a lesion score of 1 or greater, relative to the total number of animals evaluated in that group.

b: Control animals are the same for all the 13-week studies.

c: Animals were not exposed at these time points.

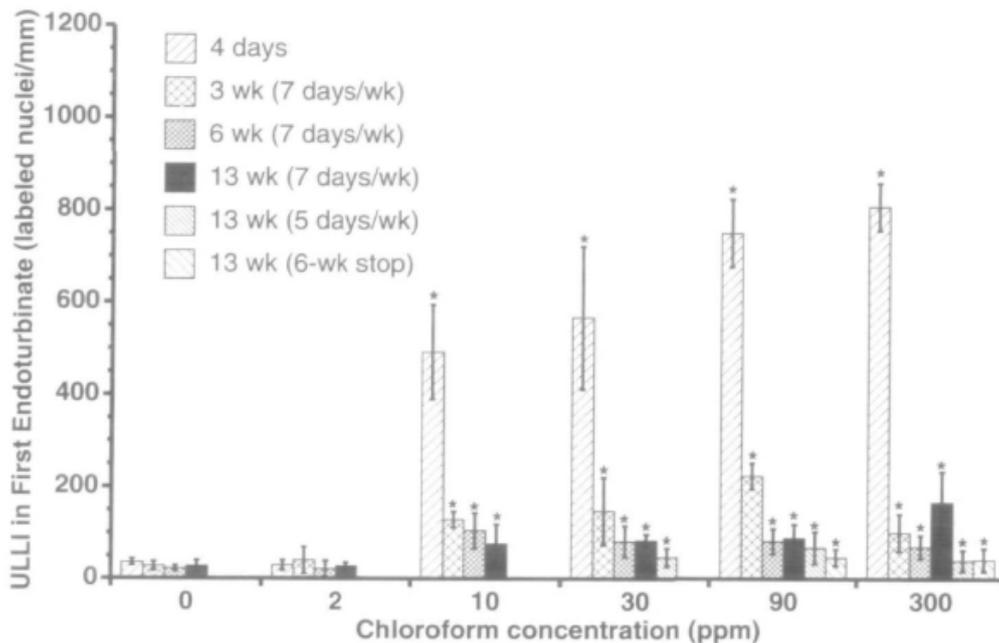


Figure 4.5 Unit length labeling index (ULLI) in the proximal portion of the dorsal scroll of the first endoturbinates of male F-344 rats exposed to chloroform vapors for 4 days or 3, 6, or 13 weeks.

Bars represent the mean ULLI \pm SD ($n = 5-10$ rats per group). The ULLI is the number of nuclei in S-phase in the lamina propria and adjacent periosteum. The underlying turbinate bone was used for determination of length. Rats were exposed 6 hr/day for 7 or 5 days/week. Additional rats were exposed for 6 hr/day, 7 days/week for 6 weeks and then housed in the control chambers for the remaining 7 weeks (6-week stop). Asterisks (*) denote groups that were statistically different from exposure- and duration-matched control groups (Williams test, $p < 0.05$).

Larson *et al.* (1996a) の試験では、雌雄の B6C3Fi マウスを群分けし、クロロホルムを 0、0.3、2、10、30 もしくは 90 ppm の濃度で含む空気に、1日6時間、週7日のスケジュールで、4日間、3、6、もしくは13週間にわたり、連続して曝露した。追加の群がいくつか設けられ、週5日で13週間の曝露、または週5日で6週間の曝露に供され、ともに13週間の時点で剖検に供された。剖検の3.5日前に浸透圧ポンプが埋め込まれ、そこからブロモデオキシウリジンが投与され、組織切片において、標識率(LI = S期細胞の比率)の評価が免疫組織化学的に実施された。全身を対象とした剖検と顕微鏡検査によって、雌雄のマウスの肝臓と鼻腔、および雄のマウスの腎臓に局限した病変が認められた。これらの病変は、曝露により誘発されたもので、曝露用量および曝露時間依存性を示していた。90 ppm 群では、肝臓の LI が大幅に増加し、その増加はすべての時点で認められ、持続性を示していた。雌のマウスは感受性が最も高く、クロロホルム誘発性の細胞増殖に関する NOAEC は 10 ppm であった。週5日間曝露群における肝臓の LI は、週7日曝露群の約半分であり、6週間曝露の後回復期間を設けた群では、正常なベースライン値への回復が認められた。腎臓の組織学的変化や再生性細胞増殖が、30 ppm で週7日曝露された群、90 ppm で週7日曝露された群、および 10 ppm で週5日曝露された群において、いずれも雄で誘発されていた。また、一過性の鼻部病変が、10、30 または 90 ppm で4日間曝露した群のみにおいて認められた。雌マウスにおいて、クロロホルムにより、壊死や再生性細胞増殖に付随した事象

に続発して肝臓がんが誘発されると仮定すると、この報告で示されている結果に基づき、雌マウスでは、NOAEC (10 ppm) 以下で肝臓がんは増加しないものと予想される。

BDF1 マウス (8 匹/群) を用いて、吸入によるクロロホルムの 13 週間 (1 日 6 時間、週 5 日) 曝露試験が行われている (Templin *et al.*, 1998)。クロロホルム濃度が 30 ppm と 90 ppm の空気は、雄の BDF1 マウスに対し腎毒性や致死性を示すため、以下に述べる生物検定や試験においては、漸増や馴化の措置がとられている。1 および 5 ppm 群の雄は、クロロホルム蒸気に 3、7 もしくは 13 週間曝露された。30 ppm 群の雄の曝露は、まず 5 ppm で 2 週間、次に 10 ppm で 2 週間行われ、その後、それぞれ 7 週間もしくは 13 週間までの残りの期間については 30 ppm で行われた。90 ppm 群の雄の曝露は、まず 5 ppm で 2 週間、次に 10 ppm で 2 週間、さらにその次に 30 ppm で 2 週間行われ、その後、それぞれ 7 週間もしくは 13 週間までの残りの期間については 90 ppm で行われた。雌の BDF1 マウスの曝露は、漸増措置がとられることなく、5、30 もしくは 90 ppm の濃度で、1 日 6 時間、週 5 日で 3 週間または 13 週間にわたり実施された。クロロホルム誘発性の病変や再生性細胞増殖について、標識率 (LI = S 期細胞の比率) 測定を行い、顕微鏡的検査と免疫組織化学的検査によって評価した。主要な変化として、近位尿細管上皮の一部または大半の細胞が、好塩基性細胞質と大小不同で異質染色性の核を特徴とする、再生性の細胞に置き換わっているのが認められた。まれに、近位尿細管に壊死細胞残屑が認められた。雌の腎臓には、曝露群と対照群で差は認められなかった。

Table 4.22 Histopathological changes and scores in the kidneys of male BDF1 mice exposed to chloroform (Templin *et al.*, 1998)

Chloroform concentration (ppm)	Histopathological scores ^a		
	3 weeks	7 weeks	13 weeks
0	0	0.2	0
1	0.25	0.2	0.25
5	0	0.2	0.25
30		3	2.75
90		3.4	2.75

a: Chloroform-induced kidney histologic changes were scored qualitatively for severity as follows: 0 = within normal limits; 1 = minimal changes, 1–10% of cortex affected with regenerating tubules; 2 = mild changes, ~25% of cortex affected with regenerating tubules; 3 = moderate changes, ~50% of cortex affected with regenerating tubules; and 4 = severe changes, over 75% of cortex affected with regenerating tubules.

30 および 90 ppm 群の雄では、曝露 7 週目と 13 週目の時点で、腎臓の LI に、有意かつ用量依存的な増加が認められた (Figure 4.6 を参照)。3 週目の時点では、これら 2 つの群は、プロトコル上、まだ用量漸増段階にあった。13 週目の時点で、30 および 90 ppm 群の雄では、腎臓の LI が、対照群に比較して、それぞれ約 16 倍および約 31 倍の高値を示した。1

および 5 ppm 群の雄では、いずれの時点でも、LI の増加は認められなかった。よって、最も感受性の高い毒性評価項目である腎毒性と腎腫瘍に関する NOAEC は、ともに 5 ppm である。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。) 雌では、いずれの時点およびいずれの曝露濃度でも、腎臓の LI の増加は認められなかった。

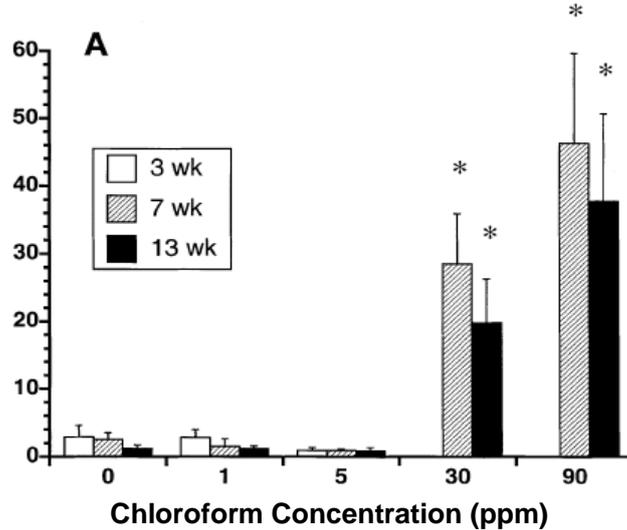


Figure 4.6 Labeling index (LI) in the kidney cortex and outer stripe of the outer medulla of male BDF1 mice exposed to chloroform vapors for 3, 7 or 13 weeks. Bars represent the mean LI \pm SD (animal-to-animal variation). The LI is the percentage of nuclei in S-phase identified in histological sections stained immunohistochemically for BrdU. Asterisks (*) denote groups that were statistically different from exposure- and duration-matched control groups (Williams test, $P < 0.05$). (Templin et al., 1998)

1 および 5 ppm 群の雄では、病理組織学的な変化は、いずれの時点においても認められなかった。30 ppm 群では、肝小葉中心性の腫脹が、曝露 7 週目の時点では 40% の雄で、曝露 13 週目の時点では 88% の雄で認められた。肝小葉の中心から中間帯の空胞化と変性が、90 ppm 群のすべての雄で、曝露 7 週目と 13 週目の両時点において認められた。

Yamamoto *et al.* (2002) は、マウスを用いてクロロホルムの慢性毒性試験を実施している。各群雌雄 50 匹ずつの BDF1 マウスが、5、30 もしくは 90 ppm のクロロホルム蒸気に、1 日 6 時間、週 5 日で 104 週間にわたり吸入曝露された。曝露群と対照群で、2 年生存率に差は認められなかった。腎臓の細胞質における塩基性の増高が、曝露群の雌雄両方で認められ、尿細管の異型過形成および腎臓における核肥大の発生率の増加が、曝露群の雄でのみ認められた (Table.4.23 を参照)。肝臓の脂肪性変化が、曝露群の雌雄両方で認められたが、変性細胞巣すべてについて見ると、その発生率は、曝露群の雌でのみ増加していた。さらに、骨の肥厚、および嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生が、雌雄のマウスの鼻腔で認められた。腎臓への影響に関する NOAEC は、5 ppm (25 mg/m³) であった。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。) 肝臓への影響に関する NOAEC は、30 ppm (150 mg/m³) であった。マウスでは、鼻部病変に関する LOAEC は、5 ppm (25 mg/m³) であった。

EURAR CHLOROFORM

Table 4.23 Incidences of selected non-neoplastic lesions in the liver and kidneys of mice exposed to chloroform vapor for 104 weeks (Yamamoto et al., 2002)

(A) Mice

Group	Male				Female			
	Control	5 ppm	30 ppm	90 ppm	Control	5 ppm	30 ppm	90 ppm
Number of animals examined	50	50	50	48	50	49	50	48
Liver								
Necrosis: central	0	0	0	3	1	0	1	2
Necrosis: focal	1	2	6	2	0	0	2	3
Fatty change	4	2	6	24**	0	0	0	6*
Total altered cell foci	10	1**	1**	5	0	1	2	6*
Clear cell foci	6	0*	0*	3	0	1	0	3
Basophilic cell foci	3	1	1	1	0	0	1	2
Mixed cell foci	1	0	0	1	0	0	1	1
Kidneys								
Nuclear enlargement: proximal tubules	0	3	43**	42**	0	0	0	4
Cyanoplasmic basophilia ^{a)}								
+	33	40	8*	9**	0	4	3	5*
2+	7	1	36	34	0	0	0	2
3+	0	0	2	0	0	0	0	0
Atypical tubule hyperplasia	0	0	11**	14**	0	0	0	0
Tubular necrosis: proximal tubules	0	0	1	2	1	0	0	0

Significant difference at $P \leq 0.05$ (*) and $P \leq 0.01$ (**) by Chi square test. a) The severity of cytoplasmic basophilia was qualitatively scored as follows: +, a few lesions involving a single tubule in the whole histological section; 2+, more than 4 lesions involving two or more tubules in the whole histological section; 3+, numerous lesions throughout whole section. b) The severity of chronic progressive nephropathy was classified into four different grades according to the criteria described by Kawai²¹⁾.

Yamamoto *et al.* (2002) は、同じ慢性試験をラットでも行っている。各群雌雄 50 匹ずつの F344 ラットが、10、30 もしくは 90 ppm のクロロホルム蒸気に、1 日 6 時間、週 5 日で 104 週間にわたり吸入曝露された。曝露群と対照群で、2 年生存率に差は認められなかった。曝露された雌雄のラットの腎臓で、核肥大と尿細管管腔拡張の発生率の増加が認められた (Table 4.24 参照)。雌のラットの肝臓で、空胞化細胞増殖巣の発生率の増加が認められた。さらに、骨の肥厚、および嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生が、雌雄のラットの鼻腔で認められた。ラットでは、腎臓への影響に関する NOAEC は 10 ppm (50 mg/m³)、肝臓への影響に関する NOAEC は 30 ppm (150 mg/m³) であった。鼻部病変に関する LOAEC は、10 ppm (50 mg/m³) であった。

Table 4.24 Incidences of selected non-neoplastic lesions in the liver and kidneys of rats exposed to chloroform vapor for 104 weeks (Yamamoto et al., 2002)

(B) Rats

Group	Male				Female			
	Control	5 ppm	30 ppm	90 ppm	Control	5 ppm	30 ppm	90 ppm
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	49
Liver								
Total altered cell foci	11	16	16	18	15	9	20	26
Clear cell foci	4	4	5	6	4	1	2	7
Asidophilic cell foci	2	5	2	3	0	1	0	1
Basophilic cell foci	4	6	8	8	7	5	10	4
Mixed cell foci	1	1	1	1	4	2	6	9
Vacuolated cell foci	0	0	0	0	0	0	2	5*
Kidneys								
Nuclear enlargement: proximal tubules	0	0	5*	32**	0	0	6*	34**
Dilatation: tubular lumen	0	0	9*	27**	0	0	5*	38**
Chronic progressive nephropathy ^{b)}								
+	3	11*	10**	17**	8	19**	27**	15**
2+	6	10	24	14	15	7	5	3
3+	19	15	8	2	14	3	3	1
4+	19	8	2	1	4	2	0	2

Significant difference at $P \leq 0.05$ (*) and $P \leq 0.01$ (**) by Chi square test. a) The severity of cytoplasmic basophilia was qualitatively scored as follows: +, a few lesions involving a single tubule in the whole histological section; 2+, more than 4 lesions involving two or more tubules in the whole histological section; 3+, numerous lesions throughout whole section. b) The severity of chronic progressive nephropathy was classified into four different grades according to the criteria described by Kawai²¹⁾.

経皮

経皮反復投与毒性に関するデータは、得られていない。

経口

Larson *et al.* (1995) の試験では、雌の F-344 ラットに、コーン油を媒体として、クロロホルムが 0、34、100、200 もしくは 400 mg/kg/日の用量で、4 日間連続して、または週 5 日で 3 週間にわたり、投与された。剖検の 3.5 日前に浸透圧ポンプが埋め込まれ、そこからブロモデオキシウリジン (BrdU) が投与され、S 期細胞の標識が行われた。組織切片中の S 期細胞が免疫組織化学的に可視化され、標識率 (LI)、すなわち S 期細胞の割合が算出された。試験の結果、軽度の小葉中心性退行性変化と用量依存的な肝細胞における LI 増加が、100 mg/kg/日以上の各用量群で認められた。200 および 400 mg/kg/日群では、4 日間投与と 3 週間投与の両方で、腎皮質近位尿細管の変性や壊死が認められた。組織学的検査によって、近位尿細管の内腔を覆っている上皮の再生と LI の増加が認められた。100 mg/kg/日以上の各用量群において、4 日間投与と 13 週間投与の両方で、腎臓における LI の用量依存的な増加が認められた。鼻の篩骨領域を覆っている嗅粘膜の特定の部分に、投与によって誘発された反応が 2 種類認められた。一つは、辺縁部の病変で、骨新生、骨膜細胞の過形成、細胞複製の増加などが、クロロホルム投与群のすべてにおいて認められた。もう一つは、中心部の病変で、嗅上皮および表在性のボーマン腺の変性を特徴とし、100 mg/kg/日

以上の各用量群で認められた。これらの観察結果により、雌の F-344 ラットにクロロホルムを強制経口投与した場合の標的臓器である肝臓、腎臓および鼻腔への影響について、用量-反応関係の存在が明確となった。嗅上皮の病変と細胞増殖、および鼻腔の変化は、34 mg/kg 体重/日 (=LOAEL) 以上の用量群で認められた。これらの影響は、3 週間投与後においては、100 mg/kg 体重/日群では認められたが、34 mg/kg 体重/日群では認められなかった (リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。)

Table 4.25 Chloroform-induced cell proliferation in the nasal turbinates of female F-344 rats given chloroform by garage (Larson et al., 1995)

Dose (mg/kg/day)	ULLI ^a	
	4 Days	3 wk
0	15 ± 4	16 ± 3
34	145 ± 97*	24 ± 9
100	306 ± 48*	61 ± 10*
200	321 ± 19*	63 ± 5*
400	377 ± 121*	63 ± 17*

a: Unit length labelling index of cells in the lamina propria of the proximal portion of the dorsal scroll of the first endoturbinat expressed as labelled nuclei per 0.25 mm bone. Values are means ± SD. Asterisks indicate significant differences from the control (*P < 0.05; Williams' test).

マウスにクロロホルムを 37 mg/kg 体重/日の用量で 14 日間強制経口投与した試験 (Condie *et al.*, 1983, WHO, 2004 の中で引用) では、腎病変 (石灰化、過形成、巨大細胞の出現) と肝炎が認められた。

Bull *et al.* (1986) の試験では、マウス (雌雄各 10 匹/群) に、コーン油または 2% Emulphor を媒体として、クロロホルムを 60、130、270 mg/kg 体重/日の用量で、90 日間強制経口投与した。雌雄ともに最低用量から、肝臓の重量増加、空胞化や脂質蓄積が認められた。ただし、媒体に Emulphor を用いた場合は、最低用量の 60 mg/kg 体重/日群で認められた影響は、雌における肝臓の重量増加だけであった。著者らは、コーン油を媒体としてクロロホルムを投与すると、Emulphor などの水性懸濁液を媒体として投与した場合より、肝毒性影響が増強されると結論付けている。

US EPA (1980) の 90 日間亜慢性毒性試験では、雄の Osborne-Mendel ラット (30 匹/群) に、0、200、400、600、900 もしくは 1800 ppm の濃度で、クロロホルムが飲水投与された。900 ppm 以上の群では、投与開始から 1 週間だけ、体重の有意な減少が認められた ($p < 0.05$)。1800 ppm 群では、全投与期間を通して体重の有意な減少が認められた。さらに、投与開始から 1 週間の間は、摂水量が、クロロホルム濃度の増加に伴って減少した。平均体重と平

均摂水量に基づいて、各群のクロロホルムの取り込み量が、それぞれ 0、20、38、57、81 および 160 mg/kg/日と算出された。30 日間の投与後に実施された、腎臓、精巣、前立腺、精嚢の検査では、900 ppm 群で精巣過形成と間質細胞過形成がそれぞれ 1 例ずつ認められたことを除いて、影響は認められなかった。

上述の試験と同時に、B6C3F1 マウス(30 匹/群)を用いた 90 日間亜慢性毒性試験も行われ (US EPA, 1980)、0、200、400、600、900、1800 もしくは 2700 ppm の濃度で、クロロホルムが飲水投与された。投与開始から 3 週間以内に、7 匹が死亡した。死亡に先行して、おそらくクロロホルム含有水を飲むことを忌避したことによる、体重の有意な減少が認められた。各群のクロロホルムの取り込み量は、それぞれ 0、20、40、60、90、180 および 270 mg/kg/日であった。600、900、1800 および 2700 ppm 群では、投与開始から 3 週間の間、体重減少が認められ、その後、体重は対照群と同様の値となって安定した。1800 および 2700 ppm(180 および 270 mg/kg/日)群では、肝臓の脂肪性変化が何例か認められた。卵巣や子宮への影響は、認められなかった。

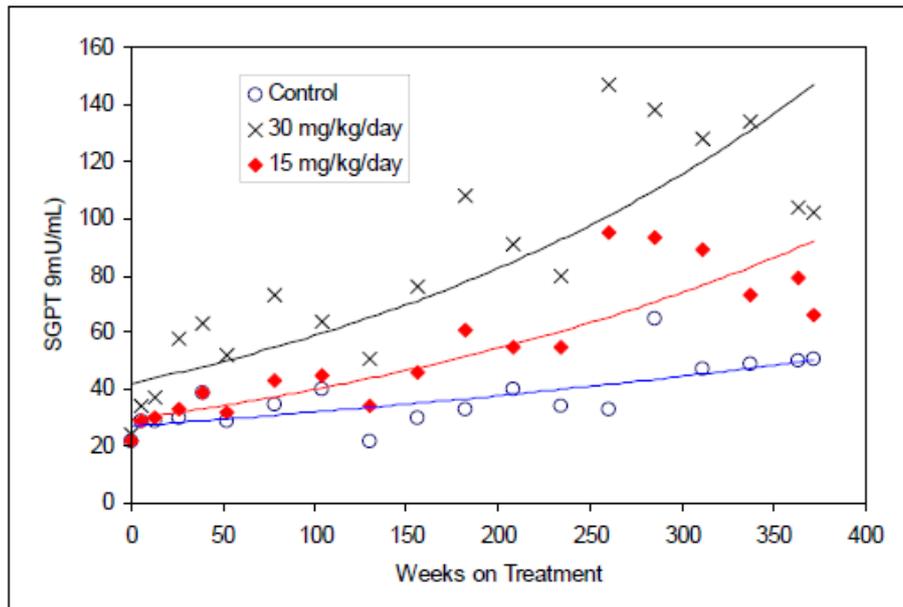
Munson *et al.*(1982)の試験では、CD1 マウス(4 群、雌雄各 7~12 匹/群)に、クロロホルムが 0、50、125 もしくは 250 mg/kg 体重/日の用量で、90 日間、胃ゾンデにより投与された。被験物質投与群ではいずれの用量においても、雌で肝重量の増加と肝ミクロソーム活性の増加が認められ、雌雄両方で、顕微鏡的な組織変化が、肝臓(肝細胞の変性とリンパ球の巣状集簇)および腎臓(炎症細胞の管間集簇)に認められた。LOAEL は 50 mg/kg 体重と推定された(WHO, 2004)。

Jorgenson *et al.*(1980)の試験(US EPA, 2001 の中で引用)では、6 週齢の雌の B6C3F1 マウス(7 群、30 匹/群)に、0、200、400、600、900、1,800 もしくは 2,700 ppm の濃度で、クロロホルムが 30~90 日間飲水投与された。報告された摂水量に基づいて、各群の用量は、それぞれ 0、32、64、97、145、290 および 436 mg/kg/日と算出された。1 週目に、900、1,800 および 2,700 ppm 群で体重の有意な減少が認められたが、これより後では、被験物質を投与された動物の体重は、いずれも対照群と同等であった。30、60 および 90 日目に、各群の 10 匹ずつを屠殺し、肉眼および顕微鏡による病理学的検査と、臓器脂肪:臓器重量比の測定が行われた。高用量群では、肝脂肪の 160~250%の増加が認められた。肝臓の組織学的検査によって、1,800 および 2,700 ppm 群で、軽度の小葉中心性脂肪変性が認められた。30 日目の検査では、低用量群(400 ppm 群)でも、肝臓の可逆性脂肪変性が認められた。高用量群では、脾臓に曝露に関連した萎縮が認められた。クロロホルムの飲水投与により生じた、肝臓などの組織における軽度の影響の所見に基づいて、この試験における LOAEL は 290 mg/kg/日、NOAEL は 145 mg/kg/日とされた。

Jorgenson *et al.*(1985)の試験(US EPA, 2001 の中で引用)では、雄の Osborne-Mendel ラット

と雌の B6C3F1 マウスに、0、200、400、900 もしくは 1800 mg/L の濃度で、クロロホルムが 104 週間、飲水投与された。摂水量および体重の測定値に基づいて、各群の時間加重平均用量が、ラットではそれぞれ 0、19、38、81 および 160 mg/kg/日、マウスではそれぞれ 0、34、65、130 および 263 mg/kg/日と算出された。群が 1 つ追加され、摂水量を高用量群と同じ量に制限した対照群とされた。被験動物数は、濃度の低い方から順に、ラットが 330、150、50 および 50 匹、マウスが 430、150、50 および 50 匹であった。この試験で作製されたラット腎臓の組織スライド標本が再検査されて、腎細胞毒性の証拠が検出できるかどうかの評価が行われた (ILSI, 1997; Hard and Wolf, 1999; Hard *et al.*, 2000、US EPA, 2001 の中で引用)。この再検査の結果、クロロホルムへの時間加重平均用量が 81 および 160 mg/kg/日の群で、主に腎皮質の中間部から深部にかけて、再生を伴う軽度の尿細管損傷(近位曲尿細管における、わずかな好塩基性増高、細胞質空胞化、単純性過形成など)が認められた。一部の被験動物では、単細胞壊死、有糸分裂像、巨大核も認められた。尿細管断面では、核の数が増加して群集を成した過形成像が認められた。これらの変化は、160 mg/kg/日群では 12、18 および 24 ヶ月目に、81 mg/kg/日群では 18 および 24 ヶ月目に認められた。細胞毒性変化は、低用量群(19 および 38 mg/kg/日群)では認められなかった。ラットで認められた腎細胞毒性の組織学的証拠に基づいて、この試験における LOAEL は、81 mg/kg/日と確定された (US EPA, 2001)。この試験のレビューには、反復投与毒性に関するマウスのデータが示されていないが、発がん性に関する情報は得られているため、該当セクションに示してある。

Heywood *et al.* (1979、US EPA, 2001 の中で引用)の試験では、ビーグル犬(雌雄各 8 匹/群)に、15 もしくは 30 mg/kg/日の用量で、クロロホルムが投与された。クロロホルムは、練り歯磨きに混ぜてゼラチンカプセルに充填され、週 6 日、7.5 年間にわたり経口投与された。投与後、20~24 週間の回復期間が設けられた。クロロホルムを含まない練り歯磨きを投与される溶媒対照群(雌雄各 16 匹)が設けられた。また、雌雄各 8 匹の 1 群が設けられて非投与群とされ、さらに 16 匹(雌雄各 8 匹)の群が設けられ、上述とは別のクロロホルムを含まない練り歯磨きが投与された。この試験中に、雄 4 匹(クロロホルム低用量群 1 匹、クロロホルム高用量群 1 匹、溶媒対照群 1 匹、および非投与群 1 匹)と、雌 7 匹(溶媒対照群 4 匹、非投与群 3 匹)が死亡した。アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT、旧名称：血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ、すなわち SGPT) の測定結果を、Figure 4.7 に示す。



Data are from Heywood et al., 1979. SGPT = serum glutamate pyruvate transaminase.

