

揮発性有機化合物の吸入暴露装置の開発と体内動態研究

武 信

目次

第一章 序論	5
1-1. はじめに	6
1-2. 化学物質	14
1-2-1. クロロホルム	15
1-2-2. 1,2-ジクロロエタン	16
1-2-3. 1,2-ジクロロプロパン	16
1-2-4. 1,4-ジオキサソ	17
1-3. 動物	17
1-4. 吸入暴露装置の吸入暴露濃度の測定条件	18
1-5. 血液、組織サンプルの前処理	19
1-6. 血液、組織中の揮発性有機化合物濃度の測定条件	19
1-7. 統計検定	21
1-8. まとめ	21
第二章 吸入暴露装置の開発	22
2-1. はじめに	23
2-2. 研究の基本方針	23
2-3. 吸入暴露装置と試験計画	24
2-3-1. 吸入暴露装置	24
2-3-2. 試験計画	27
2-4. 結果と考察	28
2-4-1. <実験 1> 吸入暴露装置の性能試験(装置内に動物がいない状態)	28
2-4-2. <実験 2> 吸入暴露装置の性能試験(装置内に動物がいる状態)	29
2-4-3. <実験 3> 吸入暴露装置の性能試験(装置内に動物がいる状態で尾静脈から	

血液を採取).....	30
2-5. 結論	31
第三章 クロロホルムの吸入暴露濃度と血液中濃度の時間曲線下面積(AUC):吸入暴	
露濃度と AUC の関係から他の投与経路を吸入暴露等価濃度への推定 ..	33
3-1. はじめに	34
3-2. 研究の基本方針	34
3-3. 試験計画	35
3-4. 結果と考察	36
3-4-1. 吸入暴露グループ	36
3-4-2. 時間曲線下面積(AUC)と吸入暴露濃度の関係	38
3-4-3. 経口投与グループ	39
3-4-4. 他の投与経路でのクロロホルムの吸入暴露等価濃度.....	41
3-5. 結論	45
第四章 クロロホルムの血液、組織中濃度と安定同位体を用いた複数投与による各投与	
経路の体内動態	47
4-1. はじめに	48
4-2. 研究の基本方針	48
4-3. 試験計画	49
4-4. 結果と考察	52
4-4-1. 単独吸入暴露グループ	52
4-4-2. 単独経口投与グループ	53
4-4-3. 複数投与(吸入暴露+経口投与)グループ	53
4-4-4. クロロホルムの分配係数の比率と投与経路の関係.....	59

4-5. 結論	62
第五章 1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパン、1,4-ジオキサンの体内動態	63
5-1. はじめに	64
5-2. 1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパンの体内動態	64
5-2-1. 1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパンの研究の基本方針	64
5-2-1-1. 1,2-ジクロロエタンの研究の基本方針	64
5-2-1-2. 1,2-ジクロロプロパンの研究の基本方針	65
5-2-2. 1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパンの試験計画	65
5-2-2-1. 1,2-ジクロロエタンの試験計画	65
5-2-2-2. 1,2-ジクロロプロパンの試験計画	66
5-2-3. 1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパンの結果と考察	66
5-2-3-1. 1,2-ジクロロエタンの結果と考察	66
5-2-3-1-1. 血液、組織中 1,2-ジクロロエタン濃度	66
5-2-3-1-2. 1,2-ジクロロエタンの時間曲線下面積(AUC)と分配係数	69
5-2-3-1-3. 1,2-ジクロロエタンの分配係数の比率	70
5-2-3-2. 1,2-ジクロロプロパンの結果と考察	72
5-2-3-2-1. 血液、組織中 1,2-ジクロロプロパン濃度	72
5-2-3-2-2. 1,2-ジクロロプロパンの半減期($T_{1/2}$)と時間曲線下面積(AUC)	76
5-2-3-2-3. 1,2-ジクロロプロパンの分配係数と各組織濃度の関係	77
5-2-3-2-4. 1,2-ジクロロプロパン、1,2-ジクロロエタン、クロロホルムとの関係	80
5-2-4. 1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパンの結論	80
5-2-4-1. 1,2-ジクロロエタンの結論	80
5-2-4-2. 1,2-ジクロロプロパンの結論	81
5-3. 1,4-ジオキサンの体内動態	81

5-3-1. 1,4-ジオキサンの研究の基本方針	81
5-3-2. 1,4-ジオキサンの試験計画	82
5-3-3. 1,4-ジオキサンの結果と考察	83
5-3-3-1. 単独吸入暴露グループ	83
5-3-3-2. 単独経口投与グループ	85
5-3-3-3. 複数投与(吸入暴露+経口投与)グループ	86
5-3-3-4. 1,4-ジオキサンの分配係数の比率と投与経路の関係	92
5-3-4. 1,4-ジオキサンの結論	95
References	96
総括	110
謝辞	117

第一章

序論

1-1. はじめに

化学工業は 19 世紀後半から急速に発展し、現在では、石油化学製品、農薬、医薬、食品添加物などに数多くの化学物質が生み出され、使用されている。その化学物質についてのデータベース化を図るため、1965 年にケミカルアブストラクトサービス (Chemical Abstracts Service: CAS) が稼働開始した。CAS によると 2009 年に登録された化学物質の数は 5000 万種類、2011 年には 6000 万種類、2012 年には 7000 万種類、2013 年に 7500 万種類以上になり、人類が発見または合成した化学物質は、近年急速に増加している^[1]。

化学物質の多くは利便性が高く、日常生活に不可欠であり、ヒトは恩恵をうけている。一方、産業現場、一般生活環境、自然環境等で、ヒトは化学物質に暴露される可能性があるため、安全性の確保は欠かせない課題となっている。

化学物質に対するヒトへの安全性を確保するため、それぞれの化学物質の有害性について調査されてきた。それらの調査結果を踏まえ、各種法律、規制等 (労働安全衛生法、化学物質等安全データシート (Safety Data Sheet: SDS) の表示義務等) がとられている。また、米国産業衛生専門家会議 (American Conference of Governmental Industrial Hygienists: ACGIH)、日本産業衛生学会 (Japan Society for Occupational Health: JSOH) などの機関では、これらの化学物質の許容濃度の勧告、環境省では、事業者の化学物質排出移動量届出制度 (Pollutant Release and Transfer Register: PRTR 制度) を制定している。

国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer: IARC) では、化学物質のヒトに対する発がん性リスクを分類している。そのリスク評価に重要な情報として、疫学、動物実験、体内動態等の化学物質に関する各種データである。

化学物質のうち揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compound: VOC) も同様にヒトへの健康影響や環境汚染を引き起こしている。VOC は高い揮発性があり、ヒトでは主に呼気による吸入経路から体内に吸収されるため、健康影響評価は吸入暴露実験の結果に基づいて行う必要がある。吸入暴露実験では小動物を用いた VOC の吸入暴露による急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性と発がん性等の試験が実施され、リスク評価に活用されている。

吸入暴露実験は VOC を気化させ、吸入暴露装置に収容した小動物に吸入暴露を行う。吸入暴露実験は、吸入暴露期間(小動物に VOC を一定時間、吸入暴露する時間)と吸入暴露終了後(小動物に VOC の吸入暴露を終了した後、清浄空気を吸わせる時間)の2つの期間で実験を実施している(Figure 1)。