Figure 4.7 ALAT (SGPT) levels in dogs exposed to chloroform for 7 years

ALAT 値は、個々の測定値にはかなりのばらつきがあったが、低用量群(15 mg/kg/日群)では対照群よりも約 30~50% 高い傾向が認められ、130~364 週については、その増加は統計的に有意であった。高用量群(30 mg/kg/日群)では、ALAT 値がおおむね約 2 倍に増加し、この変化は、被験物質投与期間(6~372 週目)全体を通して統計的に有意であった。被験物質投与終了時の生化学的解析で認められた変化のうち、最も明瞭であったのは、ALAT 値の用量依存的な増加であった。回復期間の 14 週の時点では、ALAT 値について、対照群に比較して統計的に有意な増加は、高用量群では依然として認められたが、低用量群では認められなくなっていた。

回復期間の 19 週の時点では、ALAT 値について、対照群に比較して統計的に有意な増加は、低用量群と高用量群のどちらにおいても認められなくなっていた。著者らは、ALAT 値の増加は、軽微な肝損傷によるものであろうと結論付けている。投与期間終了時、クロロホルムの投与を受けていたイヌでは、血清アルカリホスファターゼ(SAP)値と血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(SGOT)値も、対照群に比較して、中等度の増加を示していた(統計的に有意ではない)。主要な臓器について、顕微鏡的検査が行われた。肝臓に認められた顕微鏡的影響のうち最も顕著であったのは、空胞を有する組織球の凝集と記述された「脂肪性囊胞」の存在である。脂肪性囊胞は、対照群でも被験物質投与群でも認められたが、被験物質投与群ではいずれの用量でも対照群よりサイズが大きく、数も多くかった(すなわち、対照群では「低頻度で軽微」な囊胞発生であったのに対して、被験物質投与群では「中等度または著明」な囊胞が高率で発生)。中等度または著明な脂肪性囊胞を有

する被験動物の割合は、対照群が 1/27 匹、低用量群が 9/15 匹、高用量群が 13/15 匹であった。変性肝細胞の小結節が、被験物質投与群と対照群の両方で認められ、したがって、この小結節は、投与に関係するものではないと判断された。他には、被験物質投与に関連した非腫瘍性病変や腫瘍性病変は、肝臓、胆嚢、心血管系、生殖器系、泌尿器系のいずれにおいても認められなかった。この試験では、NOAEL は確定されなかったが、LOAEL については、ALAT 値の増加と脂肪性嚢胞の発生率と重症度の増加に基づいて、15 mg/kg/日と確定された(US EPA, 2001)。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。)

複合経路による曝露

雄ラット(50 匹/群)を用い、吸入曝露と飲水投与を同時に行った試験が実施されている。吸入曝露は、クロロホルム蒸気を 0(清浄空気)、25、50 もしくは 100 ppm(v/v)の濃度で含む空気、1 日 6 時間、週 5 日、104 週間にわたって実施された。各群には、さらに、クロロホルムを 1000 ppm(w/w)の濃度で配合した水もしくは水(溶媒)が、104 週間にわたって自由摂取で与えられた。対照群(吸入曝露も飲水投与も無し)、吸入曝露のみを受けた 3 群、飲水投与のみを受けた群、および吸入曝露と飲水投与を受けた 3 群の間で、104 週間生存率に差は認められなかった。吸入曝露のみを受けた群、飲水投与のみを受けた群、および吸入曝露と飲水投与を受けた 3 群では、腎臓の非腫瘍性病変(近位尿細管における細胞質の好塩基性増高と管腔拡張)の発生率が有意に増加した(Table 4.26 を参照)。推定摂取用量が同等な場合、細胞質の好塩基性増高の発生率は、複合経路で曝露を受けた群の方が、飲水投与のみの群や吸入曝露のみの群よりも、有意に高かった。吸入曝露のみの群と複合経路で曝露を受けた群では、近位尿細管細胞における核肥大の発生率が増加したが、飲水投与のみの群では、核肥大は生じなかった。推定摂取用量が同等な場合、核肥大の発生率は、複合経路で曝露を受けた群の方が、吸入曝露のみの群よりも、有意に高かった。

Table 4.26 Incidences of Selected Pre- and Nonneoplastic Lesions of the Kidney (Nagano et al., 2006)

	Drinking water (ppm)							
	0				1000			
Inhalation (ppm)	0	25	50	100	0	25	50	100
Estimated amount of chloroform uptake (mg/kg/d)	0	20	39	78	45	73	93	135
Number of animals examined	50	50	50	50	49	50	50	50
Kidney								
Atypical tubule hyperplasia	1	0	0	0	2	4	7 ^c	15 ^{abc}
Cytoplasmic basophilia	0	3	7 ^a	8 ^a	9 ^a	26 ^{abc}	35 ^{abc}	36 ^{abc}
Dilatation: tubular lumen	0	3	11 ^a	27 ^a	28 ^a	46 ^{abc}	48 ^{abc}	49 ^{abc}
Nuclear enlargement: proximal tubule	0	0	6 ^a	33 ^a	0	34 ^{abc}	47 ^{abc}	50 ^{abc}
Chronic progressive nephropathy, +	7	21 ^a	21 ^a	30 ^a	21 ^a	2 ^{abc}	13 ^{abc}	17 ^{abc}
Chronic progressive nephropathy, 2+	16	15	16	10	11	1	2	1
Chronic progressive nephropathy, 3+	26	5	3	2	2	0	0	1

a : significantly different from the untreated control group (Inh-0 + Or1-0)

b: significantly different from the oral-alone group (Inh-0 + Or1-1000)

c: significantly different from each inhalation-alone group with matching concentrations (Inh-25 + Or1-0, Inh-50 + Or1-0, Inh-100 + Or1-0)

at $p \leq 0.05$ by chi-square test.

複合経路で曝露を受けた 3 群でのみ、尿糖陽性の高い発生率(80%超)が認められた。それに対して、飲水投与のみの群と吸入曝露のみを受けた 3 群における尿糖陽性の発生率は、15%未満と低かった。対照群では、尿糖陽性を示す例は認められなかった。複合経路で曝露を受けた 3 群では、尿糖陽性の重症度も高かった。一方、吸入曝露のみの 3 群、飲水投与のみの群、および複合経路で曝露を受けた 3 群では、血清ブドウ糖濃度と尿蛋白質濃度が、対照群と比較して、有意に減少していた。吸入による腎臓への影響については、慢性進行性腎症に関する LOAEC として、25 ppm (125 mg/m³) という数値が導出された (Nagano *et al.*, 2006)。

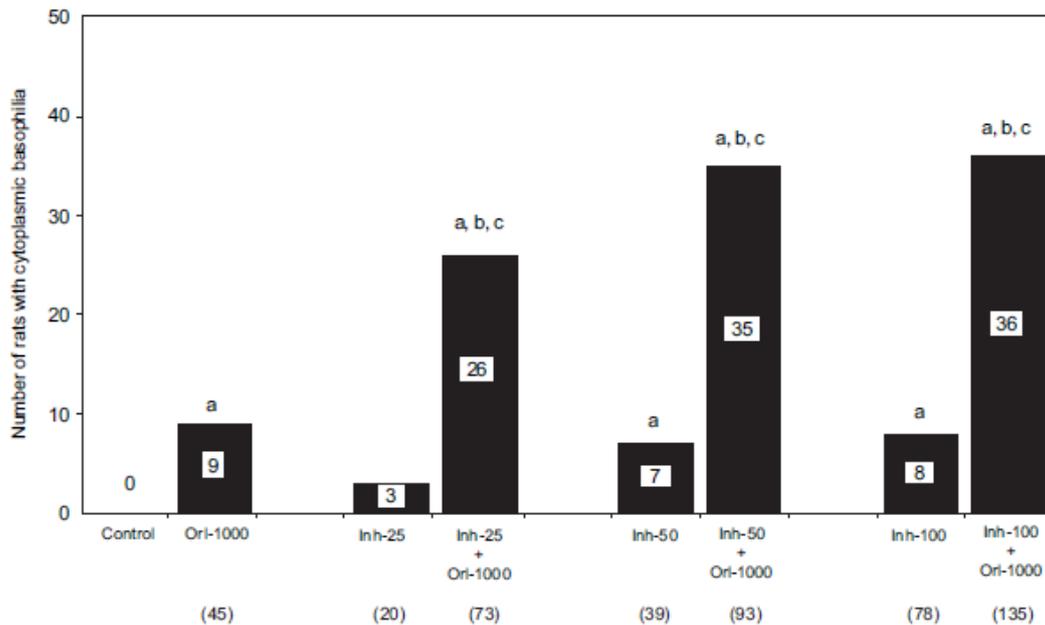


Figure 4.8 Incidences of cytoplasmic basophilia of the proximal tubule in the kidney. Parentheses indicate the estimated amount of chloroform uptake (mg/kg/d). a, b, c: significantly different from the untreated control group, from oral-alone group or from each inhalation-alone group with matching concentrations at $p \leq 0.05$ by chi-square test (Nagano et al., 2006)

In vitro 試験

データは得られていない。

4.1.2.6.2 ヒトにおける試験

In vivo 試験

吸入

クロロホルムに 22~71 ppm の濃度で 10~24 ヶ月間職業曝露された女性労働者、および 77~237 ppm の濃度で 3~10 年間職業曝露された女性労働者において、胃腸症状(悪心、口腔乾燥、胃膨満)が報告されている(Challen *et al.*, 1958、ATSDR, 1997 の中で引用)。これに対し、肝損傷の臨床的証拠は、この調査では認められなかった。

クロロホルムに 2~205 ppm の濃度で曝露された労働者において、中毒性肝炎[肝腫大、血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(SGPT)と血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(SGOT)活性の上昇、および高ガンマグロブリン血症を伴う]が認められた(Bomski *et al.*, 1967、ATSDR, 1997 の中で引用)。

クロロホルムに 14~400 ppm の濃度で 1~6 ヶ月間曝露された労働者において、黄疸、悪心、嘔吐などの発熱を伴わない中毒性肝炎症状等が認められた (Phoon *et al.*, 1983、ATSDR, 1997 の中で引用)。

Li *et al.* (1993) は、職場におけるクロロホルムの最大許容濃度の勧告に必要なデータを得るため、一連の試験を行なった。典型的な 3 箇所の職場から、119 件の空気試料が採取され、それらのクロロホルムの濃度の測定値は、4.27~147.91 mg/m³ にわたっていた。それらの空気試料の 45.4% は、クロロホルム濃度が 20 mg/m³ 未満であった。クロロホルムに 29.51 mg/m³ の濃度で曝露された労働者では、血清プレアルブミン値およびトランスフェリン値の異常を示した人の割合が、対照群の労働者よりも高く、軽微な肝損傷が示唆された。これらの労働者では、神経行動テストにおいて、不活発な精神状態を示すスコアの増加と用量依存的な陰性変化が認められ、神経行動機能にも明らかに影響が認められた。主にこれらの結果に基づいて、20 mg/m³ が、職場におけるクロロホルムの最大許容濃度として勧告されている。ATSDR (1997) に引用されているこの調査には、おそらくクロロホルム以外の化合物(すなわち、他の溶剤、薬品、防虫剤など)に、労働者が曝露されているという欠点がある。そのため、これらの影響は、クロロホルムのみによって引き起こされたのではない可能性がある。

経皮

データは得られていない。(訳注：補填)

経口

鎮咳剤に含まれるクロロホルムを 21 mg/kg/日の用量で 10 年間経口摂取した例があり、その患者では、スルホプロモフタレイン残留時間の延長が認められ、肝機能障害が示唆された。この変化は、摂取を中止すると、正常に戻った。この患者の尿中には、多数の硝子円柱や顆粒円柱と、アルブミンが認められた。クロロホルムの摂取中止により、尿検査の結果は正常に戻った (Wallace, 1950、ATSDR, 1997 の中で引用)。

口腔内洗浄剤の使用によって、0.96 mg/kg/日の用量でクロロホルムに曝露された男女(曝露期間 5 年以下)について、生化学的検査が実施されたが、肝機能への影響は示されなかった。また、同じ期間、クロロホルムに推定用量 0.34~0.96 mg/kg/日で曝露された例において、腎臓への影響の徴候は認められなかった (De Salva *et al.*, 1975、ATSDR, 1997 の中で引用)。

In vitro 試験

データは得られていない。(訳注：補填)

4.1.2.6.3 反復投与毒性の要約

実験動物を用いた試験によって、肝臓、腎臓、鼻腔が、クロロホルムの毒性の主要な標的臓器として特定されている。報告されている経口 LOAEL のうち最も低い値は、イヌの肝臓への影響に関する 15 mg/kg/日であり、これは肝臓における脂肪性嚢胞の出現や ALAT 値の上昇に基づいており、リスク総合判定の際の起点とされる (Heywood *et al.*, 1979、US EPA, 2001 の中で引用)。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。)

マウスについては、経口 LOAEL として、肝臓への影響に関して 50 mg/kg 体重/日、腎臓への影響(石灰化、過形成、巨大細胞の出現)に関して 37 mg/kg 体重/日という値が報告されている (Condie *et al.*, 1983; Munson *et al.*, 1982、WHO, 2004 の中で引用)。90 日間亜慢性曝露試験からは、雄マウスにおける反復吸入 NOAEC として、腎臓への影響(空胞形成、好塩基性の外観、尿細管細胞壊死および細胞核肥大)に関して 25 mg/m³(5 ppm)、肝臓への影響(肝細胞の空胞化、壊死巣)に関して 25 mg/m³(5 ppm)という値が報告されている (Templin *et al.*, 1998)。マウスにおける慢性(104 週間)吸入 NOAEC として、雄および雌の腎臓の細胞質における好塩基性増高と、雄の腎臓の尿細管異型過形成および核肥大の増加に関し、いずれも 25 mg/m³(5 ppm)という値が報告されている (Yamamoto *et al.*, 2002)。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。)

吸入曝露または経口曝露されたラットやマウスでは、鼻部病変も認められている。亜慢性吸入曝露による LOAEC の最小値については、ラットにおいて鼻腔組織の細胞変性と再生性過形成を生じた 9.8 mg/m³(2 ppm)と報告されている (Templin *et al.*, 1996a)。経口 LOAEL としては、嗅上皮の病変・細胞増殖と鼻腔の変化が認められた、34 mg/kg 体重/日という値が報告されている (Larson *et al.*, 1995)。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。) ヒトでは、反復投与毒性に関する限られたデータから、肝臓と腎臓が標的臓器である可能性が示唆されている。

反復投与毒性について得られたデータに基づき、クロロホルムの分類については、リスク警句 R48/20/22「長期曝露により重大な健康被害を生ずる危険がある」とすることが提案される。

4.1.2.7 変異原性

クロロホルムの変異原性を評価するための試験は、これまでに多数行われてきており、また近年、いくつかのグループによって、これらの試験のレビューと評価が行われている。得られたデータについては、Environment Canada (1999)、US EPA (2001) および WHO (2004) の文書に、より詳細に説明されている。参考文献は、IUCLID (2007) から引用されている。これらの試験のレビューや評価を行うに当たり、試験デザインに関連して下記の問題が起り得ることを認識しておくことが大切である。

- クロロホルムは揮発性が比較的高いため、クロロホルムが揮発放散しないようにデザインされていない試験系では、得られた結果が信頼できない可能性がある。
- DNA と反応する可能性が非常に高いのは、親化合物のクロロホルムではなく、クロロホルムの代謝物(ホスゲン、ジクロロメチルフリーラジカルなど)であるため、P450 をベースとする適切な代謝活性化系を用いていない試験は、結果が不完全になる可能性がある。

4.1.2.7.1 *In vitro* 試験

微生物系における試験

細菌がクロロホルム蒸気に直接曝露されるようにデザインされた条件を用いるか、クロロホルムの蒸発を防ぐための適切な予防措置を講じて行われた試験、または高濃度のクロロホルムで毒性反応が認められ、細菌が十分に曝露されたことが示唆される試験では、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) および大腸菌 (*Escherichia coli*) を用いた遺伝子突然変異試験の結果は、ラットまたはマウスの肝ミクロソームや腎ミクロソームによる活性化の有無に関係なく、主に陰性であった。このことから、クロロホルムは、細菌に対して突然変異誘発性がないことが示唆された (Araki *et al.*, 2004; Nestmann *et al.*, 1980; Daniel *et al.*, 1980; Van Abbe *et al.*, 1982; Richold and Jones, 1981; Le Curieux *et al.*, 1995; Roldan-Arjona *et al.*, 1991; Kirkland *et al.*, 1981; DeMarini *et al.*, 1991; Gatehouse, 1981) (Table 4.27 を参照)。

ラットのシータクラスグルタチオン S トランスフェラーゼ T1-1 を形質移入したネズミチフス菌の TA 1535 株を用い、19,200 ppm と 25,600 ppm の濃度のクロロホルム蒸気にプレート法で 24 時間曝露した試験では、弱い陽性反応(復帰突然変異体の増加が 2 倍)が認められた (Pegram *et al.*, 1997)。ただし、これらの 2 段階の蒸気濃度から推定されるクロロホルム用量は、それぞれ、226 mg/plate と 320 mg/plate である。これらの用量は非常に高く、国

際的ガイドラインで推奨されている 5 mg/plate という限界量を大幅に超えており、この弱い陽性という結果の有意性は疑わしいように思われる。

カビや酵母を用いた遺伝子突然変異試験

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いて行われた試験が多数報告されている。それらの試験のほとんどで、陰性の結果が示されている (Zimmermann and Scheel, 1981; Sharp and Parry, 1981; Kassinova *et al.*, 1981; and Mehta and von Borstel, 1981)。

出芽酵母 D7 を用いて行われた試験では、*trp5* 遺伝子座と *ilv1* 遺伝子座における遺伝子変換や、*ade2* 遺伝子座での有糸分裂組換えの増加が検討され、細胞毒性が現れると判明していた濃度の 21~54 mM において、陽性の結果が示されている (Callen *et al.* 1980)。出芽酵母 D7 は、シトクロム P450 依存性の内因性モノオキシゲナーゼ系を有する株であることに、注意する必要がある。

出芽酵母を用いた別の試験でも、クロロホルムは、染色体内組換えによる遺伝子欠失に関して陽性を示している (Brennan and Schiestl 1998)。

アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) を用いた試験で、染色体分離異常が報告されている (Crebelli *et al.*, 1988, 1992, 1995)。しかし、試験は、0.16% (v/v) より高い濃度でしか行われておらず、それらの濃度では細胞死も引き起こされていることから、曝露が供試細胞に対して直接的に毒性を示したことが示唆される。クロロホルム蒸気への曝露の場合には、有糸分裂での染色体分離異常は認められなかった (Crebelli *et al.*, 1984)。

哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験

哺乳類の培養細胞を用いて遺伝子突然変異の誘発を検出することを目的として行われた 3 件の試験の情報が得られているが、細胞毒性濃度範囲において、不確定な結果または弱い陽性の結果が示されている。

V79 細胞を用いたヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 試験 (Muller, 1987) では、S9-mix 存在下で 1000~1500 µg/mL の用量域において、不確定な結果が得られている。3 回の試行のうち 2 回で、遺伝子突然変異率がわずかに増加したが、全体的に非常に顕著なばらつきが認められている (最大突然変異率 56.2×10^{-6} 、陰性対照 31.9×10^{-6})。

L5178Y TK⁺細胞を用いたマウスリンフォーマ試験が実施されている。代謝活性化を施して、0.025 µL/mL (約 1 mM に相当) 以上の濃度で 2 回の試行されたが、細胞毒性濃度範囲で

弱い陽性の結果が示されている (Mitchell *et al.*, 1988)。同じ試験が、0.012 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (約 0.5 mM に相当) 以上の濃度において、3 回の試行で実施されており、やはり細胞毒性濃度範囲で弱い陽性の結果が得られている (Myhr and Caspary 1988)。代謝活性化系の非存在下で行われた場合には、いずれも陰性の結果が得られている (Mitchell *et al.*, 1988; Myhr and Caspary, 1988)。

染色体異常試験

クロロホルムの染色体異常誘発作用に関する試験の情報が 3 件得られたが、このうち信頼できる試験は、タマネギ (*Allium cepa*) の分裂組織細胞を用いて実施された 1 件のみであった (Cortés *et al.*, 1985)。細胞毒性濃度 (> 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) では、分裂後期～終期における染色体異常の頻度の増加が認められた。ヒトにおけるリスク評価をするという観点からは、この試験の意義は不明確である。

ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験に関する短報によると、代謝活性非存在下で染色体異常誘発活性が認められている。この試験は、信頼性の拠り所が無いため、公表されていない (ICI, 1992)。

異数性試験

Onfelt (1987) により報告されたデータは、クロロホルムが V79 細胞の紡錘体微小管に影響を及ぼす可能性があることを示しており、クロロホルムが染色体異数性を引き起こす可能性があることが示唆される。

出芽酵母 D6 株を用いた有糸分裂異数性試験では、一貫性のない結果が報告されている (Parry and Sharp, 1981)。これはおそらく、試験条件が不適切であった (ガラス製ではなくプラスチック製容器内で曝露した) ことによるものと考えられ、この試験では、クロロホルムは変異原性を示さないと考えられる。

DNA 修復試験

ネズミチフス菌を用いた DNA 修復試験 (umu 試験) の情報が 2 件得られており、Ono *et al.* (1991) は陽性の結果を、Nakamura *et al.* (1987) は陰性の結果を報告している。

大腸菌を用いた SOS クロモテストの情報が 2 件得られており、いずれも陰性の結果が報告されている (Quillardet *et al.*, 1985; Le Curieux *et al.*, 1995)。

腫瘍形成に対する感受性が最も高い部位である雌マウスの肝臓を対象として、クロロホル

ムの不定期 DNA 合成(UDS)誘発能が、*in vitro* 肝細胞 DNA 修復試験により検討されている。この *in vitro* 試験では、雌の B6C3F1 マウスから単離した初代肝細胞に、0.01~10 mM の濃度のクロロホルムが添加され、³H-チミジン存在下で培養された。定量的オートラジオグラフィーにより、UDS 量が測定された。いずれの濃度でも、DNA 修復の誘発は認められなかった(Larson *et al.*, 1994)。

ヒトのリンパ球や雄ラットの肝細胞を用いた試験でも、クロロホルムによる UDS の誘発は認められなかった(Peroccio and Prodi 1981; Althaus *et al.*, 1982)。

手術廃棄物から単離して調製した新鮮なヒト肝細胞初代培養細胞を用いて、クロロホルムの DNA 修復誘発能が調べられた。4 名から採取された肝細胞の培養細胞は、1 mM という高い濃度のクロロホルムでも、活性を示さなかった(Butterworth *et al.*, 1989)。

一次 DNA 損傷試験

クロロホルムによって姉妹染色分体交換(SCE)が誘発されることが、Fujie *et al.*(1993)の試験では白血病由来樹立細胞株で、Cortés *et al.*(1985)の試験ではタマネギの分裂組織細胞で認められている。

Morimoto and Koizumi(1983)の試験では、ヒトのリンパ球において、クロロホルムによる SCE 誘発が確認されている。SCE の有意な増加が誘発されたクロロホルム濃度のうち、最も低かったのは 10 mM であったが、その濃度では細胞周期の遅延も誘発されている。対照的に、Lindhahl-Kiessling *et al.*(1989)は、無処置のラット肝細胞やヒト末梢血リンパ球を用いた試験を実施したが、その *in vitro* 試験系では、クロロホルムによる SCE の誘発は認められなかった。

シリアンハムスター胚細胞を *in vitro* でクロロホルム蒸気に曝露した試験では、アデノウイルス SA7 による細胞形質転換が有意に増強された(Hatch *et al.*, 1983)。ただし、陽性を示した最低濃度(0.25 mL/チャンバー)でも明らかに細胞毒性が示されたため、この結果の有意性は不明確である。

最大 3 mM の濃度でクロロホルムのアルカリ溶出/ラット肝細胞試験が実施されているが、DNA 一本鎖切断は誘発されなかった(Sina *et al.*, 1983)。一方、Ammann and Kedderis(1997)の要約での報告によると、最大 5 mM までの濃度のクロロホルムによって、B6C3F1 マウスおよび F-344 ラットの新鮮分離肝細胞において、細胞致死性が示されることなく、DNA 二本鎖切断が、時間および用量依存的に誘発された。ただし、同じ著者による追加試験(Ammann *et al.*, 1998)では、1 mM より高い濃度のクロロホルムによって、雄の B6C3F1 マ

EURAR CHLOROFORM

ウスと F-344 ラットの培養肝細胞において、濃度依存性の細胞毒性が誘発されたことが報告されている。

Table 4.27 Summary of *in vitro* studies.

Test system	Method	Metabolic activation	Dose levels	Cytotoxic dose	Result	Reference	Reliability
Gene mutation assay on bacteria - Studies reliable with or without restriction							
Salmonella typhimurium Strains: TA 98, TA 100, TA 1535, and TA 1537	Gas-phase exposure	With and without rat liver S9	0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0%	5%	Negative	Araki et al., 2004	2
Salmonella typhimurium Strain: TA 1535 and TA 1535 transfected with rat theta-class glutathione S-transferase T1-1	Gas-phase exposure	Without	200-25600 ppm	No data	Weak positive \geq 19200 ppm on GST T1-1 transfected strain	Pegram et al., 1997	2
Salmonella typhimurium Strains: TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538	Direct plate incorporation	With and without rat liver S9	No data	\geq 15 mg/plate	Negative	Nestmann et al., 1980	2
Salmonella typhimurium Strains: TA98, TA100, TA1535, TA1537 and TA1538	Direct plate incorporation	With and without - rat and mice liver S9 - rat and mice kidney S9	10, 100, 1000, 10000 μ g/plate	10000 μ g/plate	Negative	Daniel et al., 1980; Van Abbe et al., 1982	2
Salmonella typhimurium Strains : TA1535, TA1537, TA1538	Direct plate incorporation	With and without rat liver S9	0, 10, 100, 1000, 10000 μ g/plate	$>$ 10000 μ g/plate	Negative	Richold & Jones, 1981	3
Salmonella typhimurium Strain: TA100	Fluctuation test	With and without rat liver S9	30 - 10000 μ g/ml	10000 μ g/ml	Negative	Le Curieux et al., 1995	2
Salmonella typhimurium Strains: BA 13 and BAL13	L-arabinose resistance test	With and without rat liver S9	0, 0.8, 2.7, 4.0, 6.0, 9.6, 14.4, 23.0 μ mol	\geq 14.4 μ mol	Negative	Roldan-Arjona et al., 1991	2
Escherichia coli Strains: WP2p, WP2uvrA-p	Preincubation assay	With and without rat liver S9	0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 μ g/plate	\geq 100 μ g/plate	Negative	Kirkland et al., 1981	2

Test system	Method	Metabolic activation	Dose levels	Cytotoxic dose	Result	Reference	Reliability
Escherichia coli WP2s (lamda)	Microscreen Prophage-Induction Assay	With and without rat liver S9	0, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5.0% v/v	5.0%	Negative	DeMarini et al., 1991	2
Escherichia coli 58-161 <i>envA</i> , lysogenic to bacteriophage lambda and E. coli C600, sensitive to lambda and resistant to streptomycin	lambda induction assay	With rat liver S9	0.05 and 5 µl/ml	5 µl/ml	Negative	Thomson, 1981	2
Escherichia coli Strain WP2 <i>uvrA</i> , Salmonella typhimurium Strains : TA98, TA 1535 and TA1537	Fluctuation test	With and without rat liver S9	S. typhi: 1, 5, 10 µg/ml; E. coli: 10, 100, 1000 µg/ml	S. typhi: 10 µg/ml; E. coli: 1000 µg/ml	Negative	Gatehouse, 1981	2
Bacillus subtilis Strains: H17 and M45	Liquid Rec-assay	With and without rat liver S9	No data	No data	Positive with S9	Matsui et al., 1989	2
Gene mutation assays on fungi and yeast - Studies reliable with or without restriction							
Saccharomyces cerevisiae Strain: D7	Gene conversion and mitotic recombination	Without	0, 21, 41, 54 mM	≥ 41 mM	Positive	Callen et al., 1980	2
Saccharomyces cerevisiae Strain: D7	Gene conversion and mitotic recombination	With and without rat liver S9	2 µl/ml	> 2 µl/ml	Negative	Zimmermann and Scheel, 1981	2
Saccharomyces cerevisiae Strain: D7	Mitotic gene conversion	With and without rat liver S9	No data	No data	Negative	Sharp and Parry, 1981	2

Test system	Method	Metabolic activation	Dose levels	Cytotoxic dose	Result	Reference	Reliability
Saccharomyces cerevisiae Strains: T1 and T2	Mitotic gene conversion	With and without rat liver S9	Without S9: T1: 1000 µg/ml, T2: 100 µg/ml With S9: 1000 µg/ml for both strains	Without S9: T1: > 1000 µg/ml, T2 : 100 µg/ml With S9: 1000 µg/ml for both strains	Negative	Kassinova et al., 1981	2
Saccharomyces cerevisiae Strain XV185-14C	Reverse mutation assay	With and without rat liver S9	1.11 and 0.11 µl/ml	No data	Negative	Mehta & von Borstel, 1981	2
Saccharomyces cerevisiae <i>Strain RS112</i>	Intrachromosomal recombination assay	Without	0, 0.75, 1.49, 2.98, 4.47, 5.59 mg/ml	≥ 4.47 mg/ml	Positive	Brennan & Schiestl, 1998	2
Aspergillus nidulans	Mitotic chromosome malsegregation	Without	0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20 % v/v	0.20% v/v	Positive 0.20%	Crebelli et al., 1988, 1992, 1995	2
Aspergillus nidulans	Mitotic chromosome malsegregation	Without	5.0 and 7.5 ml/20-L desiccator	≥ 5.0 ml/20-L desiccator	Negative	Crebelli et al., 1984	2
<i>Aspergillus nidulans</i> haploid strain 35 and diploid strain P1	Gene mutations and somatic segregation	Without	0.5% v/v	0.5% v/v	Negative	Gualandi, 1984	2
Mammalian gene mutation assay - Studies reliable with or without restriction							
V79 Chinese hamster lung cells	HGPRT assay OECD TG 476	With and without rat liver S9	100-1500 µg/ml.	> 1500 µg/ml	Inconclusive with S9 Negative without S9	Muller, 1987	1
L5178Y mouse lymphoma cells	TK+/- assay	With and without rat liver S9	Without S9: 0.39 to 1.5 µl/ml With S9: 0.007 to 0.06 µl/ml	≥ 1.2 µl/ml without S9 ≥ 0.04 µg/ml with S9	Weak positive with S9 Negative without S9	Mitchell et al., 1988	2

Test system	Method	Metabolic activation	Dose levels	Cytotoxic dose	Result	Reference	Reliability
L5178Y mouse lymphoma cells	Mouse lymphoma assay TK+/- assay	With and without rat liver S9	Without S9: 15.6-1000 nl/ml With S9: 0.78-25.0 nl/ml	Without S9: \geq 500 nl/ml With S9: $>$ 6.25 nl/ml	Weak positive with S9 Negative without S9	Myhr and Caspary, 1988	2
Chromosomal aberration assays - Studies reliable with or without restriction							
Meristematic cells of <i>Allium cepa</i>	Cytogenetic analysis	Without	0, 250, 500, 1000, 1500, 2500 and 5000 μ g/ml	\geq 1500 μ g/ml	Positive \geq 1500 μ g/ml	Cortés et al., 1985	2
Assays for aneuploidy - Studies reliable with or without restriction							
V79 Chinese hamster lung cells	Cytogenetic analysis	Without	$6 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} and $1.2 \cdot 10^{-2}$ M	$>1.2 \cdot 10^{-2}$ M	Positive	Onfelt, 1987	2
Saccharomyces cerevisiae Strain D6	Mitotic aneuploidy	With and without rat liver S9	up to 600 μ g/ml	variable according to the procedure used	Negative	Parry and Sharp, 1981	2
DNA repair assays - Studies reliable with or without restriction							
Salmonella typhimuriumn TA1535/pSK1002	umu test	With and without rat liver S9	up to 620 μ g/ml	No data	Negative	Nakamura et al., 1987	2
Salmonella typhimuriumn TA1535/pSK1002	umu test	With and without rat liver S9	1000 μ g/ml	No data	Positive	Ono et al., 1991	2
Escherichia coli Strain: PQ37	SOS-chromotest	With and without rat liver S9	No data	No data	Negative	Quillardet et al., 1985	2

Test system	Method	Metabolic activation	Dose levels	Cytotoxic dose	Result	Reference	Reliability
Escherichia coli Strain: PQ37	SOS-chromotest	With and without rat liver S9	10 - 10000 µg/ml	≥ 3000 µg/ml	Negative	Le Curieux et al., 1995	2
Male albino rat hepatocytes	Unscheduled DNA synthesis	Without	$8.4 \cdot 10^{-7}$ - $8.4 \cdot 10^{-2}$ M	No data	Negative	Althaus et al., 1982	2
Female B6C3F1 Mice hepatocytes	Unscheduled DNA synthesis	Without	0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 mM	10 mM	Negative	Larson et al., 1994	2
Human lymphocytes	Unscheduled DNA synthesis	With and without rat liver S9	0, 2.5, 5 and 10 µl/ml	> 10 µl/ml	Negative	Perocco and Prodi, 1981	2
Human hepatocytes	Unscheduled DNA synthesis	Without	0, 0.01, 0.1 and 1.0 mM	No data	Negative	Butterworth et al., 1989	2
Primary DNA damage - Studies reliable with or without restriction							
Permanent leukemia cell line K3D	Sister chromatid exchange assay	With and without rat liver S9	0, $2 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-4}$ and $2 \cdot 10^{-5}$ M	No data	Positive with S9	Fujie et al., 1993	2
Human lymphocytes	Sister chromatid exchange assay	With and without co-cultured with intact rat liver cells	10^{-4} , 10^{-5} , or 10^{-6} M	No data	Negative	Lindahl-Kiessling et al., 1989	2
Human lymphocytes	Sister chromatid exchange assay	Without	$1.6 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$ M	Concentrations $\geq 1 \cdot 10^{-2}$ M induce a delay in the cell cycles	Positive $\geq 1 \cdot 10^{-2}$ M	Morimoto and Koizumi, 1983	2
Rat hepatocytes	Alkaline elution assay	Without	0.03, 0.3, 3 mM	> 3 mM	Negative	Sina et al., 1983	2

Test system	Method	Metabolic activation	Dose levels	Cytotoxic dose	Result	Reference	Reliability
Syrian hamster embryo cells	Enhancement of DNA viral transformation assay	Without	2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.12 ml/chamber (equivalent to 640, 320, 160, 80, 40 mg/l air)	≥ 0.25 ml/chamber (160 mg/l air)	Positive ≥ 0.25 ml/chamber	Hatch et al., 1983	2
Meristematic cells of <i>Allium cepa</i>	Sister chromatid exchange assay	Without	0, 250, 500, 1000, and 1500 $\mu\text{g/ml}$	≥ 1500 $\mu\text{g/ml}$	Positive	Cortés et al., 1985	2

4.1.2.7.2 *In vivo* 試験

トランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験

Butterworth et al.(1998):

- **B6C3F1 lacI マウスの肝細胞における遺伝子突然変異**

雌の B6C3F1 lacI マウスが、クロロホルムに、0、10、30 もしくは 90 ppm の濃度(0、50、166、500 mg/kg 体重/日に相当)で、1日6時間、週7日で最長180日まで吸入曝露された。結果を Table 4.28 に示す。

Table 4.28 Lacl mutant frequencies in Chloroform-treated Mice.

Chloroform exposure (ppm)	Timepoint (days) ^a	Mutant frequency ($\times 10^{-5}$) ^b
0	10	10.1 \pm 5.1
10	10	11.7 \pm 2.4
90	10	12.7 \pm 4.4
0	30	9.5 \pm 2.3
90	30	10.4 \pm 3.5
0	90	13.0 \pm 3.1
90	90	14.7 \pm 6.1
0	180	12.3 \pm 0.8
90	180	13.7 \pm 3.6

^a Duration of exposure to chloroform. Exposures were 6 hr/day 7days/week. Animals were held for 10 days after completion of exposures to allow for fixation of mutations and for complete clearance of test chemical.

^b Mutant frequency is calculated as the number of mutant plaques isolated per total plaques screened. Values are the mean \pm SD (animal-to-animal variation) from five animals per dose group for each timepoint. At least 200,000 plaques were screened per animal. As chloroform clearly did not induce an increase in mutant frequency, the remaining five animals in the group were not analyzed because of cost limitations.

この lacI 試験の結果からは、クロロホルムへの吸入曝露による突然変異発生頻度の増加は認められなかった。

細胞遺伝学的試験

Shelby and Witt(1995):

- **腹腔内投与による骨髄細胞の染色体異常試験**

マウスの骨髄細胞を用いた染色体異常(CA)誘発試験が、クロロホルムも含めて 65 種類の

化学物質について行われている。

クロロホルムについては、マウスの骨髄細胞を用いた染色体異常誘発試験が、2つの屠殺時間(17 および 36 時間)を設定して行われた。雄の B6C3F1 マウス(8 匹/群)に、コーン油を媒体として、クロロホルムが、200、400、800 もしくは 1000 mg/kg の用量で単回腹腔内注射され、規定の時間後、細胞が回収された。マウス 1 匹あたりの総投与容量は、0.4 mL であった(クロロホルム投与群、媒体対照群とも)。各試行ごとに、同時陽性対照マウス群が置かれた(データは示されていない)。各投与群の被験動物ごとに、よく広がった分裂中期の細胞 50 個について、染色体異常の有無が調べられた(Table 4.29 を参照)。この試験は、OECD ガイドライン 473(訳注: 473 は *in vitro* 試験に関するものであり、この *in vivo* 試験に関しては 475 が正しいと思われる)に従って、大きな逸脱なく実施された。

Table 4.29

	Harvest time (hr)	Trend <i>P</i> value	Dose (mg/kg)	% Cells with ABS	Survival
Chromosome aberrations (CO)	17	0.004 ^a	0	0.25 ± 0.25	8/8
			200	1.75 ± 0.70	8/8
			400	2.50 ± 0.98*	8/8
			800	1.75 ± 0.45	8/8
	17	0.500	0	1.50 ± 0.73	8/8
			800	0.50 ± 0.33	8/8
			1,000	1.25 ± 0.37	8/8
	36	0.781	0	1.00 ± 0.53	8/8
			200	2.00 ± 1.00	8/8
			400	1.75 ± 0.70	8/8
			800	1.25 ± 0.53	8/8

^aTests performed at BNL.

*Significant positive effect.

この CA 誘発試験で、17 時間で試料採取が行われた試行のうちの 1 件において、400 mg/kg 群でのみ統計的に有意な影響が認められたが、同時媒体対照の値が非常に低く、異常細胞頻度が 0.25%であった(既存背景対照の値は 3.26%)。この影響は、より高い用量で行われたもう 1 件の試行では認められなかった。36 時間で試料採取が行われた試行でも、結果は陰性であった。そのため、試験の結果は、最終的に陰性と判定された。

Fujie et al.(1990):

- **腹腔内投与による骨髄細胞の染色体異常試験**

クロロホルムの染色体異常(CA)誘発能についての *in vivo* 試験が、ラットを用いて行われ

た。

雌雄の Long-Evans ラットに、クロロホルムが、水を媒体として、1.2、11.9 もしくは 119.4 mg/kg 体重 (10^{-2} 、 10^{-1} 、1 mmole/kg) の用量で、腹腔内投与された。陽性対照として、原液のベンゼン (234.3 mg/kg、すなわち 3 mmole/kg) が腹腔内投与された。腹腔内投与から 12 時間後に採取された細胞を用いて、用量-反応関係が調べられた。クロロホルムが 1.2 mg/kg 体重以上の用量で投与された群で、染色体異常細胞の出現頻度の有意な増加とともに、有意な用量-反応傾向が認められた (Table 4.30 を参照)。この試験は、OECD ガイドライン 473 (訳注: 473 は *in vitro* 試験に関するものであり、この *in vivo* 試験に関しては 475 が正しいと思われる) に従って、重きな逸脱なく実施された。

Table 4.30 Relationship between dose and THM-induced CA 12h after intraperitoneal injection

Chemical	Dose ^a (mmole/kg)	Sex ^b	Number of cells examined	Number of cells with		Number of aberrations/cell (mean ± SD) ^c	Incidence of aberrant cells (mean ± SD) ^c	χ^2 -test	Trend test (P value) ^d
				gaps	breaks				
CHCl ₃	10^{-2}	Male (3)	300	5	13	0.043 ± 0.005	4.3 ± 0.5 (%)	*	M 0.001
		Female (3)	300	3	10	0.033 ± 0.004	3.3 ± 0.5	*	F 0.001
		Total (6)	600	8	23	0.038 ± 0.007	3.8 ± 0.7	**	T 0.001
	10^{-1}	Male (3)	300	9	23	0.077 ± 0.012	7.7 ± 1.2	**	
		Female (3)	300	9	19	0.063 ± 0.004	6.3 ± 0.5	**	
		Total (6)	600	18	42	0.070 ± 0.011	7.0 ± 1.2	**	
	1	Male (3)	300	9	22	0.073 ± 0.005	7.3 ± 0.5	**	
		Female (3)	300	7	19	0.063 ± 0.013	6.3 ± 1.2	**	
		Total (6)	600	16	41	0.068 ± 0.011	6.8 ± 1.1	**	
Positive control (benzene)	3	Male (3)	525	14	70	0.133 ± 0.019	13.3 ± 1.9	**	
		Female (3)	525	10	38	0.072 ± 0.014	7.2 ± 1.4	**	
		Total (6)	1050	24	108	0.103 ± 0.035	10.3 ± 3.5	**	
Vehicle control (physiological saline)		Male (3)	300	4	3	0.010 ± 0.000	1.0 ± 0.0		
		Female (3)	300	1	2	0.007 ± 0.005	0.7 ± 0.5		
		Total (6)	600	5	5	0.008 ± 0.003	0.8 ± 0.4		

^a Dose of 10^{-2} - 1 mmole/kg body weight for each chemical are as follows: CHCl₃, 1.2 - 119.4 mg/kg; CHCl₂Br, 0.6 - 163.8 mg/kg; CHClBr₂, 2.1 - 208.3 mg/kg; CHBr₃, 2.5 - 253 mg/kg.

^b Figures in parentheses indicate the number of animals examined.

^c Not including the cells with gaps. Values indicate the mean and standard deviation of the results from 3 or 6 rats.

^d Trend test indicates the significance of the dose response for each chemical at each P value. M indicates the value for males, F for females, and T for the total of male and female rats.

* Significantly different from untreated control at $P < 0.05$

** Significantly different from untreated control at $P < 0.01$

2 回目の試験が行われており、クロロホルムが 11.9 mg/kg 体重の用量で腹腔内に注射され、その 6、12、18 および 24 時間後に、異常な分裂中期細胞の割合が調べられた (Table 4.31 参照)。クロロホルム腹腔内投与の 6、12 および 18 時間後において、非曝露対照群に比較して、統計的に有意な増加が認められた。異常細胞の出現頻度は、12 時間後に最高に達し、24 時間以内に対照群と同じレベルに減少した。

Table 4.31 Variation over time of THM-induced CA in rat bone marrow cells after intraperitoneal injection

Chemical	Dose ^a (mmole/kg)	Time (h)	Sex ^b	Number of cells examined	Number of cells with		Number of aberrations/cell (mean ± SD) ^c	Incidence of aberrant cells (mean ± SD) ^c	χ ² -test
					gaps	breaks			
CHCl ₃	10 ⁻¹	6	Male (3)	300	4	14	0.047 ± 0.005	4.7 ± 0.5 (%)	**
			Female (3)	300	4	9	0.030 ± 0.008	3.0 ± 0.8	*
			Total (6)	600	8	23	0.038 ± 0.011	3.8 ± 1.1	**
		12	Male (3)	300	9	23	0.077 ± 0.012	7.7 ± 1.2	**
			Female (3)	300	9	19	0.063 ± 0.004	6.3 ± 0.5	**
			Total (6)	600	18	42	0.070 ± 0.011	7.0 ± 1.2	**
	18	Male (3)	300	5	12	0.040 ± 0.008	4.0 ± 0.8	*	
		Female (3)	300	4	11	0.037 ± 0.005	3.7 ± 0.5	*	
		Total (6)	600	9	23	0.038 ± 0.007	3.8 ± 0.7	**	
	24	Male (3)	300	4	3	0.010 ± 0.000	1.0 ± 0.0		
		Female (3)	300	4	4	0.013 ± 0.005	1.3 ± 0.5		
		Total (6)	600	8	7	0.012 ± 0.004	1.2 ± 0.4		
Vehicle control (physiological saline)	12	Male (3)	300	4	3	0.010 ± 0.000	1.0 ± 0.0		
		Female (3)	300	1	2	0.007 ± 0.005	0.7 ± 0.5		
		Total (6)	600	5	5	0.008 ± 0.003	0.8 ± 0.4		

^a Dose of 10⁻¹ mmole/kg body weight for each chemical are as follows: CHCl₃, 12.0 mg/kg; CHCl₂Br, 16.3 mg/kg; CHClBr₂, 20.8 mg/kg; CHBr₃, 25.3 mg/kg.

^b Figures in parentheses indicate the number of animals examined.

^c Not including the cells with gaps. Values indicate the mean and standard deviation of the results from 3 or 6 rats.

* Significantly different from untreated control at $P < 0.05$

** Significantly different from untreated control at $P < 0.01$

結論として、被験物質を腹腔内投与後、ラット骨髓細胞を検討した試験において、クロロホルムは、用量依存的な陽性の結果を示した。

● 経口投与による骨髓細胞の染色体異常試験

雄の Long-Evans ラットに、クロロホルムが、1.2、11.9 もしくは 119.4 mg/kg 体重/日の用量で、24 時間間隔で 5 日間、胃挿管により投与された。陽性対照として、臭素酸カリウム (250.5 mg/kg、すなわち 1.5 mmole/kg) が経口投与された。最後の投与から 18 時間後に採取された細胞を用いて、用量-反応関係が調べられた。クロロホルムや臭素酸カリウムを腹腔内投与した場合に、雄のラットの方が雌のラットよりもわずかに高い感受性を示したため、経口投与では、雄のラットが用いられることになった。異常細胞の発生率および細胞当たりの異常の数を見ると、クロロホルムが 119.4 mg/kg の用量で投与された群では、非投与対照群と比較して、統計的に有意かつ用量依存的な増加が認められた(異常細胞の発生率はそれぞれ 6% および 1%、Table 4.32 参照)。この試験は、OECD ガイドライン 473 (訳注: 473 は *in vitro* 試験に関するものであり、この *in vivo* 試験に関しては 475 が正しいと思われる) に従って、大きな逸脱なく実施された。

Table 4.32 Relationships between dose and THM-induced CA after oral treatment

Chemical	Dose ^b (mmole/ kg)	Time (h)	Sex ^c	Number of cells examined	Number of cells with		Number of aberrations/cell (mean ± SD) ^d	Incidence of aberrant cells (mean ± SD) ^d	χ^2 -test	Trend test ^e
					gaps	breaks				
CHCl ₃	10 ⁻²	24 × 5 + 18 h	Male (3)	300	5	6	0.020 ± 0.008	2.0 ± 0.8 (%)		
	10 ⁻¹		Male (3)	300	6	10	0.033 ± 0.004	3.3 ± 0.5		P < 0.001
	1		Male (3)	300	7	18	0.060 ± 0.008	6.0 ± 0.8	**	
Positive control (KBrO ₃)	1.5	24 × 5 + 18 h	Male (3)	525	16	41	0.078 ± 0.018	7.8 ± 1.8	**	
Vehicle control (physiological saline)		24 × 5 + 18 h	Male (3)	300	2	3	0.010 ± 0.000	1.0 ± 0.0		

クロロホルムの用量が 119.4 mg/kg 体重/日の場合については、異常な分裂中期細胞の割合の検討が、経時的に、すなわち、最後の経口投与から 6、12、18 および 24 時間後に実施された (Table 4.33 参照)。染色体異常の発生率について、わずかであるが統計的に有意な増加が、12 時間後に認められ、18 時間後での増加は明確であった。

Table 4.33 Variation of THM-induced CA at various times after oral treatment

Chemical	Dose ^b (mmole/ kg)	Time (h)	Sex ^c	Number of cells examined	Number of cells with		Number of aberrations/cell (mean ± SD) ^d	Incidence of aberrant cells (mean ± SD) ^d	χ^2 -test
					gaps	breaks			
CHCl ₃	1	24 × 5 + 6 h	Male (3)	300	14	10	0.033 ± 0.004	3.3 ± 0.5 (%)	
		24 × 5 + 12 h	Male (3)	300	9	11	0.037 ± 0.005	3.7 ± 0.5	*
		24 × 5 + 18 h	Male (3)	300	7	18	0.060 ± 0.008	6.0 ± 0.8	**
		24 × 5 + 24 h	Male (3)	300	6	3	0.010 ± 0.000	1.0 ± 0.0	
Vehicle control (physiological saline)		24 × 5 + 18 h	Male (3)	300	2	3	0.010 ± 0.000	1.0 ± 0.0	

^a 1 mmole/kg body weight of each THM was administered orally (gastric intubation) 5 times at 24-h intervals. The rats were killed at various times after the last treatment.

^b These figures indicate the amount of each THM administered once daily. The total dose volumes were as follows: CHCl₃, 119.4 × 5 mg/kg; CHCl₂Br, 163.8 × 5 mg/kg; CHClBr₂, 208.3 × 5 mg/kg; CHBr₃, 253 × 5 mg/kg

^c Figures in parentheses indicate the number of animals examined.

^d Not including the cells with gaps. Values indicate the mean and standard deviation of the results from 3 rats.

* Significantly different from untreated control at P < 0.05

** Significantly different from untreated control at P < 0.01

結論として、クロロホルムは、いずれの異常細胞でも染色体の再校正は引き起こしておらず、異常の種類は、主として、染色分体型に限られていた。この試験では、クロロホルムが 119.4 mg/kg 体重/日の用量で経口投与された場合に、最後の投与から 12~18 時間の間で、陽性の結果が示されている。

Hoechst et al. (1988):

- 染色体異常試験

Chinese ハムスター(雌雄各 5 匹/群)を用いて、クロロホルムの染色体異常誘発能が検討されている。この試験では、クロロホルムが、0(溶媒対照)、40、120 もしくは 400 mg/kg 体

重の用量で、単回強制経口投与され、投与の 6 時間後(高用量群)、24 時間後(すべての群)および 48 時間後(高用量群)に、細胞の回収と標本作製、および分裂中期の骨髄細胞の分析(100 細胞/匹)が行われた。

結果を Table 4.34 に示す。雄における結果と雌における結果を合わせると、わずかであるが統計的(マンホイットニーU 検定)に有意な染色体異常の増加が、400 mg/kg 体重用量群の 6 および 24 時間後の試料で認められた。ただし、増加を示した数値でも、既存の背景陰性対照の数値の範囲内であった。さらに試験が実施されており、この 2 回目の試験では、0(溶媒対照)、120 および 400 mg/kg 体重の用量で投与が行われた。この試験においても、細胞遺伝学的分析により、400 mg/kg 体重用量群の 24 時間後の試料で、染色体異常のわずかであるが統計的に有意な増加が認められた。しかし、損傷(染色体切断)率については、既存背景対照の範囲外には至っておらず、やはり用量-反応関係は示されなかった。なお、雄における結果と雌における結果を別々に分析すると、再現性のある染色体異常の増加は認められない。

著者は、クロロホルムを 120 もしくは 400 mg/kg の用量で経口投与(6、24 および 48 時間後に評価)した場合に、重大な損傷(多重異常、染色体崩壊、染色体交換)が認められたことに基づいて、クロロホルムが変異原性を有すると推論できると述べている。ただし、これらの「重大な」異常は、例外的なものであり(Engelhardt and Fleig, 1993)、曝露に関連したものではないとみなされている。

しかし、著者は、著者の行った試験条件下で Chinese ハムスターの骨髄細胞で認められたように、クロロホルムは、染色体に、まれではあるが重大な構造変化を引き起こし得ると結論づけている。したがって、クロロホルムに変異原性がある可能性は除外できない。

Table 4.34

Dose mg/kg	Time (hours)	Aberration rate excluding gaps (%)
First experiment		
Negative control	24	1.3
Positive control (CPA, 30mg/kg)	24	9.7*
40	24	1.4
120	24	1.7
400	6	2.4*
	24	1.6*
	48	1.0
Second experiment		
Negative control	24	0.2
Positive control (CPA, 30mg/kg)	24	11.4*
120	24	0.6
400	24	0.9*

*Significantly different from control, $p < 0.05$.

小核試験

Robbiano et al. (1998):

- **経口投与による腎細胞における小核形成**

クロロホルムを含めた 6 種類のハロゲン化麻醉剤について、ラットへの経口投与により、腎細胞における小核形成能が検討された。

雄の Sprague-Dawley アルビノラット(7 匹/群)に、250 mg/kg の用量で葉酸が静脈内注射され、腎切除によって誘発される腎細胞の増殖活性の増高が図られた。クロロホルムは、コーン油を媒体として、472 mg/kg 体重/日(クロロホルムの LD₅₀ の半分)の用量で、葉酸の静脈内注射から 2 日後に単回経口投与された。投与は胃挿管により行われ、容量は体重 1 g 当たり 0.01 mL であった。陽性対照として、N-ニトロソジメチルアミン(NDMA、20 mg/kg) が用いられた。結果を Table 4.35 に示す。

クロロホルムの投与によって、小核を有する腎細胞の平均出現頻度が、統計的に有意に増加した。ラットの陰性対照群における小核を有する腎細胞の平均出現頻度は、 1.33×10^{-3} であった。曝露群の陰性対照群に対する比は 3.32、陽性対照群の陰性対照群に対する比は 6.52 であった。

この試験は、OECD ガイドライン 474 に従って行われたが、下記の逸脱があった。

- この試験は、赤血球ではなく腎細胞を用いて行われている。ただし、腎臓は標的臓器

である。

- 試験が、472 mg/kg 体重/日という 1 段階の用量でしか行われていない。OECD ガイドラインには、3 段階の用量で行うことが推奨されている。

Table 4.35 Frequency of micronucleated kidney cells in rats treated with chloroform.

Treatment conditions	N ^o of cells scored	Frequency (x10 ⁻³) of micronucleated cells	Frequency (x10 ⁻²) of binucleated cells
Control	37046	1.33 ± 0.41	1.91 ± 0.37
Chloroform 4 mmol/kg	15995	4.42 ± 1.16*	2.15 ± 0.55
NDMA 20mg/kg	9038	8.68 ± 2.69*	1.62 ± 0.61

*Significantly different from the control group at p< 0.001 as determined by the Wilcoxon's two sample (two tail test).

Gocke et al.(1981):

- 腹腔内投与によるマウス骨髄小核試験

この試験では、雌雄の NMRI マウスにクロロホルムなどの化学物質を投与し、骨髄細胞における小核形成を検討している。

雌雄の NMRI マウスに、オリーブ油を媒体として、クロロホルムを 0、238、476 もしくは 952 mg/kg 体重の用量で腹腔内投与し、その 24 時間後にも腹腔内投与を行い、30 時間後に屠殺・試料採取を実施した。結果を Table 4.36 に示す。この試験は、OECD ガイドライン 471(訳注：471 は細菌復帰突然変異試験に関するものであり、この試験に関しては 474 が正しいと思われる)に従って、逸脱なく実施された。

Table 4.36 Results of the micronucleus test on mouse bone marrow.

Compound	Surviving / treated mice	Dose mg/kg	Route of application	Micronucleated PE (‰)
Chloroform	4/4	2 x 952	ip	2.2
	4/4	2 x 476	ip	2.6
	4/4	2 x 238	ip	2.2
	4/4	0	ip	1.2
Hydroquinone	8/8	2 x 110	ip	10.0**
	8/8	2 x 55	ip	3.5
	4/4	2 x 22	ip	1.4
	4/4	0	ip	1.1

** Significantly different from control, p<0.01.

クロロホルムについては、統計的に有意で用量依存的な小核形成の増加は認められなかった。

Tsuchimoto and Matter(1981):● **腹腔内投与による骨髄小核試験**

雌雄の CD1 マウスを用い、クロロホルムの小核形成能の評価が行われた。1 群につき雄 2 匹と雌 2 匹が用いられた。

クロロホルムが、ジメチルスルホキシド(DMSO)を媒体として、0、0.015、0.03 もしくは 0.06 mL/kg の用量で(0、22、44 および 89 mg/kg 体重/日に相当)、24 時間の間隔を空けて、2 回腹腔内投与された。被験動物は、2 回目の投与から 6 時間後に屠殺された。大腿骨から骨髄細胞が採取され、塗抹標本が作製された。小核を有する多染性赤血球(MPE)の数が測定されたが、細胞当たりの小核の数は測定されなかった。

得られたデータは、以下の基準に基づいて評価された。

- 小核を有する MPE の出現頻度が 0.40%以上のマウスが、1 群につき 2 匹以上いる。
- 被験物質が投与された群の中で、小核を有する MPE の出現頻度の平均が 0.30%以上である群が 1 つ以上ある。
- 被験物質が投与された群の 1 つ以上において、統計的有意性が認められる。

この試験は、OECD ガイドライン 471(訳注：471 は細菌復帰突然変異試験に関するものであり、この試験に関しては 474 が正しいと思われる)に従って行われた。

結果を Table 4.37 に示す。

Table 4.37 Frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes.

Compound	Doses	Micronucleated polychromatic erythrocytes (%)
Chloroform	0 ml/kg	0.12
	0.015 ml/kg	0.08
	0.03 ml/kg	0.08
	0.06 ml/kg	0.07
2-acetylaminofluorene	0 ml/kg	0.08
	280 mg/kg	0.70*
	560 mg/kg	0.65*
	1120 ml/kg	0.45*

* Significantly different from control, $p < 0.05$.

上記の 3 つの基準をすべて満たす被験物質は、陽性と判定された。変異原性化合物の 2-アセチルアミノフルオレンは、陽性と判定された。

著者らは、結論として、この試験の条件では、いかなる濃度で試験しても、クロロホルム

による小核形成は認められないとしている。

Shelby and Witt(1995):

マウス骨髄細胞を用いた小核(MN)誘発試験が、クロロホルムも含めて 65 種類の化学物質について行われている。

● 腹腔内投与による骨髄細胞小核試験

試験では、独立して 2 回の試行が実施されており、雄の B6C3F1 マウス(5 匹以上/群)に、クロロホルムが、コーン油を媒体として、200、400、600 もしくは 800 mg/kg 体重/日の用量で、24 時間おきに 3 回、腹腔内投与された。マウス 1 匹あたりの総投与容量は、0.4 mL であった(クロロホルム投与群、媒体対照群とも)。この小核試験では、毎試行ごとに、同時陽性対照群(ベンゼン、アクリルアミドもしくはフェノールなどを投与されたマウスの群)が置かれた(データは示されていない)。最後の腹腔内投与から 24 時間後に、大腿骨から骨髄細胞が採取され、塗抹標本が作製された。1 匹につき 2000 個の多染性赤血球(PCE)が観察され、小核を有する細胞の頻度が測定された。毒性の指標として、骨髄中の総赤血球数に占める PCE の割合が、用量群ごとに算出された(Table 4.38 を参照)(訳注:本 Table には当該情報は掲載されていない)。この試験は、OECD ガイドライン 474 に従って、重きな逸脱なく実施された。

Table 4.38 Percentage of PCE among the total erythrocyte population

Chloroform (CAS No. 67-66-3) (MN+/ABS-)					
Test ^a (solvent)	Tissue	Trend <i>P</i> value	Dose (mg/kg)	MN-PCE/1,000	Survival (No. scored)
Micronucleus (CO)	BM	0.011*	0	2.40 ± 0.45	10/10
			200	3.00 ± 0.39	10/10
			400	3.50 ± 0.72	10/10
			800	4.20 ± 0.47	10/10
		0.001*	0	2.10 ± 0.29	5/5
			400	4.00 ± 0.72*	5/5
			600	4.75 ± 1.20*	4/5

1 回目の試行では、統計的に有意な小核の増加は認められなかったが、用量-反応傾向が認められ、2 回目の試行では、統計的に有意で用量依存的な小核の増加が認められた。ただし、影響が最も強く認められた場合でも、その数値は対照群における値の約 2 倍でしかなかった。この試験の結果は、陽性と判定された。

Salamone et al.(1981):

● 腹腔内投与による骨髄小核試験

この試験では、B6C3F1 マウスにクロロホルムなどの化学物質を投与し、骨髄細胞におけ

る小核形成を検討している。

B6C3F1 マウスに、クロロホルムが、LD₅₀ の 80%の用量(正確な数値は示されていない)で、下記に従い腹腔内投与された。

- P1 : LD₅₀ の 80%の用量で、24 時間の間隔を空けて 2 回腹腔内投与し、48、72 および 96 時間後に試料を採取。
- P2 : LD₅₀ の 80%の用量で 1 回腹腔内投与し、36、48、60 および 72 時間後に試料を採取。
- CT : LD₅₀ の 80%の用量で 1 回腹腔内投与し、60 時間後に試料を採取。

結果を Table 4.39 に示す。LD₅₀ の 80%の用量でクロロホルムを投与した場合、60 時間後に小核形成が認められた。変異原性化合物であることが知られている 2-アセチルアミノフルオレンが、陽性対照として用いられた。この試験は、OECD ガイドライン 471(訳注：471 は細菌復帰突然変異試験に関するものであり、この試験に関しては 474 が正しいと思われる)に従って行われたが、下記の小さな逸脱があった。

- 試験されたクロロホルムの用量が、1 段階だけであった。
- 試験されたクロロホルムの用量は、LD₅₀ の 80%であると記載されているが、具体的な数値データは示されていない。
- 検査された多染性赤血球(PCE)の数が、マウス 1 匹あたり 1000 個ではなく 500 個であった。

Table 4.39 Number of micronuclei/500 PCE for a single mouse for each compound. Statistically significant positive groups are underscored.

Chemical	Phase P1, P2 or CT	Dose % LD ₅₀	N° of treatments	Sampling time					
				30	36	48	60	72	96
Chloroform	P1	80	2			0,0,0,0		0,1,0,0	0,1
	P2	80	1		0,0,0		<u>2,3</u>	0,2	
	CT	80	1				0,0,1,1,1,1		
2-acetylaminofluorene	P2	50	1	0,2			<u>5,2,11</u>		
		50	1				<u>0,0,0,0,1,2,3</u>		
	CT	25	1				<u>3,4,6,8</u>		
		12.5	1				<u>0,1,2,2,4</u>		
							<u>0,1,2,2,4</u>		

試験の結果、小核形成は、1 回目の試行では 2 匹でのみ認められ、2 回目の試行では認められなかった。この試験の結果は、陰性と判定された。

一次 DNA 損傷試験

Morimoto and Koizumi(1983):● 姉妹染色分体交換(SCE)

クロロホルムを含め、トリハロメタン(THM)について、姉妹染色分体交換(SCE)誘発能が、マウス骨髄細胞を用いて *in vivo* で調べられている。

雄の ICR/SJ マウスに、オリーブ油を媒体として、クロロホルムが 0、25、50、100 もしくは 200 mg/kg 体重/日の用量で、1日1回、4日間にわたり経口投与された(Figure 4.9 参照)。50 mg/kg 体重/日以上で、骨髄細胞における SCE 発生頻度の有意な増加が認められた ($P < 0.05$)。200 mg/kg 体重/日群では、1細胞あたりの SCE の数が、対照群に比較して約3個増加していた。

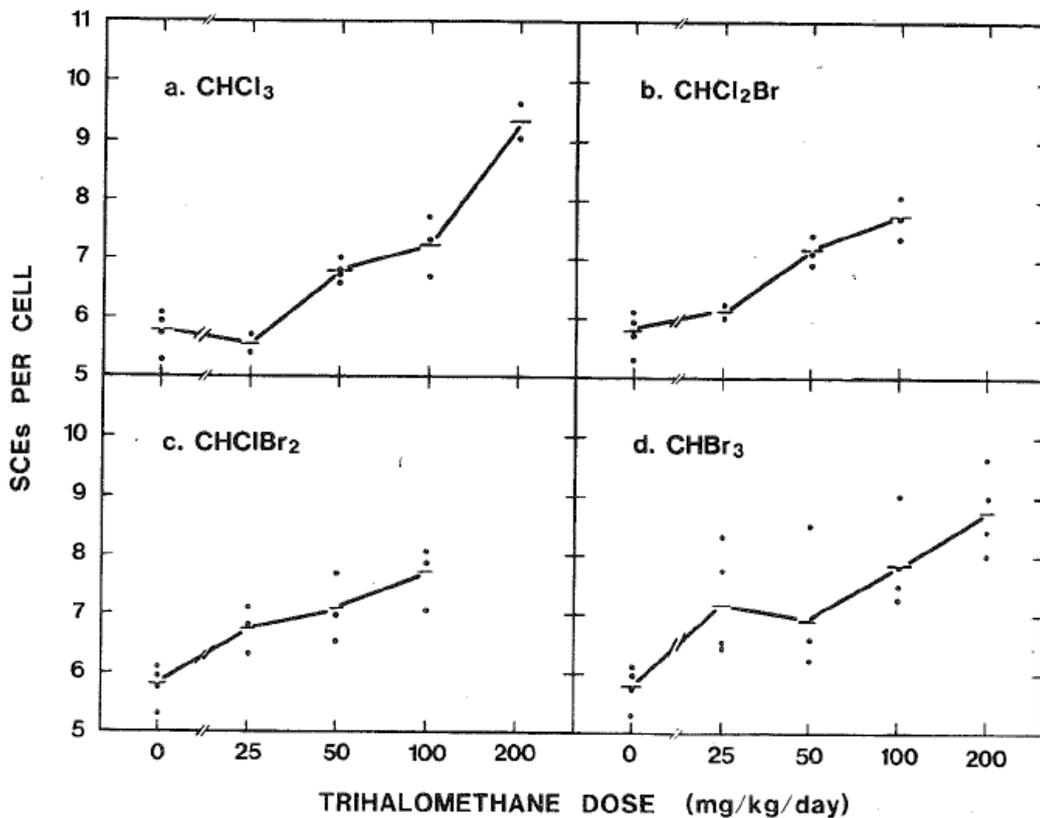


FIG. 3. The frequencies of SCEs in bone marrow cells from mice orally ingesting each of the trihalomethanes for 4 days. Each point represents the mean SCE frequency of 25 second-division cells from each animal. The bar indicates the average of the mean SCE frequencies in each dose group.

Figure 4.9 SCE frequencies in mouse bone marrow cells

著者は、クロロホルム投与による SCE の形成は、クロロホルムの主要かつ毒性学的意義を有する代謝物とされるホスゲンの形成に起因している可能性があることを示唆している (Gemma *et al.*, 2003; Golden *et al.*, 1997; Pohl and Krishna, 1978)。実際、クロロホルムは、トリクロロメタノール(Cl₃COH)に代謝変換された後、混合機能オキシダーゼ(MFO)によっ

でホスゲン(COCl_2)に変換されることが知られている。したがって、ホスゲンは、クロロホルムによる毒性の原因となる活性代謝物ではないかと考えられている。

Pereira et al.(1982):

● DNA 結合性

この試験では、発がんのイニシエーターおよびプロモーターの観点から、トリハロメタンの評価が行われた。著者は、米国国立がん研究所(NCI)の生物検定法により試験を行い、クロロホルムが、遺伝的機序または後成的機序、あるいはそれらの両方の機序によって、がんの発生頻度を上昇させるかどうかを検討した。具体的には、著者は、クロロホルムのDNAへの結合性を評価した。

雄の Sprague-Dawley ラットと雌の B6C3/F1 マウスに、 ^{14}C -クロロホルムが、ラットは 47.2 mg/kg 体重、マウスは 118 mg/kg 体重の用量で、コーン油を媒体として胃内投与された。被験動物は、投与から 16~18 時間後に、頸椎脱臼法により屠殺された。

ラットの肝臓と腎臓では、クロロホルムを示す放射能の明確なピークが、DNA の存在を示す紫外線吸収ピークと連動していることが認められた。一方、マウスの肝臓では、クロロホルムに関する連動は認められなかった。

クロロホルムは、ラットの肝臓や腎臓の DNA に結合することは証明されたが、試験の感度内ではマウスの肝 DNA と結合したことを示す証拠は得られなかった。クロロホルムとラットの肝臓および腎臓の DNA との結合指数は、それぞれ 0.017 と 0.0055 であった。これは、陽性対照として用いたジメチルニトロソアミン(DMN)における結合指数(11.4)の、それぞれ 0.05%と 0.15%に相当する。

クロロホルムの DNA 結合性が低かったことから、クロロホルムによる発がんに関しては、遺伝学的因やイニシエーター的要因が寄与する程度は、ジメチルニトロソアミン(DMN)の場合にみられる遺伝学的要因の寄与の程度よりも、はるかに小さいことが示唆された。

Diaz-Gomez and Castro(1980):

● DNA、RNA もしくは核蛋白質との結合性

この試験は、クロロホルムまたはその代謝物が、ラットまたはマウスの肝臓の DNA や RNA もしくは核蛋白質と共有結合を形成する証拠を得ることを目的としている。

雄の A/J マウスまたは雄の Sprague-Dawley ラットに、 ^{14}C -クロロホルムが、22.72 $\mu\text{Ci/mL}$ の量(比放射活性 5.4 Ci/mol)(推定用量 4.96 mg/kg 体重/日)もしくは毒性量(比放射活性

13.15 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ 、オリーブ油を媒体として濃度 10%) (推定用量 730 mg/kg 体重/日) で、腹腔内投与された。最後のクロロホルム投与から 6 時間後にマウスを屠殺し、肝臓を処理して、DNA または RNA の単離、精製および測定が行われた。マウスの肝 DNA や肝 RNA との共有結合についての結果を、Table 4.40 に示す。

Table 4.40 Studies on possible covalent binding of ^{14}C from $[^{14}\text{C}]\text{CHCl}_3$ to mouse liver DNA or RNA.

Experimental conditions	^{14}C from $[^{14}\text{C}]\text{CHCl}_3$ in dpm/mg	
	DNA	RNA
Control	12 \pm 3	11 \pm 3
Phenobarbital	8 \pm 2	20 \pm 6
3-Methylchloanthrene	13 \pm 3	15 \pm 4
730 mg/kg 1 admin.	16 \pm 4	15 \pm 4
730 mg/kg x 4 days	6 \pm 2	9 \pm 3
730 mg/kg x 2 weeks	3 \pm 1	8 \pm 3

この試験の条件下では、クロロホルムやその反応性代謝物と、マウスの肝臓の DNA や RNA との有意な共有結合は、まったく検出できなかった。ただし、陽性対照(フェノバルビタールおよび 3-メチルコラントレン)で示された DNA 結合性と RNA 結合性は、いずれも高くなかった。

ラットの場合は、最後のクロロホルム投与から 6 時間後に屠殺を行い、肝臓を処理して、核蛋白質画分を分離した。この試験報告には、手順の詳細は記載されていない。

分析したすべての核蛋白質画分から、 ^{14}C -クロロホルム由来の ^{14}C が検出された。著者は、結論として、核蛋白質は ^{14}C -クロロホルム由来の ^{14}C に共有結合するとしており、また、分離されたすべての画分(酸性蛋白質、ヒストン蛋白質、デオキシリボ核蛋白質および残渣)が、共有結合性の相互作用に関与していると述べている。

Reitz et al.(1982):

● In vivo での DNA 結合/DNA 修復試験

さまざまな生物検定において腫瘍が認められた部位(肝臓や腎臓)で、クロロホルムが遺伝学的損傷や臓器毒性を引き起こす能力について、雄の B6C3F1 マウスと雄の Sprague-Dawley ラットを用いて検討が行われた。

DNA への結合性を評価するため、雄の B6C3F1 マウスに、 ^{14}C -クロロホルムが経口投与された(240 mg/kg 体重の用量)。

B6C3F1 マウスの肝臓および腎臓から分離した DNA に、 ^{14}C -クロロホルムが結合する能力は、化学結合指数(CBI)で表すと、1.5 $\mu\text{mol}/\text{mol}$ DNA であった。クロロホルム投与による

CBI の増加は、アフラトキシン (CBI=17,000 $\mu\text{mole/mol DNA}$)、ジメチルニトロソアミン (CBI=6,000 $\mu\text{mol/mol DNA}$) など、DNA に強く結合する化合物と比較すると、わずかなものであった。

DNA 修復は、以下の方法で検討された。すなわち、正常な DNA 合成を抑制するのに十分な量のヒドロキシウレアを投与した被験動物に、非放射性クロロホルム投与し、 ^3H -チミジンが DNA に取り込まれる割合を測定した。この試験報告には、この手順の詳細は記載されていない。結果を Figure 4.10 に示す。

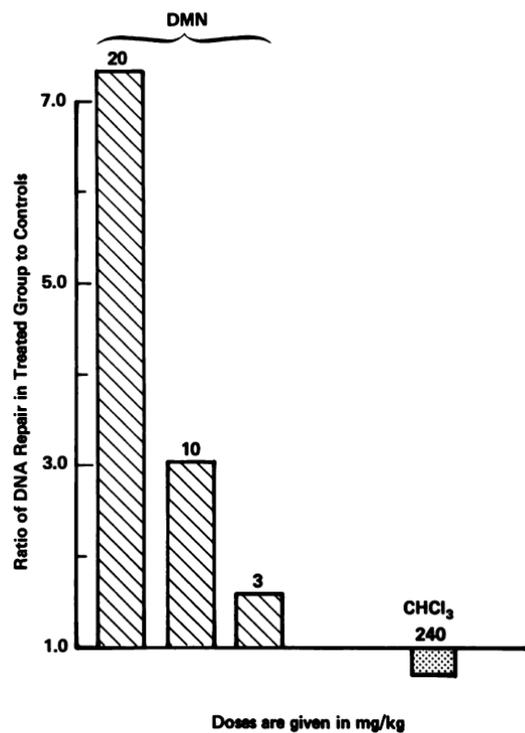


FIGURE 1. DNA repair in the liver of mice treated with dimethylnitrosamine (DMN) or chloroform (CHCl₃) relative to control groups.

Figure 4.10 DNA repair in the liver of mice treated with dimethylnitrosamine (DMN) or chloroform (CHCl₃) relative to control group.

ジメチルニトロソアミン(DMN)の腹腔内投与により、B6C3F1 マウスの肝臓では、DNA 修復の大幅な増高が引き起こされたが、クロロホルムは、この試験系では活性を示さなかった。したがって、これらのデータからは、クロロホルムの経口投与による DNA 修復の誘発(ヒドロキシウレアの適用にもかかわらず DNA に取り込まれた ^3H -チミジン量から推測)については、何ら有意性は示されなかった。

Potter et al.(1996):● **DNA 鎖切断の誘発**

クロロホルムを含む 4 種類のトリハロメタンが腎臓における DNA 鎖切断に及ぼす影響について、雄の F-344 ラットを用い、アルカリ巻き戻し法によって検討された。

雄の F-344 ラットに、クロロホルムが、0.75 mmol/kg 体重(88.5 mg/kg 体重に相当)または 1.5 mmol/kg 体重(177 mg/kg 体重に相当)の用量で、連続して 7 日間、植物油を媒体として強制経口投与された(他のトリハロメタンの場合も同モルで投与された)。DNA 鎖切断の誘発は、二本鎖 DNA 画分によって評価された。二本鎖 DNA 画分の減少は、陽性対照のジエチルニトロソアミンとジメチルニトロソアミンで認められ、これは、DNA 鎖切断の誘発を示唆するものである。

結果を Table 4.41 に示す。

Table 4.41 DNA strand break induction by THMs.

Treatment	Fraction of double stranded DNA remaining after 45 min unwinding
Vehicle control	0.83 ± 0.02
Chloroform	0.87 ± 0.01
Diethylnitrosamine	0.79 ± 0.003*
Dimethylnitrosamine	0.55 ± 0.02*

* Significantly different from control, p<0.05.

クロロホルムについて認められた二本鎖 DNA 画分は、陰性対照について認められた画分と同等であったことから、クロロホルムはラットの腎臓において DNA 鎖切断を誘発しなかったことが示唆される。

Mirsalis et al.(1982):● **不定期 DNA 合成(UDS)試験**

雄の Fischer 344 ラットに、クロロホルムが 0、40 もしくは 400 mg/kg の用量で単回経口投与され、肝細胞における不定期 DNA 合成(UDS)が測定された。ラットは単回投与後、2 時間または 12 時間で屠殺された。この試験は、細胞がメチルグリーンピロニン Y の溶液で染色されたこと以外、OECD ガイドライン 486 に従って、重きな逸脱なく実施された。結果を Table 4.42 に示す。

Table 4.42 Induction of UDS by chemicals in the in vivo – in vitro hepatocyte DNA repair assay.

Chemical	Dose mg/kg	Sacrifice Time (h)	Number of treated animals	NG ± SE
Corn oil		2	7	-5.1 ± 0.5
		12	13	-4.4 ± 0.5
DMN	10	2	4	55.8 ± 3.3
CCl ₃	40	2	3	-4.1 ± 0.4
	400	2	3	-4.4 ± 0.8
	400	12	3	-2.7 ± 0.3

正味粒子(NG)形成については、クロロホルムが投与された被験動物の細胞と陰性対照の細胞との間に、差は認められなかった。陽性対照であるジメチルニトロソアミン(DMN)の場合には、NG形成に有意な増高が認められた。

細胞増殖

Larson et al.(1994):

- 肝臓および腎臓における再生性細胞増殖

この試験は、雄の F-344 ラットの肝臓および腎臓におけるクロロホルム誘発性細胞増殖について、用量依存性を判定することを目的としている。クロロホルムを雄の F-344 ラットに強制経口投与または飲水投与し、標識率(LI)を求め、被験動物の肝臓および腎臓中の S 期細胞の割合として評価した。

強制経口投与の場合では、(i) 腎臓については、4 日目に 180 mg/kg 体重/日群でのみ、標識率の増加が認められ、(ii) 肝臓については、4 日目に 90 mg/kg 体重/日以上群、および 3 週間目に 180 mg/kg 体重/日群で、標識率の増加が認められた。

飲水投与の場合では、クロロホルムへの曝露による標識率の増加は、4 日目も 3 週目も、腎臓のどの部分においても認められなかった。飲水投与における用量範囲(0~90 mg/kg 体重/日)は、強制経口投与における用量範囲より狭かった。

著者らは、結論として、細胞増殖の用量依存的な増加は、コーン油を媒体として投与したクロロホルムによる、軽度の肝毒性影響に関連していると述べている。

この試験報告には、ラットの肝臓と腎臓において再生性細胞増殖が生じたことが記述されている。この試験で示された結果が、クロロホルムの変異原性の評価においてどのような意義を有するかは不明である。

Table 4.43 Summary of keystudies.

Species	End Point	Doses	Exposure	Vehicle	Route of administration	Results	Reliability	Guideline Deviations	References
Micronucleus assay									
Sprague Dawley rat	MN Kidney	472 mg/kg bw/d	Single dose	Corn oil	Oral	+ 472 mg/kg bw/d	2	OCDE 471 Rat kidney cells instead of erythrocytes	Robbiano <i>et al.</i> , 1998
Mice	MN Bone marrow	0; 238; 476; 952 mg/kg bw	Treatment at 0 and 24 h	Olive oil	i.p	-	2	OCDE 471	Gocke <i>et al.</i> , 1981
Male and female mice	MN Bone marrow	0; 22; 44; 89 mg/kg bw	2 treatments at 24 h sacrifice 6 h after the final injection	DMSO	i.p	-	2	OCDE 471 Route of administration was not adequate	Tsuchimoto and Matter, 1981
B6C3F1 mice	MN Bone marrow	200, 400, 800 mg/kg bw	3 daily inject	Corn oil	i.p	+	2	OCDE 474 No deviation	Shelby and Witt 1995
B6C3F1 mice	MN Bone marrow	80% of LD ₅₀	½ daily doses	DMSO	i.p	+/- 60 h	2	Only one concentration was tested (80% LD ₅₀) 500 PCE counted per mouse	Salamone <i>et al.</i> , 1981
Chromosomal aberration									
B6C3F1 mice	CA Bone marrow	200, 400, 800 mg/kg bw	single injection	Corn oil	i.p	-	2	OCDE 475 no major deviation	Shelby and Witt 1995
Long Evans rat	CA Bone marrow	1.2, 11.9 and 119.4 mg/kg bw	5 days	Distilled water	Oral	+ 119 mg/kg	2	OCDE 475 no deviation	Fujie <i>et al.</i> , 1990

74/108

Species	End Point	Doses	Exposure	Vehicle	Route of administration	Results	Reliability	Guideline Deviations	References
Long Evans rat	CA Bone marrow	1.2, 11.9 and 119.4 mg/kg bw	Treatment at 0h, sacrifice at 6, 12, 18 or 24 h	Distilled water	i.p	+ 1.2 mg/kg	2	OCDE 475 no deviation	Fujie <i>et al.</i> , 1990
Male and female hamsters	CA Bone marrow	0; 40; 120; 400 mg / kg bw	6, 24, 48 h	Paraffin oil	Oral	+/- 400 mg/kg bw	1	OCDE 475 No deviation	Hoechst <i>et al.</i> , 1988 Not published
Sister chromatide exchange –									
ICR/SJ mice	SCE Bone marrow	25, 50, 100, 200 mg/kg bw	4 days	Olive oil	Oral	+ \geq 50 mg /kg bw/d	2	OCDE 479 No deviation	Morimoto and Koizumi 1982
Mutations									
B6C3F1 mice	Mutation Liver	0; 50; 166; 500 mg / kg bw	6h / 7 days Sacrifice at 24 after treatment	Unspecified	Inhalation	-	2	No guideline	Butterworth <i>et al.</i> , 1998
DNA damage – DNA binding									
Sprague Dawley rat	DNA binding Liver, kidney	47.2 mg/kg bw/d	Single dose	Corn oil	Oral	+/- 47.2 mg/kg bw/d	2	No Guideline	Pereira <i>et al.</i> , 1982
B6C3F1 mice	DNA binding Liver, kidney	118 mg/kg bw /d	Single dose	Corn oil	Oral	-	2	No Guideline	Pereira <i>et al.</i> , 1982
B6C3F1 mice	DNA binding Liver, kidney	240 mg/kg bw /d	Single dose	Unspecified	Oral	+/- 240 mg/kg bw/d	2	No Guideline	Reitz <i>et al.</i> , 1982
B6C3F1 mice	DNA binding Liver, kidney	240 mg/kg bw /d	Single dose	Unspecified	Oral	-	2	No Guideline	Reitz <i>et al.</i> , 1982
F-344 rats	DNA strand break Kidney	88.5 ; 177 mg /kg bw/d	7 days	Vegetable oil	Gavage	-	2	No Guideline	Potter <i>et al.</i> , 1996

Species	End Point	Doses	Exposure	Vehicle	Route of administration	Results	Reliability	Guideline Deviations	References
Male F-344 rats	UDS DNA repair Liver	0; 40; 400 mg/ kg bw /d	Single dose	Corn oil	Gavage	-	2	OCDE 486 No deviation	Mirsalis <i>et al.</i> , 1982
Male A/J mice	DNA binding Liver	Up to toxic dose	Single or once daily for 4 days or twice a week for 2 weeks	Olive oil	i.p	-	2	No guideline	Diaz-Gomez and Castro, 1980

クロロホルムに関して、30 件の *in vivo* 試験の情報が得られている。本リスク評価書では、その 16 件について記載し、その内 14 件を Table 4.43 に要約した。Vogel and Nivard(1993)、Gocke *et al.*(1981)、および Vogel *et al.*(1981)については、*Drosophila Melanogaster*(キイロショウジョウバエ)を用いた試験であるため、本リスク評価書には記載されていない。Le Curieux *et al.*(1995)および Fernandez *et al.*(1993)については、トゲイモリ属の幼生を用いて行われた試験であるため、考慮の対象としなかった。

残りの試験については、信頼度が 3 または 4 と低いため、本リスク評価書では、Table 4.44 に要約して、情報を網羅的にするに留める。

Table 4.44 Summary of non reliable studies conducted in rats or mice.

Species	End Point	Doses	Exposure	Vehicle	Route of administration	Results	Reliability	Guideline	References
Lacca mice	Chromosomal aberration	0, 100, 200 mg/kg	Treatment at 0h, sacrifice at 6, 12 and 24 h at 100 mg/kg	ND	s.c	+	3	No	Sharma and Anand, 1984
Albino mice	Micronucleus in bone marrow cells	0, 100, 200, 400, 600, 700, 800, 900 mg/kg	No data	ND	No data	+	3	No	San Augustin and Lim- Sylianco, 1978
Male F-344 rats	Micronucleus in hepatocytes	0, 100, 200, 400 mg/kg	No data	ND	i.p	+	4	No	Sasaki <i>et al.</i> , 1998
ICR mice	Sister chromatid exchange	0, 1665 mg / kg bw /day	Up to 6 h	ND	inhalation	+	4	No	Iijima <i>et al.</i> , 1982

Species	End Point	Doses	Exposure	Vehicle	Route of administration	Results	Reliability	Guideline	References
Male Wistar rats and Balb/c mice	Binding to DNA, RNA and proteins	500 μ ci/ kg bw	Treatment at 0h sacrifice at 22h	ND	i.p	+	3	No	Colacci <i>et al.</i> , 1991

データの要約

In vitro では、同じ試験系を用いた試験が実施されているが、それらの結果は、陽性も散見されたものの、数の上では、陰性の方が多い。

In vivo では、DNA 結合性を検討した試験によって、クロロホルムやその代謝物は DNA とは結合しないか、わずかしかな結合しないことが示唆されている (Pereira *et al.*, 1982; Reitz *et al.*, 1982; Butterworth *et al.*, 1998; Mirsalis *et al.*, 1982; Diaz-Gomez and Castro, 1980; Rosenthal *et al.*, 1987)。

ラットとマウスでは、クロロホルムの経口投与によって小核形成と染色体異常が誘発されたが (Robbiano *et al.*, 1998; Morimoto and Koizumi, 1983; Fujie *et al.*, 1991)、ハムスターでは誘発されなかった (Hoechst *et al.*, 1988)。また、腹腔内投与では、ラットにおいて、染色体異常が誘発された (Fujie *et al.*, 1990)。マウスでは、低用量での投与試験 (Tsuchimoto and Matter, 1981) や単回投与試験 (Shelby and Witt, 1995; Gocke *et al.*, 1981) では影響が誘発されなかったが、高用量での反復投与試験 (Shelby and Witt, 1995) では陽性影響が誘発された。クロロホルムへの曝露により、小核形成の頻度が、Robbiano *et al.* (1998) の試験では陰性対照の約 3.32 倍 (陽性対照の 50%) に増加し、Shelby and Witt (1995) では陰性対照の約 1.75 倍 (陽性対照に関するデータは得られなていない) に増加した。クロロホルム処置による小核形成が陽性とされた試験でも、その増加は、陰性対照の値の 1.75~3.32 倍の範囲であった。

Fujie *et al.* (1990) の試験では、染色体異常の形成頻度が、経口投与の場合は約 6 倍、腹腔内投与の場合は約 8.5 倍に増加した。

Potter *et al.* (1996) の試験では、F-344 ラットにクロロホルムが 88.5 mg/kg 体重または 177 mg/kg 体重の用量で 7 日間投与されたが、DNA 鎖切断は認められなかった。

クロロホルムの代謝

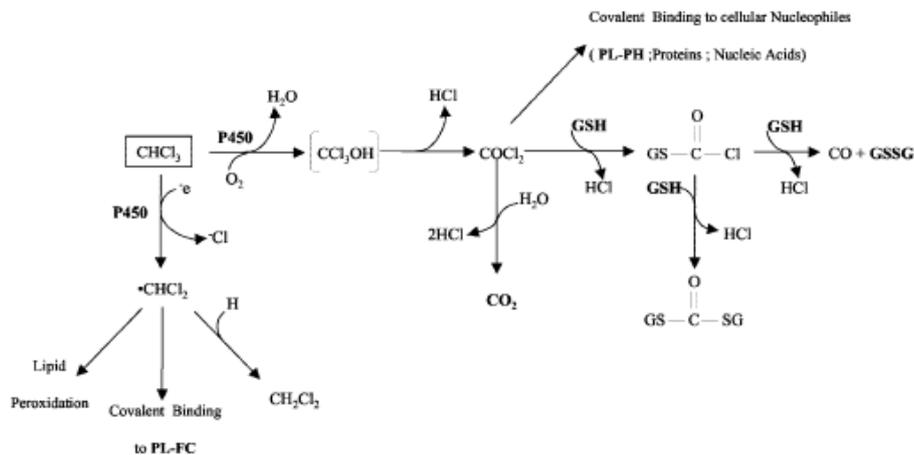
クロロホルムは、ヒトの肝臓では、酸化的代謝と還元的代謝の両方を受ける可能性があり (Figure 4.11)、どちらの代謝を受けるかは、酸素濃度と基質濃度によって決まる。クロロホルムの毒性が誘発されるためには、クロロホルムがシトクロム P450 を介した生体内活性化を受ける段階が必要で、それにより反応性代謝物が生成される。げっ歯類を用いた広範な *in vitro* 試験や *in vivo* 試験によって、クロロホルムは、酸化的に代謝されるとトリクロロメタノールになり、トリクロロメタノールは、自然に分解されて求電子性のホスゲン (COCl_2) になることが示されている。ホスゲンは非常に反応性が高く、求核性官能基を有する細胞成分 (蛋白質、リン脂質の極性頭部基、還元性グルタチオンなど) に共有結合する

(Gemma et al., 2003)。

ヒトが塩素消毒水を飲んでクロロホルムに曝露される場合に相当する程度の低濃度の場合、クロロホルムは、主として CYP2E1 によってホスゲンへと代謝される。CYP2E1 を介した反応が飽和されると、CYP2A6 がホスゲンの生成における主要な役割を果たし、その場合、非常に酸素分圧が低い条件下(酸素分圧 1%)でも、反応効率が高い。ホスゲンは、ヒトの肝臓で生成される、毒物学的意義のある、主要代謝産物である(Gemma et al., 2003; Golden et al., 1997)。

高濃度の場合、クロロホルムは、その求電子性の塩素原子の働きにより、ホスゲンの半減期を延長させると考えられている。その働きにより安定化が生じて水との直接反応が妨げられ、ホスゲンは、より反応性の高い化合物、たとえば、グルタチオンなどの重要な細胞成分まで到達できるようになる(Potts et al., 1949)。

一方、クロロホルムが還元的に代謝されると、ジクロロメチルラジカル($\cdot\text{CHCl}_2$)が生成する。ジクロロメチルラジカルは、反応性が非常に高く、脂質の過酸化を引き起こす能力がある。脂質の過酸化は、さらなる過酸化ラジカル形成の一因となり得る。



PL-FC= Adducts to Phospholipids Fatty Acyl Chains ; PL-PH= Adducts to Phospholipids Polar Heads;

GSH=reduced glutathione; GSSG= oxidated glutathione; P450= cytochrome P450)

FIG. 1. The two pathways of chloroform bioactivation.

Figure 4.11 The two pathways of chloroform bioactivation.

グルタチオン

クロロホルムの急性毒性は、グルタチオンの枯渇によるものであり(Brown et al., 1974;

Steven and Anders, 1981)、肝臓に顕微鏡学的な病変が生ずるのに先立って、グルタチオン量に用量依存的な減少が認められることが報告されている (Brown *et al.*, 1974; Docks and Krishna, 1976)。

Ammann *et al.*(1998)は、クロロホルムだけでなくホスゲンも、グルタチオンの中程度の枯渇を引き起こすことを示している (Sciuto *et al.*, 2004; Jaskot *et al.*, 1991)。グルタチオンは、抗酸化を担うべく細胞で産生されるが、この抗酸化機能は、飽和閾値を有すると考えられている。クロロホルムやホスゲンによってグルタチオン量が減少すると、その分の抗酸化レベルが低下する。これにより、酸化ストレスが増加するだけでなく、反応性活性酸素種の生成量も増加すると考えられる。これらの反応性活性酸素種(フリーラジカル)は、生成すると DNA に結合し、高用量投与や反復投与の場合、遺伝毒性の一因となると考えられる。

媒体の役割

実験動物を用いたいくつかの試験の結果から、クロロホルムを投与する際に使用する媒体が、毒性に影響を及ぼす可能性が示唆されている (US EPA, 2001)。たとえば、Larson *et al.* (1994)の試験では、雄の F-344 ラットにおける用量依存的な腎損傷の増加が、クロロホルムをコーン油を媒体として投与した場合には認められ、クロロホルムを飲水投与した場合には認められなかったことが報告されている。ただし、この試験では、飲水投与によるクロロホルムへの曝露用量(0~90 mg/kg 体重/日)は、コーン油を媒体とした場合の曝露用量(0~180 mg/kg 体重/日)よりも低かった。本リスク評価書で取り上げた結果からは、媒体に関するこの仮説は裏付けられなかった。これは、クロロホルムを蒸留水を媒体として投与した Fujie *et al.*(1990)の試験では、陽性の結果(染色体異常)が示されているが、クロロホルムをコーン油を媒体として投与した Pereira *et al.*(1982)、Potter *et al.*(1996)、Gocke *et al.* (1981)、および Mirsalis *et al.*(1982)の試験では、陰性の結果が示されていることによる。

ホスゲンの役割

ILSI(1997)では、ホスゲンについて、非常に反応性が高いことが示され、DNA と直接相互作用できることが予想されているが、その一方で、標準的な変異原性の試験系を用いた検討が行われていないことが指摘されている。また、ホスゲンは反応性が高いため、クロロホルムの代謝によってサイトゾル中に生成したホスゲンは、細胞核に達する前に、おそらく細胞成分と反応すると考えられており、おそらく DNA に直接影響を及ぼすことはないであろうと結論づけられている。しかしながら、この結論は、ホスゲンがヒトのヒストン H2B の N 末端(特にプロリン残基やセリン残基)と反応することができ、したがって細胞核

に到達できることを示した最近の知見(Fabrizi *et al.*, 2003)とは矛盾する。ヒストン H2B は、真核細胞のクロマチン構造体に含まれている、主要な 5 種類のヒストン蛋白質の一つである。ヒストン H2B は、主要な球状部と長い N 末端尾部からなり、ヌクレオソーム構造(「糸に通したビーズ状」の構造)の形成に関わっている。ヒストンは、クロマチンの折り畳み、DNA の安定化、DNA 二本鎖切断修復に関与している。また、Diaz-Gomez *et al.*(1980) は、クロロホルムやその代謝物が、ヒストンなどの核蛋白質と結合し得ることを示している。

機序の仮説

本リスク評価書に示したデータからは、クロロホルムが DNA に結合しないことが示唆される。以前の試験(Brown *et al.*, 1974; Gopinath and Ford, 1975; Constant *et al.*, 1999; Pohl and Krishna, 1978)と、本リスク評価書に示した結果は、クロロホルムの毒性の発現には、シトクロム P450 によるクロロホルムの代謝(Figure 4.12 の(1))が必要であるという結論を裏付けている。

データからは、クロロホルムだけでなくホスゲンも、グルタチオン(GSH)の枯渇(Figure 4.12 の(2))を引き起こすことが示唆される。グルタチオンの枯渇は、酸化ストレス(Figure 4.12 の(3))増高の一因となると考えられる。さらに、Fabrizi *et al.*(2003)によって、ホスゲンがヒストン H2B と反応し(Figure 4.12 の(4))、それによって DNA 修復障害を引き起こされる可能性も示されている。これらの帰結について、Figure 4.12 に要約した。

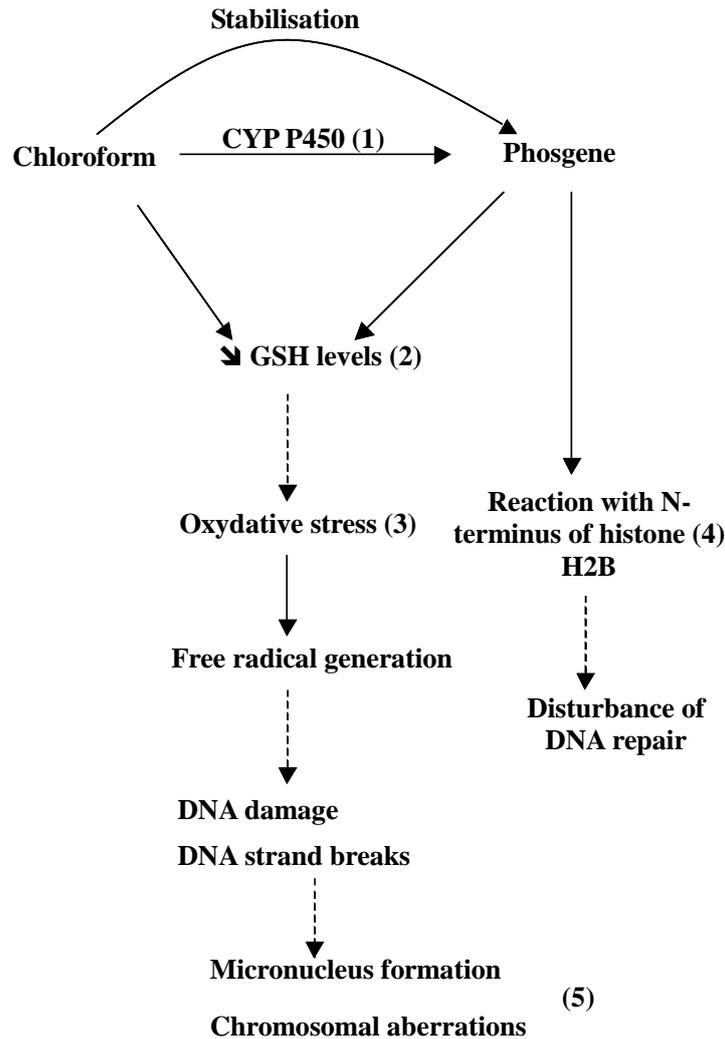


Figure 4.12 Hypothesis for micronucleus formation and chromosomal aberration after exposure to chloroform

4.1.2.7.3 変異原性の要約

他のグループによるレビュー:

クロロホルムの変異原性に関するデータのレビューと評価が、近年、いくつかのグループ〔国際がん研究機関(IARC)、米国環境保護庁(US EPA)、国際生命科学研究所(ILSI)および世界保健機関(WHO)]によって行われた。これらのレビューのほとんどは、クロロホルムについて、強い突然変異原物質ではないが、弱い遺伝毒性作用を有する可能性は除外できないと結論づけている。

ILSI(1997)では、クロロホルムの変異原性について得られたデータが、レビューされている。ILISの委員会は、観察データのいずれをとっていても、特定の遺伝毒性の作用機序を、

クロロホルムに関連付けられるものとして、明確に示してはいないと結論づけており、さらに、大半の証拠は、クロロホルムには強い変異原性がないことを示していると述べている。発がん性化学物質に関する IARC の試験(IARC, 1999)では、ヒトに関しては、クロロホルムによる遺伝学的影響やそれに関連した影響に関するデータは得られなかったと結論づけられている。クロロホルムの遺伝毒性を支持する薄弱な証拠が、*in vivo* 試験系と哺乳類細胞、真菌および酵母を用いた *in vitro* 試験系で得られている。細菌に対する変異原性は認められていない。

US EPA (2001)は、クロロホルムについて、変異原性があることを確実に除外することはできないとしても、強い突然変異原物質ではないことと、クロロホルムもその代謝物も、DNA に容易に結合しないことが、証拠の重み付けによって示唆されると結論づけている。

Environment Canada (2001)を原資料とした CICAD (2004)は、ほとんどの試験でクロロホルムの遺伝毒性を確認できなかったと結論づけている。少数の、非標準的な試験により、ラットでは弱い陽性反応が見られる可能性が示唆される。しかし、全体的に見ると、証拠の重み付けから、クロロホルムには顕著な遺伝毒性はないことが示唆される。

本リスク評価書では、Klimish 評価システムに従って、信頼性が 1 または 2 の試験を中心に取り上げている。*In vivo* では陰性の結果も報告されているが、国際的なレビューに掲載されているいくつかの *in vivo* 試験では、クロロホルムによって小核形成や染色体異常が誘発される可能性のあることが示されている。標的臓器である腎臓や、3 回以上の投与を受けた被験動物の骨髄細胞において、陽性の結果が認められた。このことは、グルタチオンの枯渇による酸化損傷の機序と、整合しているものと考えられる。また、小核試験と染色体異常試験においては、ラットを用いた場合はいずれも陽性の結果が報告されているが、マウスを用いた場合には陽性と陰性の両方の結果が報告されている。

これらの試験から、クロロホルムは、*in vivo* ではわずかに遺伝毒性のある化合物であり、カテゴリ-3 の変異原性化合物に分類する必要があることが示唆される。

4.1.2.8 発がん性

4.1.2.8.1 動物における試験

In vivo 試験

吸入

Yamamoto *et al.* (2002)により、BDF1 マウスおよび F344 ラット(雌雄各 50 匹/群)を用いて、発がん性試験が行われている。クロロホルムへの吸入曝露が、マウスでは 5、30 もしくは 90 ppm の濃度で、ラットでは 10、30 もしくは 90 ppm の濃度で、1 日 6 時間、週 5 日、104 週間にわたり実施された。マウスでは、30 と 90 ppm の濃度では急性致死が生じるため、これより低い濃度で曝露する適応期間が設けられた。すなわち、30 および 90 ppm 群のマウスについては、最初の 2 週間を 5 ppm、その次の 2 週間を 10 ppm(90 ppm 群では、さらにその次の 2 週間を 30 ppm)で曝露した後、それぞれ残りの期間を 30 ppm や 90 ppm で曝露した。30 および 90 ppm 群の雄のマウスで、腎細胞腺腫と腎細胞がんを合わせた発生率が、統計的に有意に増加した(対照群 0/50 匹、5 ppm 群 1/50 匹、30 ppm 群 7/50 匹、90 ppm 群 12/48 匹。以下の表を参照)。90 ppm 群の雄のマウスでは、腎細胞がんの発生率が、対照群に比較して統計的に有意に増加した(対照群 0/50 匹、90 ppm 群 11/48 匹)。雌のマウスと雌雄のラットでは、いずれの曝露濃度でも、腫瘍発生率の統計的に有意な増加は認められなかった。5 ppm 以上の群では、雌雄のラットと雌のマウスで、鼻腔病変(骨肥厚、嗅上皮における萎縮や呼吸上皮化生など)が認められた。マウスにおける腎細胞腺腫および腎細胞がんに関する NOAEC は 5 ppm、鼻腔病変に関する LOAEC は 5 ppm と判定された。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。)

EURAR CHLOROFORM

Table 4.45 Incidences of neoplastic lesions in the mice and rats exposed to chloroform vapor at different concentrations for 104 weeks (Yamamoto et al., 2002)

(A) Mice

Group	Male					Female				
	Control	5 ppm	30 ppm	90 ppm	Peto	Control	5 ppm	30 ppm	90 ppm	Peto
Number of animals examined	50	50	50	48		50	49	50	48	
Liver										
Hepatocellular adenoma	5	7	6	8		1	1	4	3	
Hepatocellular carcinoma	10	0**	7	10	↑	1	1	0	3	↑
Hepatocellular adenoma + carcinoma	14	7	12	17	↑	2	2	4	6	↑↑
Hemangioma	0	0	1	0		0	0	0	0	
Hemangiosarcoma	3	0	2	1		2	0	0	1	
Histiocytic sarcoma	2	0	0	0		0	0	1	0	
Kidneys										
Renal cell adenoma	0	0	3	1		0	0	0	0	
Renal cell carcinoma	0	1	4	11**	↑↑	0	0	0	0	
Renal cell adenoma + carcinoma	0	1	7*	12**	↑↑	0	0	0	0	

(B) Rats

Group	Male					Female				
	Control	5 ppm	30 ppm	90 ppm	Peto	Control	5 ppm	30 ppm	90 ppm	Peto
Number of animals examined	50	50	50	48		50	49	50	48	
Liver										
Hepatocellular adenoma	0	0	0	0		1	0	2	1	
Kidneys										
Renal cell adenoma	0	0	0	0		0	0	0	1	
Pituitary gland										
Adenoma	22	23	21	17		24	20	18	11*	

*:P ≤ 0.05, **:P ≤ 0.01 Fisher Exact Test, ↑:P ≤ 0.05, ↑↑:P ≤ 0.01 Peto's Test

Nagano *et al.* (2006)による吸入および経口併合発がん性試験の中で、F344 ラット(雄 50 匹/群)が、クロロホルム蒸気を 0(清浄な空気)、25、50 もしくは 100 ppm(v/v)の濃度で含む空気に、1 日 6 時間、週 5 日で、104 週間にわたり吸入曝露された。いずれの曝露群でも、腎腫瘍の発生率に、統計的に有意な変化は認められなかった。

経皮

データは、得られていない。

経口

NCI(1976)は、Osborne-Mendel ラットと B6C3F1 マウスを用い、78 週間の強制経口投与により、クロロホルムの発がん性を検討した(IARC, 1999 の中で引用)。クロロホルムの投与用量は、コーン油を媒体として、90 または 180 mg/kg 体重/日(ラット雄)、100 または 200

mg/kg 体重/日(ラット雌)、138 または 277 mg/kg 体重/日(マウス雄)、238 または 477 mg/kg 体重/日(マウス雌)であった。ラットでは、高用量群の雄で、腎上皮性腫瘍の発生頻度が、対照群の雄に比較して統計学的に有意に増加(24%)した(対照群 0/99 匹、適合対照群 0/19 匹、低用量群 4/50 匹、高用量群 12/50 匹)。マウスでは、低用量群と高用量群で雌雄ともに、肝細胞がんの発生頻度が、対照群に比較して統計学的に有意に増加した(対照群の雄 5/77 匹、適合対照群の雄 1/18 匹、138 mg/kg 体重/日群の雄 18/50 匹、277 mg/kg 体重/日群の雄 44/45 匹、対照群の雌 1/80 匹、適合対照群の雌 0/20 匹、238 mg/kg 体重/日群の雌 36/45 匹、477 mg/kg 体重/日群の雌 39/41 匹)。マウスの低用量群では、肝細胞がんを発症しなかった雄の多くで、肝臓の結節性過形成が認められた。ラットでは曝露群の雌で、甲状腺腫瘍の発生率の増加が認められたが、この増加は、統計学的に有意ではなかった。

Roe *et al.*(1979)は、異なる系統のマウス(雌雄、10 週齢)を用い、クロロホルムを 1 週間に 6 日、80 週間にわたり強制経口投与する試験を 3 回行なった。3 回の試験とも、クロロホルム投与群と対照群の間で、生存率、体重、および摂餌量に、統計学的に有意な差は認められなかった。ICI マウスでは、高用量(60 mg/kg/日)群の雄で、対照群に比較して、中等度～重度の肝脂肪変性がわずかに増加し、腎腫瘍(腺腫とがん腫)の統計学的に有意な増加が認められた。CBA マウスと CF/1 マウスでは、曝露群で、中等度～重度の腎病変の発生率の増加が認められた。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。)

Table 4.46 Incidence of renal tubule adenomas and carcinomas in ICI mice exposed orally to chloroform (Roe et al., 1979 in IARC, 1999)

Treatment	Sex	Incidence of renal tumors
First Study		
Vehicle Control (toothpaste)	Male	0/72
17 mg/kg bw/day CHCl ₃		0/37
60 mg/kg bw/day CHCl ₃		8/38
Vehicle Control (toothpaste)	Female	0/59
17 mg/kg bw/day CHCl ₃		0/35
60 mg/kg bw/day CHCl ₃		0/38
Second Study		
Control	Male	1/48
Vehicle Control (toothpaste)		6/237
60 mg/kg bw/day CHCl ₃		9/49
Third Study		
Control	Male	0/83
Vehicle Control (toothpaste)		1/49
Vehicle Control (arachis oil)		1/50
60 mg/kg bw/day (toothpaste) CHCl ₃		5/47
60 mg/kg bw/day (arachis oil) CHCl ₃		12/48

Jorgenson *et al.* (1985)の試験では、雄の Osborne-Mendel ラットと雌の B6C3F1 マウスに、クロロホルムが、104 週間飲水投与された。摂水量および体重の測定値に基づいて、各群の時間加重平均用量が、ラットではそれぞれ 0、19、38、81 および 160 mg/kg/日、マウスではそれぞれ 0、34、65、130 および 263 mg/kg/日と算出された。ラット雄の高用量群で、腎腫瘍(尿細管の細胞腺腫と腺がん)の発生率に、統計学的に有意で用量依存的な増加が認められた〔対照群 2% (5/301 匹)、適合対照群 2% (1/50 匹)、19mg/kg/日群 2% (6/313 匹)、38mg/kg/日群 5% (7/148 匹)、81mg/kg/日群 6% (3/48 匹)、160mg/kg/日群 14% (7/50 匹)〕。雌の B6C3F1 マウスでは、クロロホルムの飲水投与による、肝細胞がん発生率の増加は認められなかった。肝細胞腺腫と肝細胞がんを合わせた発生率は、対照群で 6%であったのに対して高用量群では 2%であった。著者らは、この試験と NCI(1976)による生物試験との間に結果の差が認められたことについて、投与方法(飲水投与か、コーン油を媒体とした強制経口投与か)の違いが関係しているかもしれないと推測している(Jorgenson *et al.*, 1985、US EPA, 2001 の中で引用)。

Osborne-Mendel ラットにおけるクロロホルムの発がん性試験(Jorgenson *et al.*, 1985)で得られた腎臓組織を再評価することにより、クロロホルムによる細胞毒性の誘発や細胞代謝回転への影響を示す組織学的証拠について検討が行われた。2 年間 1800 ppm(160 mg/kg/日)で飲水投与を受けていた群の全例と同じく 900 ppm(81 mg/kg/日)で飲水投与を受けていた群の半数で、慢性細胞毒性の徴候である軽度～中等度の変性が、腎皮質の中間部から深部にかけての近位曲尿細管に認められた。クロロホルムへの慢性曝露と特に関連の深い尿細管変化として、細胞質の好塩基性増高、細胞質の空胞化、および核の過密化が認められ、これらは単純型の尿細管過形成の所見と整合していた。核濃縮細胞、近位尿細管における有糸分裂像、および、尿細管上皮の顕著な巨大核も散見された。これらの変化は、対照群、200 ppm(19 mg/kg/日)群、および 400 ppm(38 mg/kg/日)群では認められなかった。この知見は、ラットの腎臓におけるクロロホルム誘発性発がん、持続性細胞毒性と慢性再生性過形成が、重要な事象として関わっているとする証拠の重みを、著しく高めるものである(Hard *et al.*, 2000)。

吸入と経口による複合曝露

Nagano *et al.* (2006)の試験では、雄の F344 ラットを用い、クロロホルムについて、吸入と経口の複合経路で曝露した場合、発がん性や慢性毒性にどのような影響が及ぼされるかが調べられている。雄のラット(50 匹/群)に対し、吸入曝露は、クロロホルム蒸気を 0(清浄空気)、25、50 もしくは 100 ppm(v/v)の濃度で含む空気に、1日6時間、週5日、104 週間にわたって実施された。各群には、さらに、クロロホルムを 1000 ppm(w/w)の濃度で配合した水もしくは水(媒体)が、104 週間にわたって自由摂取で与えられた。腎細胞腺腫、腎細

胞がん、および尿細管異型過形成の増加が、吸入と経口による複合曝露群で認められたが、経口曝露のみの群と吸入曝露のみの群では認められなかった。この試験の結果、複数経路で曝露を受けた群で認められた腎腫瘍は、強制経口投与のみによる曝露や飲水投与のみによる曝露が行われた試験でこれまでに報告された腎腫瘍よりも、サイズが大きく(平均サイズ 16~17 mm、最大サイズ 40~50 mm)、発生率も高いことが明らかになった。吸入と経口による複合曝露により、雄のラットで腎近位尿細管における発がん性と慢性毒性影響が著しく増高すると結論づけられ、複合経路で曝露した場合の腎臓への発がん性と毒性作用は、吸入曝露のみによる影響と飲水曝露のみによる影響が相加的に現れるとみなした場合に予想されるものより大きくなることが示唆される。

Table 4.47 Dose-Response Relationships for the Incidences of Renal Tumors Induced by Chloroform Exposures in the Male Rat Study (Nagano et al., 2006).

Drinking-water exposure 1000 ppm (Estimated uptake)	Inhalation exposure	Estimated amount of chloroform uptake (mg/kg/d)	Renal tumor incidence ^a
0	0		0/50
0	25 ppm	20	0/50
0	50 ppm	39	0/50
0	100 ppm	78	1/50 (2%)
45 mg/kg/d	0	45	0/49
<i>53 mg/kg/d</i>	<i>25 ppm</i>	73	<i>4/50 (8%)</i>
<i>54 mg/kg/d</i>	<i>50 ppm</i>	93	<i>4/50 (8%)</i>
<i>57 mg/kg/d</i>	<i>100 ppm</i>	135	<i>18/50 (36%)*</i>

Note. Data in the combined-exposure groups are indicated in italics.

^a Incidence of renal-cell adenoma and carcinoma.

* significantly different from the untreated control group, the oral-alone group, and each inhalation-alone group with matching concentrations, respectively, at $p \leq 0.05$ by Fisher's exact test.

In vitro 試験

データは、得られていない。

4.1.2.8.2 ヒトにおける試験

In vivo 試験

吸入

Heineman *et al.* (1994) の試験では、星状細胞脳腫瘍を引き起こす潜在的危険要因としての観

点から、塩素化脂肪族炭化水素(CAH)の評価が行われた。6種類のCAHそれぞれと汎用の有機溶剤について、職業と曝露の関係を示すマトリックスが、脳腫瘍の白人男性の症例対照調査から得られたデータに適用された。このマトリックスによって、過去何十年間にわたって(1920~1980年)各産業や職業においてCAHが用いられてきた可能性があるかどうかを示され、「曝露が起こる」産業および職業における、曝露の可能性と強さが推定された。脳腫瘍との関連を示す徴候は、クロロホルムやメチルクロロホルムへの曝露では、ほとんど認められなかった。

経皮

データは、得られていない。

経口

25歳以上の住民(男性14553名、女性16227名)を対象としたコホート調査(Wilkins and Comstock, 1981)では、塩素消毒された地表水(クロロホルムの平均濃度107 µg/L)に曝露された住民と、深井戸水を塩素消毒なしで使用している住民の、2つのコホートにおけるがん発生率が評価された。年齢、婚姻状況、学歴、喫煙、礼拝に参列する習慣、住居が適度なものであるか、および一室当たりの人数といった観点から、さまざまな補正を加え、2つのコホートを対比させて、リスク比が算出された。有意な過剰リスクが、乳がんによる死亡についてのみ認められ(相対リスク2.7、95%信頼区間で1.2~4.9)、肝臓における過剰発がんについては、有意性は境界線上であった(相対リスク3.0、95%信頼区間で0.92~15)。補完的に行われた死亡率の調査でも、塩素消毒水と、肝臓や泌尿器におけるがんとの関連が示唆されている。

Morris *et al.*(1992)は、過去に発表され、それぞれの曝露量が算定された試験(症例対照試験やコホート調査)の結果を量的に統合・再解析する試み(メタ分析)を実施した。著者は、塩素消毒された地表水に曝露された人において、膀胱がんと結腸直腸がんの発生率が増加したことを確認した。それらの発生率は、用量依存的傾向を示しているように思われた。この分析では、給水源の違いに伴って曝露量にかなりの差があったことから統計上の混乱が生じたが、分析の対象を曝露量算定の質が最高であると判断される試験に限定した場合、得られた推定危険率は、高めの数値となった。残留塩素や動物に対する他の発がん/変異原物質が関わっていることから、結果に交絡が生じているため、メタ分析の対象となった飲用水の試験の中には、クロロホルムをヒトに対する発がん物質として、明確に特定・関連づけできているものは、一つも無い。

McGeehin *et al.*(1993)は、米国コロラド州の住民を対象として、1990~1991年にかけての

集団症例対照調査を行い、膀胱がんと飲用水の消毒法との関連を検討した。喫煙歴、水道水とコーヒーの摂取量、および病歴といった要因に関し、ロジスティック回帰によって調整を施すと、塩素消毒された地表水への長年にわたる曝露は、膀胱がんのリスクとの間に有意な関連性を有することが示された ($p = 0.0007$)。曝露期間が長いほど、非曝露群に比較して膀胱がんのオッズ比は増加し、塩素消毒された地表水への曝露期間が 30 年を超えた場合、その値は 1.8 (95%信頼区間で 1.1~2.9) に達した。膀胱がんのリスクの増加は、男性と女性、喫煙者と非喫煙者で同様であった。

King and Marrett (1996) は、集団症例対照調査を実施し、膀胱がんのリスクと、カナダの公共上水道中の塩素消毒副産物への曝露との関係を検討した。少なくとも 30 年の曝露情報を有し、1992 年 9 月 1 日~1994 年 5 月 1 日に膀胱がんと診断された症例群 696 名と、同じく少なくとも 30 年の曝露情報を有する対照群 1,545 名を対象として、問診前の 40 年間の曝露量が推定された。潜在的交絡因子に関する調整を施したオッズ比を使用して、相対リスクが推定された。塩素消毒された地表水に 35 年以上曝露された人の膀胱がんのリスクは、曝露期間が 10 年未満の人よりも高かった (オッズ比 1.41、95%信頼区間で 1.10~1.81)。また、推定濃度が 50 $\mu\text{g/L}$ 以上のトリハロメタンに 35 年以上曝露された人における膀胱がんのリスクは、曝露期間が 10 年未満の人の 1.63 倍であった (95%信頼区間で 1.08~2.46)。

Doyle *et al.* (1997) のコホート研究では、飲用水源および塩素消毒副産物への曝露と、がんの発生率との関連が評価された。塩素消毒副産物への曝露量が、米国の州規模の水質データから算出された。米国アイオワ州の女性コホートの 28,237 名から、本人の飲用水源についての報告を得た。市営の地下水源を使用している女性に比較して、市営の地表水を使用している女性は、結腸がん、肺がんおよび皮膚メラノーマのリスクが高かった。最終飲用水中のクロロホルム量に応じて 4 段階に分別して検討したところ、クロロホルムへの曝露と、結腸がんのリスクもしくはすべてのがんを合わせたリスクとの間に、明確な用量-反応関係が認められた。結腸以外の部位のそれぞれのがんについては、水源やクロロホルム濃度との間に一貫した関連性は認められなかった。

In vitro 試験

データは、得られていない。

4.1.2.8.3 発がん性の要約

US EPA (2001)によると、クロロホルムは、雄のラットやマウスで腎腫瘍の発生率を増加させ、雌雄のマウスで肝腫瘍の発生率を増加させる能力を有することが、動物を用いた試験によって明らかにされている。これらの腫瘍誘発反応は、試験された用量に照らしてみると、持続性または反復性の細胞毒性に続発したものであり、再生性過形成から二次的に生じたものであることが想定される。2件の試験では、ラットやマウスにおいて、クロロホルムへの吸入曝露によるものとされる、鼻腔の病変が認められている。「DNA に対する反応を介した変異原性発現機序は、クロロホルムによる発がん過程の重要な構成要素ではないことが、証拠の重み付けによって示唆されている。持続的な細胞増殖が、細胞の自然突然変異とそれに続く発がんの可能性を高める原因になっていることは、十分想定される (US EPA, 2001)。」

飲用水を介してクロロホルムに慢性曝露されたヒトにおける、毒性やがんの発生率についての調査報告データは、クロロホルム単独曝露のものは得られてない。塩素消毒された飲用水には、一般的に、クロロホルムの他、クロロホルム以外のトリハロメタンや、他の多種多様な消毒副産物も含まれている。飲用水を介してクロロホルムに曝露されたヒトは、クロロホルムの直接経口摂取と、水中から屋内空气中に放出されたクロロホルムガスの吸入の、両方の経路によって曝露されている可能性があることに留意すべきである。

塩素消毒された飲用水の長期経口摂取とトリハロメタンへの累積曝露に伴い、膀胱がんのリスクが増加することが、いくつかの調査で認められているが、調査結果は、男性と女性の間、および、喫煙者と非喫煙者の間では、一貫性がない。

加えて、とり挙げた調査には、特定の物質への曝露に関するデータがほとんど含まれておらず、過剰リスクの原因を明確にクロロホルムだけに帰することはできない。判明した具体的なリスクは、他の消毒副産物、消毒副産物の混合物、他の水質汚染物質に起因している可能性があり、また、塩素消毒された飲用水やトリハロメタンがクロロホルムと同様にもたらし得る、その他の要素に起因している可能性もある (WHO, 2004; IARC, 1999)。

IARC (1999)は、クロロホルムの発がん性を示す証拠は、ヒトでは十分に得られていないが、実験動物では十分に得られていると判断している。結論として、ヒトにおいて現在得られているデータは、飲用水中のクロロホルムへの曝露と、がんのリスク増加との因果関係を証明するには不十分である。

マウスにおける腎腺腫・腎に関する吸入 NOAEC は 5 ppm、鼻腔病変に関する LOAEC は 5 ppm と判定された (Yamamoto *et al.*, 2002)。CBA マウスと CF/1 マウスでは、クロロホルム

の経口投与により、中等度～重度の腎病変の発生率が増加した。NOAEL は 17 mg/kg 体重とされた(Roe *et al.*, 1979)。これらの値は、リスク総合判定の際の起点とみなされる。(これらの試験は、リスク総合判定にあたり、重要な試験として考慮される。)

実験動物における結果に基づき、クロロホルムの発がん性については、リスク警句 R40(発がん影響に関し限られた証拠有り)を付与してカテゴリー3 としている現在の分類を維持すべきである。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 受胎能への影響

受胎能に対するクロロホルムの潜在的毒性については、マウスを用いた生殖毒性試験のデータと、疫学的調査(職業曝露調査および症例調査)のデータが得られている。

動物における試験

ペアを組ませた状態で行われた試験のデータが、1 件得られている。Chapin *et al.*(1997)は、アルビノマウス(交配ペア 20 組/群)に、コーン油を媒体として、8、20 もしくは 50 mg/kg/日の用量のクロロホルムを、31 週間、強制経口投与した(US EPA, 2004 の中で引用)。クロロホルムが揮発したため、実際に投与されたクロロホルムの用量は、6.6、15.9 もしくは 41.2 mg/kg/日であった。投与に起因した死亡は認められなかった。摂餌量と摂水量に、投与による影響は認められなかった。41.2 mg/kg/日群で、4 回目の妊娠における出産時と、5 回目の妊娠における出産後 14 日目に、母体重の減少が認められた。生殖機能に関するいずれの評価項目においても、投与に関連した影響は認められなかった。クロロホルム投与群の雌では、肝臓の絶対および相対重量が、対照群と比較して有意($p < 0.01$)に増加しており、この増加は、用量依存的な病理組織学的変化(肝細胞変性と記載)を伴っていた。雄については、41.2 mg/kg/日群で右精巣上体の絶対重量と相対重量が増加(+7%、 $p < 0.05$)していたこと以外、影響は認められなかった。精子の運動性や密度、および異常精子の割合には、投与の影響は認められなかった。「微小」と判定される精巣上体の病変が、対照群で 20 匹中 3 匹、41.2 mg/kg/日群で 20 匹中 6 匹に認められた。クロロホルムを投与された別のマウス 2 匹において、「軽度」に分類される精巣上体の病変が認められた。これらの精巣上体の病変について、著者らは、「精巣上体尾部における導管上皮の空胞変性」と記載している。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。) 受胎能への影響に関する NOAEC は、15.9 mg/kg と推定される。

Table 4.48 Absolute and adjusted epididymal weights of F1 males (mean + SD) after exposure to chloroform by gavage (Chapin et al., 1997 in US EPA, 2004)

Dose (mg/kg-day)	Number per group	Body weight (g)	Right epididymis weight (mg)	Adjusted right epididymis weight (mg)
0	20	33.686 + 0.536	44.685 + 1.087	44.736 + 0.949
41.2	29	33.789 + 0.570	47.725 + 1.078*	47.674 + 0.949*

* Significant difference from controls at $p < 0.05$

Land *et al.* (1979)の試験では、雄の C57B1/C3H マウスが、クロロホルムを 0 ppm(対照群、15 匹)もしくは 800 ppm(9 匹)の濃度で含む空気に、1 日 4 時間で、5 日間曝露された(US EPA, 2004 の中で引用)。精子形態異常の発生率に、有意な増加が認められた(800 ppm 群 2.76%、対照群 1.42%、 $p < 0.05$)。1981 年に、この試験に加える形で、同じ著者が、マウス 4 匹を用い、400 ppm のクロロホルムへの曝露を実施した(Land *et al.*, 1981)。この場合も同様に、異常精子の割合の有意な増加が認められた(400 ppm 群 1.88%、対照群 1.42%、 $p < 0.01$)。

セクション 4.1.2.6.1 で詳述した US EPA(1980)の 90 日間亜慢性毒性試験(雄ラットに 0、200、400、600、900 もしくは 1800 ppm の濃度でクロロホルムを飲水投与)では、曝露から 30 日後の腎臓、精巣、前立腺および精嚢の検査において、900 ppm 群で精巣過形成と間質細胞過形成がそれぞれ 1 例ずつ認められたことを除いて、影響は認められていない。また、マウスでは、600、900、1800 もしくは 2700 ppm の濃度でクロロホルムを飲水投与が行われたが、卵巣や子宮への影響は認められていない。

セクション 4.1.2.6.1 で詳述した Heywood *et al.* (1979)の試験では、ビーグル犬に、練り歯磨き基剤を媒体として、クロロホルムを 15 mg/kg/日または 30 mg/kg/日の用量で、ゼラチンカプセルの形で週 6 日間、7.5 年間にわたって経口投与し、投与終了後 20~24 週間の回復期間が設けられた(US EPA, 2001 の中で引用)。肝臓、脳、腎臓、精巣、前立腺、卵巣、子宮への影響は認められなかった。雄では、異所性精巣が、精子形成の抑制を伴って、対照群で 1 匹、15 mg/kg/日群で 1 匹、30 mg/kg/日群で 2 匹に認められた。雌では、乳腺の結節性過形成が、対照群で 1 匹、媒体対照群で 5 匹、15 mg/kg/日群で 3 匹に認められた。これらの所見については、クロロホルムの投与には関係ないと判断された。

ヒトにおける調査

クロロホルムへの職業曝露と曝露による男性の生殖能への毒性影響に関する症例調査が 1 件報告されている(Chang *et al.*, 2001、US EPA, 2004 の中で引用)。1996 年 8 月~1997 年 4 月にかけて、試験施設従業員(34 歳、男性)が、換気装置の運転停止のため、就業中に溶剤

に 8 ヶ月間曝露された。この男性は、この曝露が起こる前の 1996 年 5 月に、授精能検査一式を、地域の病院で受けていた。精液の外見、精液量、および精子数は正常であり、正常形態の精子の割合は 92%であった。運動速度が正常な精子の割合は、射精から 30 分後に 95%、60 分後に 30%であった。その曝露が生じた後、精子無力症と診断された (Table 4.49 を参照)。そのため、調査が行われ、この男性が曝露された可能性のある有害化学物質についての曝露濃度が算出された。それによると、男性は 8 ヶ月間、許容曝露限度値の 50 ppm (US EPA, 2004) の約 10 倍、曝露限界値の 10 ppm (ACGIH, 2001) の 50 倍の濃度のクロロホルムに曝露されていた。男性は、クロロホルム以外の化学物質 (イソオクタン、テトラヒドロフランなど) にも曝露されていたが、イソオクタンへの曝露による男性の生殖能への影響に関する試験は確認されておらず、男性の授精能に及ぼすテトラヒドロフランの有害な影響も、試験報告が得られていない。

Table 4.49 Semen analysis after 8 months (August 1996 to April 1997) exposure (Chang et al., 2001 in US EPA, 2004)

Parameters	July 1997	August 1997	October 1997
Volume (ml)	4	5.5	3
Count (million/ml)	68.6	73.8	90.6
Motility 30 min after ejaculation:			
rapid	17%	10%	32%
medium	6%	1%	6%
slow	3%	0%	2%
static	74%	89%	30%
Path velocity (m/sec)	35	40	50

Dahl *et al.* (1999) の調査では、歯科の仕事場での曝露 (クロロホルムを基剤とした歯根管シーリング材を用いた歯根充填治療の、週あたりの実施回数) と、女性歯科医の受胎能への影響との間に関連は認められなかった。

Reprotext 2004 には、子癇を発症した 2 名の女性についての、Tylleskar-Jensen (1967) による症例報告がとり挙げられている (US EPA, 2004 の中で引用)。これらの 2 名の女性は、試験施設に勤務し、就業中に 100~1000 ppm の濃度のクロロホルム (勧告されている曝露限度値は 50 ppm) に曝露されていた。対照とされる集団における子癇の背景発生率が、妊娠 4000 例につき 1 例であったことと比較検討されている。

4.1.2.9.2 発生・発達毒性

クロロホルムの発生・発達毒性に関しては、動物においては発生・発達毒性試験のデータが、ラットでは吸入経路と経口経路の両方について、マウスでは吸入経路について、ウサギでは経口経路について得られており、さらに、ヒトにおいては疫学的調査(職業曝露調査、症例対照試験、後向きコホート調査、前向きコホート調査)のデータが得られている。これら得られたすべての試験や調査のデータについて、以下に要約する。

動物における試験

吸入経路

一定期間交配させた Sprague-Dawley ラットが、クロロホルムに、30、100 もしくは 300 ppm の濃度で 1 日 7 時間、妊娠 6～15 日目に毎日、吸入曝露された。また、著しい食欲低下が認められたため、食餌制限対照群(妊娠 6～15 日目の摂餌量を 3.7 g/日に制限)が、試験に追加された(Schwetz *et al.*, 1974, US EPA., 2004 の中で引用)。試験中に死亡した雌親はいなかったが、統計的に有意な妊娠率の低下、母体重の増加抑制および摂餌量の減少が認められた(Table 4.50 を参照)。

Table 4.50 Main maternal parameters following exposure to chloroform by inhalation (Schwetz *et al.*, 1974 in US EPA, 2004)

Parameters	control	control starved	30 ppm	100 ppm	300 ppm
% pregnant	88	100	71	82	15*
body weight (g) ± SD					
GD 6	275 ± 21	274 ± 13	266 ± 14	274 ± 17	284 ± 9
GD 13	310 ± 17	223 ± 13*	280 ± 14*	274 ± 18*	192 ± 9*
GD 21	389 ± 28	326 ± 24*	381 ± 23*	365 ± 22*	241 ± 29*
feed (g/day)					
GD 6-7	19 ± 3	starved	5 ± 3*	13 ± 4*	1 ± 1*
GD 12-13	22 ± 2	starved	20 ± 1	15 ± 2*	1 ± 1*
GD 18-19	26 ± 3	24 ± 8*	29 ± 5	33 ± 3*	not done

* statistically different from controls at p<0.05

血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(SGPT)を測定して、肝機能の変化を調べ、ラットにおける肝毒性の程度が評価された。対照群と 300 ppm のクロロホルムに曝露された群の間に、統計的に有意な差は認められなかった。また、妊娠しているラットと妊娠していないラットの肝臓が、曝露終了から 6 日後に調べられ、外観は正常であるとみなされた。妊娠していないラットでは、肝臓の相対重量への影響が、300 ppm 群においてのみ

EURAR CHLOROFORM

認められ、対照群に比較して有意な増加が示された ($p < 0.05$)。妊娠しているラットでは、100 ppm 曝露群、300 ppm 曝露群および食餌制限対照群において、肝臓の相対重量が、対照群に比較して増加していた ($p < 0.05$)。

300 ppm 群では、雌親 20 匹中 3 匹でのみ妊娠が認められ、これらの 3 匹のうち 1 匹では全胚吸収が認められ、残り 2 匹では産仔数の減少と胚吸収発生率の増加が認められた (Table 4.51 を参照)。

Table 4.51 Main fetal parameters following exposure to chloroform by inhalation (Schwetz *et al.*, 1974 in US EPA, 2004)

Parameters	control	control starved	30 ppm	100 ppm	300 ppm
Number of mated females	77	8	31	28	20
Number of litters	68	8	22	23	3
Mean number of live foetus/litter	10 ± 4	10 ± 4	12 ± 2	11 ± 2	4 ± 7*
Mean Implantation sites/litter	11 ± 3	11 ± 4	13 ± 2	12 ± 2	11 ± 4
resorptions/implantation	8%	7%	8%	6%	61%*
litters with total resorption	0	0	0	0	1
litters with resorptions	57%	25%	68%	52%	100%
sex ratio M:F	53:47	45:55	53:47	55:45	34:66*
mean fetal weight/litter (g)	5.69 ± 0.36	5.19 ± 0.29*	5.51 ± 0.2	5.59 ± 0.24	3.42 ± 0.02*
CRL (mm)	43.5 ± 1.1	42.1 ± 1.1*	42.5 ± 0.6*	43.6 ± 0.7	36.9 ± 0.2*
<u>Gross anomalies</u>		Percent of litters affected (No. of litter)			
acaudia (short tail)	0	0	0	13(3)*	0
imperforate anus	0	0	0	13(3)*	0
<u>Skeletal anomalies</u>					
total skeletal anomalies (% affected litters)	68%	38%	90%*	74%	100%
delayed ossification, skull	21(14)	0	73(16)	30(7)	50(1)
missing ribs	0	0	0	13(3)*	0
wavy ribs	0	0	18(4)*	0	0
split sternebrae	1.5(1)	0	9(2)	9(2)	50(1)
delayed ossification, sternebrae	22(15)	38(3)	0	74(17)*	100(2)
<u>Soft tissue anomalies</u>					
total soft tissue anomalies (% affected litters)	48%	38%	45%	65%	100%
subcutaneous odema	34(23)	38(3)	41(9)	61(14)*	100(1)

* statistically different from controls at p<0.05

CRL: crown-rump length

100 ppm 群では、妊娠 23 例中 3 例で肉眼的奇形が見られ、23 例中 3 例に無尾胎仔または短尾胎仔、また、23 例中 3 例に鎖肛胎仔が認められた。対照群の奇形率が 1/68 であったため、これらの奇形の増加は、対照群に比較して有意であった。ただし、同腹仔中、何匹

の胎仔に影響が認められたのか、また、異常が同じ胎仔に認められたのかどうかについて、記載がなされていない。30 ppm 群では、骨格奇形が増加しており、頭蓋骨の骨化遅延(16/22 妊娠例)、波状肋骨(4/22 妊娠例)、二分胸骨分節(2/22 妊娠例)が認められた。影響が認められた胎仔の数は、明記されていない。母体重減少に基づいて、(訳注:母体毒性に関する)LOAEC が 30 ppm、骨格異常の増加に基づいて、発生への影響に関する LOAEC が 30 ppm と判定された。

Murray *et al.*(1979)の試験では、CF-1 マウス(34~40 匹/群)を、0 または 100 ppm の濃度のクロロホルムに、1 日 7 時間、妊娠期間の 1~7 日目、6~15 日目、または 8~15 日目に吸入曝露した(US EPA, 2004 の中で引用)。妊娠期間の 18 日目に、100 ppm に曝露された雌親 1 匹が、極度の飢餓性衰弱の結果死亡したが、それを除くと、試験中に臨床徴候はとくに認められなかった。妊娠期間の 1~7 日目に曝露された群と 8~15 日目に曝露された群では、摂餌量および摂水量の減少と体重増加抑制が認められた。妊娠期間の 6~16(訳注:6~15 が正しいと思われる)日目に曝露された群と 8~15 日目に曝露された群では、対照群に比較して、母動物の肝臓の相対重量が増加しており、SGPT 活性の増加も関連して認められたことから、何らかの肝毒性が生じたことが示唆された。

胎仔のデータを Table 4.52 に示す。

Table 4.52 Fetal data from mice exposed to chloroform by inhalation (Murray *et al.*, 1979 in US EPA, 2004)

Parameters	GD 1-7	GD 1-7	GD 6-15	GD 6-15	GD 8-15	GD 8-15
	0 ppm	100 ppm	0 ppm	100 ppm	0 ppm	100 ppm
% pregnant	74	44	91	43	65	60
No. Litters	22	11	29	12	24	18
Live Fetuses/litter	10 ± 3	13 ± 2	12 ± 3	10 ± 4	12 ± 3	11 ± 3
Resorptions/litter	2 ± 2	4 ± 5*	2 ± 2	1 ± 1	2 ± 2	2 ± 2
Fetal weight (g)	1.02 ± 0.1	0.92 ± 0.07*	0.99 ± 0.11	0.95 ± 0.13	1 ± 0.12	0.85 ± 0.17*
CRL (mm)	24.7 ± 1	23.6 ± 1.2*	23.7 ± 1.3	23.2 ± 1.1	24.1 ± 1.1	22.9 ± 2.2*
Cleft palate /litter affected	3/1	-	-	-	1/1	10/4* ^a

* statistically different from controls, p<0.05

^a six fetuses in one litter exhibited cleft palate

妊娠に至った雌の数が、妊娠期間の 1~7 日目に曝露された群と 6~15 日目に曝露された群では、有意に減少していた。

胎仔における外表奇形の発生頻度に、曝露による影響は認められなかった。

妊娠期間の 8~15 日目に 100 ppm に曝露された被験動物では、4 妊娠例の同腹仔で、口蓋裂が高頻度に認められた。その他の大奇形は、認められなかった。妊娠期間の 1~7 日目に曝露された群と 8~15 日目に曝露された群において、睾丸欠損ののみが単独で認められた例が報告されている。胎仔の骨格検査で、いくつかの軽微な骨格変異について、発生頻度の増加が認められた。すなわち、すべての曝露群で、頭蓋骨の骨化遅延が有意に増加し、妊娠期間の 1~7 日目に曝露された群と 8~15 日目に曝露された群で、胸骨分節の骨化遅延が認められた。母体毒性(母体重および摂餌量の減少)が認められた量が示されていないため、母体毒性と胎仔所見との関連性を確証づけることは難しい。

Baeder and Hoffman(1988)の試験では、一定期間交配させた Wistar ラット(20~23 匹/群)を、0、30、100 もしくは 300 ppm の濃度のクロロホルムに、1 日 7 時間、妊娠 7~16 日目の間、毎日曝露した。曝露によって、雌親に行動変化や臨床徴候は引き起こされず、試験終了まで、すべての雌親が生残した。濃度依存性の摂餌量減少と体重増加抑制が認められた。腎臓、肝臓および脾臓への影響は、何も認められなかった。

全胚吸収が、30 ppm 群で 2 匹に、100 ppm 群で 3 匹に、300 ppm 曝露群で 8 匹に認められた(Table 4.53 を参照)。300 ppm 群では、胎仔体重が、対照群に比較して有意に減少した(-6%、 $p<0.05$)。すべての曝露群で、頭殿長(CRL)が、対照群に比較して、わずかであったが有意に減少した(約-6%、 $p<0.05$)。

胎仔の外表、軟部組織、および骨格の観察所見には、曝露に関連すると思われる異常は認められなかった。妊娠 17 日目の母体重減少に基づいて、(訳注:母体毒性に関する)LOEC (訳注:LOAEC が正しいと思われる)は 30 ppm、全胚吸収が見られた妊娠例の増加に基づいて、(訳注:発生への影響に関する)LOAEC は 30 ppm と判定された。

Table 4.53 Main fetal parameters following inhalation exposure to chloroform (Baeder and Hoffman, 1988 in US EPA, 2004)

Parameters	0	30 ppm	100 ppm	300 ppm
N lost litters	0	2	3	8
N live litters	20	18	17	12#
Resorptions/live litters	0.75	0.22	0.53	0.92
Live fetuses/litter	12.4	12.8	12.8	13.4
Fetal weight (g)	3.19 ± 0.3	3.16 ± 0.19	3.13 ± 0.21	3 ± 0.19*
Fetal CRL (cm)	3.52 ± 0.17	3.38 ± 0.12*	3.39 ± 0.1*	3.39 ± 0.12*

* statistically different from controls at $p<0.05$

statistically different, $p<0.005$

この最初の試験に加えて、Baeder and Hoffman(1991)の試験では、一定期間交配させた

Wistar ラット(20 匹/群)を、0、3、10 もしくは 30 ppm の濃度のクロロホルムに、1 日 7 時間、妊娠 7~16 日目の間、毎日吸入曝露した。最初の試験の場合と同様に、摂餌量減少(すべての曝露群)や体重増加抑制(10 ppm 曝露群と 30 ppm 曝露群のみ)が、濃度依存性に認められた。剖検で、中等度~重度の片側性または両側性腎盂拡大が、3 ppm 群で雌親 1 匹、10 ppm 群で雌親 3 匹、30 ppm 群で雌親 4 匹に認められた。また、30 ppm 群では、腎重量が、対照群に比較して増加していた($p<0.05$)。心臓、肝臓および脾臓への影響は、何も認められなかった。

Table 4.54 Maternal feed consumption and body weight after inhalation exposure to chloroform (Baeder and Hoffman, 1991 in US EPA, 2004).

Parameters	0	3 ppm	10 ppm	30 ppm
N	20	20	20	19
feed, gd 7-14*	8.03 + 0.68	7.19 + 0.66#	6.45 + 0.70#	5.60 + 0.75#
feed, gd 14-17*	7.07 + 0.32	7.16 + 0.59	7.12 + 0.67	6.52 + 0.67#
feed, gd 17-21*	6.63 + 0.40	6.49 + 0.61	6.91 + 0.33	7.25 + 0.52#
bw (g), gd 0**	193.3 + 12.2	197.5 + 7.7	192.2 + 6.4	200.0 + 7.4
bw (g), gd 7**	226.0 + 14.7	220.9 + 11.0	222.9 + 8.2	230.6 + 10.6
bw (g), gd 14**	255.8 + 16.2	253.6 + 13.7	237.1 + 10.4	237.3 + 12.3
bw (g), gd 17**	269.1 + 17.0	260.2 + 13.7	255.2 + 12.4	253.4 + 16.3
bw (g), gd 21**	321.9 + 22.5	319.1 + 21.1	308.0 + 17.5	308.7 + 18.5
weight gain, gd 0-7	32.7 + 9.5	31.4 + 9.1	30.7 + 3.5	30.6 + 7.3
weight gain, gd 7-14***	29.8 + 10.5	24.7 + 6.3	14.3 + 8.2	6.7 + 8.8
weight gain, gd 14-17***	13.3 + 4.6	14.6 + 5.7	16.1 + 5.0	16.1 + 6.7
weight gain, gd 17-21***	52.9 + 6.5	50.9 + 11.5	52.9 + 11.7	55.3 + 7.8
weight gain, gd 0-21***	120.6 + 17.8	121.6 + 21.0	115.9 + 16.2	108.7 + 16.7

a mean + SD

* g feed consumed per 100 g body weight

statistically different, $p<0.005$

30 ppm 群の雌親 1 匹を除いて、いずれの雌親も、生存胎仔を出産目前まで維持した。黄体数、着床数、胚吸収発生頻度、および一腹当たりの生存胎仔数には、曝露の影響は認められなかった。Baeder and Hoffman(1991)の記述によると、平均胎仔体重と平均胎仔長は、群間で有意な差は認められなかったとされている。しかし、報告書中の表形式データによると、30 ppm 曝露群の胎仔体重と胎仔頭殿長(CRL)はどちらも、対照群に比較して有意に低値である(Table 4.55 を参照)。ただし、胎仔体重については、すべての曝露群で体重の平均と標準偏差(SD)が同一であり、ここで、30 ppm 群の妊娠例数は 20 ではなく 19 である。

いずれにしても、体重が 3.0 g に満たない胎仔の割合が、10 ppm 群(24%)と 30 ppm(26.9%)では、対照群(3.2%)や 3 ppm 群(14.2%)におけるより高かったことが記載されている。対照群に比較して有意な減少が認められたのは、30 ppm 群の平均胎仔体重と平均頭殿長のみであった(US EPA, 2004)。

Table 4.55 Mean fetal parameters (Baeder and Hoffman, 1991 in US EPA, 2004).

Parameters	0	3 ppm	10 ppm	30 ppm
N lost litters	0	0	0	1
N live litters	20	20	20	19
Resorptions/live litters	0.55	0.4	0.75	0.84
Live fetuses/litter	12.4	12.4	12.9	12.5
Fetal weight (g)	3.4 ± 0.3	3.2 ± 0.3	3.2 ± 0.3	3.2 ± 0.3*
Fetal CRL (cm)	3.58 ± 0.2	3.55 ± 0.21	3.44 ± 0.26	3.4 ± 0.19*
poorly ossified cranial bones [§]	42/14	47/17	48/16	60*/17
ossification of less than 2 caudal vertebrae [§]	4/3	14*/5	16*/6	14*/8
non or weakly ossified sternebrae [§]	7/3	32*/13	35*/14	18*/11
wavy or thickened ribs [§]	10/6	11/5	22*/10	15/4

* statistically different, $p < 0.05$

§ number affected fetuses/number litters with affected fetuses

3 ppm 群の生存胎仔 1 匹に、内水頭症が認められた。これ以外に、肉眼的奇形は、いずれの群でも認められていない。

30 ppm 群では、頭蓋骨の骨化不良が認められる胎仔の割合が、対照群に比較して有意に高かった($p < 0.05$) (Table 4.55 を参照)。頭蓋骨の骨化不良が認められる胎仔を有していた妊娠例の割合には、群間で有意な差はなかった。1 群あたりの影響を受けた胎仔の総数で見ると、クロロホルムへの曝露を受けた 3 群では、いずれにおいても、尾椎および胸骨分節の骨化不良の頻度が、対照群の胎仔に比較して有意に高かった($p < 0.05$)。妊娠例数を基準とし、影響を受けた胎仔が少なくとも 1 匹認められた妊娠例数で見ると、胸骨分節の骨化への影響についてのみ、有意性が認められた($p < 0.05$)。波状肋骨や肥厚した肋骨が認められた胎仔の割合が、10 ppm 群では対照群に比較して高かった($p < 0.05$)。この差は、妊娠例数を基準にすると、有意ではなかった。他にも骨格・骨化変異が、すべての群で散発的に認められた(US EPA, 2004)。

US EPA (2001)は、この試験から、発生への影響に関する NOAEC を、10 ppm(50 mg/m³)と判定している。明らかな母体重抑制と母体重増加抑制に基づいて、LOEC (訳注:正しくは母体毒性に関する LOAEC と思われる)は、10 ppm とされた。胎仔体重と頭殿長(CRL)の減少に基づいて、NOAEC は 10 ppm とされた。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。)

経口経路

雌雄のアルビノ ICR マウスに、同居交配させる前の 3 週間、クロロホルムが、31.1 mg/kg/日の用量で、強制経口投与された。媒体として、「Emulphor」と 0.9%生理食塩水を、1 対 8 で混合した溶液が使用された。雄については交配期間中に投与が行われ、雌については交配、妊娠および授乳の期間中にわたって続けて投与が行われた。試験では、クロロホルム投与を受けた群の 5 腹と媒体対照群の 5 腹が検討に用いられた。5 腹のそれぞれから、仔動物 8 匹を、出生日に無作為に選抜した。出生後 7 日目以降の試験の残りの期間、すべての仔動物に、31.1 mg/kg/日の用量のクロロホルムまたは媒体が、強制経口投与された (Burkhalter and Balster, 1979, US EPA, 2004 の中で引用)。

毎日、各腹につき 3 匹の仔動物に対して、立ち直り反射、前肢置き直し反応、前足把持力、哺乳反射、断崖落下回避、聴覚性驚愕反応、棒つかみ能力、および開眼に関する検査が行われた。出生後 17 日目に、両群から、それぞれ 15 匹ずつを無作為に選抜して、運動能力の検査が行われた。出生後 22 日目と 23 日目に、両群からそれぞれ 15 匹ずつを無作為に選抜して、受動的回避学習の検査が行われた。

両群の間で、1 腹あたりの平均出生仔数に差は認められず、仔動物の平均体重(出生後 7~21 日目に毎日測定)にも差は認められなかった。出生後 7~21 日目の体重増加が、クロロホルム投与群で、有意に抑制された ($p < 0.01$)。立ち直り反射、前肢置き直し反応、前足把持力、断崖落下回避、聴覚性驚愕反応、棒つかみ能力、開眼は、いずれについても、尺度としたスコアが、検査日ごとに漸進的に上昇して行った。哺乳反射は、出生後およそ 8~10 日目まで増強が認められた後、14 日目までに消失した。クロロホルム投与群と媒体対照群と間で、有意差が認められる日も散発的にあったが、全体的な傾向としては、クロロホルムが、マウスの仔動物の神経行動発達を遅延させることはなかった。例外的に、前肢置き直し反応については、クロロホルム投与群で出生後 5~8 日目の各日のスコアが低く、5 日目と 7 日目では有意差が認められた ($p < 0.05$)。

運動能力に関する網裏面よじ登りテストでは、両群間に有意な差は認められなかった。受動的回避試験では、いずれのマウスも、2 回目と 3 回目の試行で潜時が延長し、課題を学習したことが示された ($p < 0.05$)。3 回の試行において、潜時についても、ショックによる

影響についても、クロロホルム投与群と媒体対照群間で差は認められなかった(US EPA, 2004)。

米国国家毒性プログラム(NTP)の連続繁殖プロトコルに従い、雌雄の CD1 マウス(交配ペア 20 組/被験物質投与群、交配ペア 40 組/対照群)に、最初の交配前の 7 日間と、引き続き 98 日間の同居期間中、クロロホルムが強制経口投与された(Chapin *et al.*, 1997; NTP, 1988、US EPA, 2004 の中で引用)。クロロホルムの揮発を勘案すると、実際に投与された用量は、約 6.6、15.9、41.2 mg/kg であった。生殖機能に関する、検討されたいずれの評価項目についても、被験物質投与による変化は認められなかった。ペア 1 組あたり出産回数、一腹仔数、生存仔動物の割合、性比、生存仔動物の出生時体重について、有意な群間差は認められなかった。妊娠と妊娠との間隔は、本質的にすべての群で同等であるとみなされた。死産の割合や出生後生存率に、群間差は認められなかった。生存仔の体重は、いずれの測定時点でも、群間で異ならなかった。生殖毒性に関する NOAEL は、41.2 mg/kg より大きいと判定された。

経口経路による試験が 2 件、報告されている。1 件目の試験では、Sprague-Dawley ラット(25 匹/群)に、0、20、50 もしくは 126 mg/kg/日のクロロホルムが、1 日 2 回に分けて、妊娠 6~15 日目に毎日、強制経口投与された。対照群には、等容量の媒体が毎日投与された(Thompson *et al.*, 1974)。投与にも係らず、すべての雌親が生残した。50 および 126 mg/kg/日群で、雌親の体重増加抑制が認められ、すべての群で、摂餌量の減少が認められた。この試験中、自然死した個体はおらず、肝臓にも腎臓にも影響は認められなかった。126 mg/kg/日群では、胎仔パラメータのうち着床数のみ、対照群に比較して有意に増加しており、胎仔体重は有意に減少していた($p < 0.05$)。雄と雌で、影響は同様であった。被験物質投与による性比の変化は認められなかった(Table 4.56 を参照)。

Table 4.56 Litter data

Dose (mg/kg-day)	Implants	Corpora lutea	Resorptions	Live fetuses	Fetal weight (g)	M:F
0	11.5 ± 2.4	13.1 ± 1.4	1 ± 2.9	10.6 ± 3.9	4 ± 0.3	52:48
126	13.5 ± 1.1*	14.2 ± 1.2	1.2 ± 2.6	12.3 ± 3.1	3.7 ± 0.4*	56:44

* statistically different from controls, $p < 0.05$

胎仔の内臓および外表小奇形(腎盂拡張、尿管拡張、胸骨分節の未骨化・配列不良、脊椎椎体・頭蓋骨の不完全骨化など)は、散発性に発生が認められたが、奇形を示していた胎仔数で見てもあるいは奇形を示す胎仔を有していた妊娠例数で見ても、有意に増加しているものは認められなかった。

2 件目の試験では、Sprague-Dawley ラット(15 匹/群)に、コーン油を媒体として、クロロホ

ホルムが、0、100、200 もしくは 400 mg/kg/日の用量で、妊娠 6～15 日目に、経口挿管により投与された (Ruddick *et al.*, 1983)。クロロホルムが投与されたすべての群で、雌親の体重が減少し、雌親の肝臓重量が増加したが、腎臓重量は、最高用量群でのみ増加した ($p < 0.05$)。しかし、雌親の肝臓と腎臓には、病理組織学的異常は認められなかった。雌親の臨床的パラメータと生化学的パラメータに、投与による影響が認められ、クロロホルムが投与されたすべての群でヘモグロビン、ヘマトクリット、血清ソルビトール脱水素酵素が減少し、400 mg/kg/日群では赤血球数が減少し、200 および 400 mg/kg/日群では血清無機リンとコレステロールが増加していた。

胚吸収発生頻度と一腹当たりの生存胎仔数には、曝露による影響は認められなかったが、平均胎仔体重が減少し (-19%、 $p < 0.05$)、矮小胎仔の増加も付随して認められた。最高用量でクロロホルムが投与されていた群の胎仔で、胸骨分節異常の発生頻度の増加が認められた (Table 4.57 を参照)。

Table 4.57 Data from rat fetuses exposed orally to chloroform

Parameters	0	100 mg/kg-day	200 mg/kg-day	400 mg/kg-day
Number of litters	14	12	10	8
Litter size	11.2 ± 0.2	20	20	19
Fetal weight (g)	5.4 ± 0.8	5.3 ± 0.1	5 ± 0.1	4.4 ± 0.3*
Sternebral aberrations ¹	0/0	1/1	5/3	14/8
Runts ²	1/1	2/1	0/0	11/3
Runts ³	0/0	1/1	0/0	26/8

* statistically different from controls, $p < 0.05$

¹ fetuses/litters

² among fetuses prepared for skeletal examination, fetuses/litters

³ among fetuses prepared for visceral examination, fetuses/litters

Thompson *et al.* (1974) の試験では、ウサギ (15 匹/群) に、コーン油を媒体として、クロロホルムが、0、20、35 もしくは 50 mg/kg/日の用量で、妊娠 6～18 日目に、毎日強制経口投与された。試験中に雌親 7 匹が死亡し、50 mg/kg/日群での死亡は、肝毒性によるものであった。50 mg/kg/日群の雌親では、体重増加抑制が認められた。全流産が、すべての群で認められた (対照群 3 匹、20 mg/kg/日群 2 匹、35 mg/kg/日群 1 匹、50 mg/kg/日群 4 匹)。20 および 50 mg/kg/日群では、平均胎仔体重が、対照群に比較して有意に低かった。胎仔には、外表奇形も内臓奇形も認められなかったが、頭蓋骨不完全骨化がすべての群で認められ、20 mg/kg/日群と 50 mg/kg/日群では、その発生頻度が有意に高かった ($p < 0.05$)。LOAEL は 20 mg/kg/日とされた。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。)

ヒトにおける調査

クロロホルムへの職業曝露と妊娠・出産結果との関連が検討された調査の報告が、1件だけ得られている(Wennborg *et al.*, 2000)。検査業務部門や非検査業務部門での1年間にわたる曝露に関して調査された。調査対象は、1945年以降に生まれたスウェーデン人女性コホート(697名、総出産例数1417)であった。検査業務と、自然流産届出数、在胎期間に比して小さい児の例数、または出生時体重のばらつきのいずれの間についても、関連性は報告されていない。ただし、この試験については、曝露量の測定値が示されていない、クロロホルム以外の溶剤にも曝露された可能性がある、妊娠から問診実施までの期間が長いなど、いくつかの欠点がある。

クロロホルムが飲用水消毒副産物として生成することから、多くの調査において、飲用水中のトリハロメタン(クロロホルムを含む)と妊娠・出産結果との間の関係が検討されている。

1987～1990年に米国アイオワ州で住民を対象として行われた症例対照調査(Kramer *et al.*, 1992)では、飲水を介したクロロホルムへの曝露と、出生時低体重児(症例159名、対照795名)、早産児(症例342名、対照1710名)および子宮内胎児発育遅延(症例187名、対照935名)との間の関連が調べられている。その結果、10 µg/L以上の濃度のクロロホルムへの曝露と、子宮内胎児発育遅延のリスク増加との間に関連が認められた(オッズ比1.8、95%信頼区間で1.1～2.9)。

King *et al.*(2000)は、カナダのノバスコシア州のコホートについて1988～1995年における後向き()調査を行い、特定の消毒剤の副産物(クロロホルムなど)への曝露と、死産のリスクとの間の関連を検討した(周産期に関するデータベース、n = 49842)。100 µg/L以上の濃度のクロロホルムに曝露した場合、死産の相対リスクは約1.56倍に達した。リスクの推定値は、呼吸停止による死亡が見られたために高くなり、クロロホルムへの曝露濃度に呼応して上昇した。ただし、この試験には、クロロホルムへの曝露量に関する個人別データが欠けているという欠点がある。

Dodds and King(2000)は、カナダのノバスコシア州のコホートについて1988～1995年における後向き調査を行い、クロロホルムへの曝露と先天性欠損との関連を検討した(周産期に関するデータベース、n = 49842)。クロロホルムへの曝露濃度が75～99 µg/Lの群と100 µg/L以上の群で、染色体異常のリスクの増加が認められた(相対リスクはそれぞれ1.9倍と1.4倍)。また、クロロホルムへの曝露濃度が100 µg/L以上の群では、口唇・口蓋裂のリスクの増加も認められた(相対リスク1.5倍)。

Dodds *et al.* (2004) の症例対照調査では、公共上水道中のトリハロメタン(クロロホルムを含む)への曝露と死産との間の関連が調べられている。この調査では、カナダのノバスコシア州と東部オンタリオ州における 1999～2001 年の症例 112 名、対照 398 名が検討された。その結果、死産のオッズ比(OR)の増加が、1～49 µg/L の濃度(OR 1.8、95%信頼区間で 1.1～3.0)と 80 µg/L 以上の濃度(OR 2.2、95%信頼区間で 1.0～4.8)において認められた。その増加が単調増加であることを示す証拠は認められなかった。

Wright *et al.* (2004) の後向きコホート調査では、母体が妊娠第三期にクロロホルムに曝露された場合の、出生体重、在胎期間、在胎期間に比して小さい児の出現、早期産への影響が検討されている。この調査は、米国マサチューセッツ州における 1995～1998 年の出生証明のデータ(n = 196000)に基づいている。クロロホルム濃度が 20 µg/L より高かった例で、平均出生時体重の減少が認められた。また、クロロホルムへの曝露は、平均在胎期間の延長や早期産のリスクの減少とも関連していた。

4.1.2.9.3 生殖毒性の要約

生殖能に関し、異常精子増加を報告したのは Land *et al.* (1979-1981) のみであった。それによると、空气中濃度が 400 ppm または 800 ppm のクロロホルムに曝露されたマウスで、異常精子の増加が認められた(吸入 LOAEC の推定値は 400 ppm)。他には、Chapin *et al.* (1997) の動物試験で、精巣上体の病変や右精巣上体の重量増加が報告されている(経口 NOAEC の推定値は 15.9 mg/kg)。(リスク総合判定に際し、重要な試験として考慮。)

クロロホルムへの曝露に関連して精子無力症が認められた職業曝露の事例調査も、1 件報告されている。この調査では、その症例が 90 日間追跡されたが、生殖への他の有害影響は証明されていない。

発生毒性に関しては、飲用水中のクロロホルムについて疫学的調査が実施されているが、クロロホルムへの曝露と、胎児の体重減少、死産および口唇・口蓋裂との間に、明瞭な関連性は認められなかった。ただし、これらの疫学的調査の多くは、曝露量の測定基準としてクロロホルムの水中濃度を使用せざるを得ないなどの制約があり、このことで、曝露の誤認が生じている可能性があることに留意する必要がある。

クロロホルムを吸入させた場合、様々な動物で、妊娠率、胚吸収率、一腹仔数、生存胎仔数などに影響が認められた。これらの影響は、雌親の体重や摂餌量の減少が認められた濃度で観察されている。他の影響として、胎仔の体重減少と頭殿長(CRL)減少、ならびに骨格の異常・変異や肉眼的な異常・変異が報告されている。それらについて、下表に要約する。

Table 4.58 Developmental toxicity data on different species

Reference	Protocol	Doses	Maternal effects	Developmental effects
Schwetz <i>et al.</i> , 1974	Sprague-Dawley rats <i>Inhalation</i> 0, 30, 100, 300 ppm 7 hr/day, gd 6-15	30 ppm	Reduced food consumption on gd 6-7 LOAEC =30 ppm based on reduced maternal body weight	Increased skeletal anomalies LOAEC =30 ppm based on increased skeletal anomalies
		100 ppm	Decreased body weight Reduced food consumption, increased relative liver weight	Increased gross anomalies
		300 ppm	Reduced food consumption, increased relative liver weight	Reduced pregnancy rate, decreased litter size, increased resorptions, altered sex ratio and decreased fetal weight and CRL
Baeder & Hoffman, 1988	Wistar rats <i>Inhalation</i> 0, 30, 100, 300 ppm 7 hr/day, gd 7-16	All concentrations	Reduced food consumption, reduced body weight LOEC = 30 ppm	Increased in completely resorbed litters, decreased CRL LOAEC = 30 ppm Decreased fetal weight (300 ppm only)
Baeder & Hoffman, 1991	Wistar rats <i>Inhalation</i> 0, 3, 10, 30 ppm 7 hr/day, gd 7-16	3 ppm	Reduced food consumption	Increased ossification variations
		10 ppm	Reduced body weight LOEC = 10 ppm	NOAEC = 10 ppm based on decreased fetal weight & CRL
		30 ppm		Decreased fetal weight and CRL
Thompson <i>et al.</i> , 1974	Sprague-Dawley rats Gavage 0, 20, 50, 126 mg/kg-day gd 6-15	50 mg/kg-day	Decreased food consumption, decreased weight gain	
		126 mg/kg-day		Increased implantations, decreased fetal weight
Ruddick <i>et al.</i> , 1983	Sprague-Dawley rats Intubation 0, 100, 200, 400 mg/kg-day gd 6-15	All doses	Decreased body weight, increased liver weight, decreased hematocrit, hemoglobin and red blood cells count	
		400 mg/kg/d	Increased kidney weight	Decreased fetal weight, increased of sternebrae aberrations and runting
Murray <i>et al.</i> , 1979	CF-1 mice <i>Inhalation</i> 0, 100 ppm 7 hr/day, gd 6-15, 1-7 or 8-15		Decreased weight gain, gd 1-7 or 8-15	Decreased pregnancy rate, gd 1-7 or 6-15
			Increased relative liver weight, gd 6-15 or 8-15	Increased resorptions, gd 1-7
				Decreased fetal weight and CRL, gd 1-7 or 8-15
				Increased cleft palate, gd 8-15
				Increased delayed ossification of sternebrae, gd 1-7 or 8-15

EURAR CHLOROFORM

Reference	Protocol	Doses	Maternal effects	Developmental effects
Thompson <i>et al.</i>, 1974	Rabbits	All doses		Complete abortions
	Gavage 0, 20, 35, 50 mg/kg/d gd 6-18	20 mg/kg-day 50 mg/kg-day	Death, decreased body weight gains	Decreased fetal weight LOAEL = 20 mg/kg/day
Burkhalter & Balster, 1979	ICR mice 0, 31.1 mg/kg-day		Not discussed	Reduced postnatal weight gain Lower scores for forelimb placement on postnatal days 5 and 7
	3 weeks prior to mating, through mating, gestation and lactation, directly to weaned pups			
Chapin et al., 1997 NTP, 1988	Mice, continuous breeding study by gavage 0, 6.6, 15.9, 41.2 mg/kg-day		Reduced bw observed at the delivery of the 4th litter and on PND 14 of the 5th litter for 41.2 mg/kg-day group	No significant differences observed among groups for the number of litters per pair, litter size, proportion of live pups, sex ratio, or pup weight at birth

References in bold are selected as a starting point for risk characterisation

受胎能に関しては、得られたデータに基づくと、クロロホルムによる影響は、リスク警句の付与が妥当と思えるほど重大ではない。

発生毒性に関しては、得られたデータに基づくと、クロロホルムは、リスク警句 R63「胎児へ有害性が示されるリスクの可能性はある」を付与して、カテゴリー3 に分類すべきである。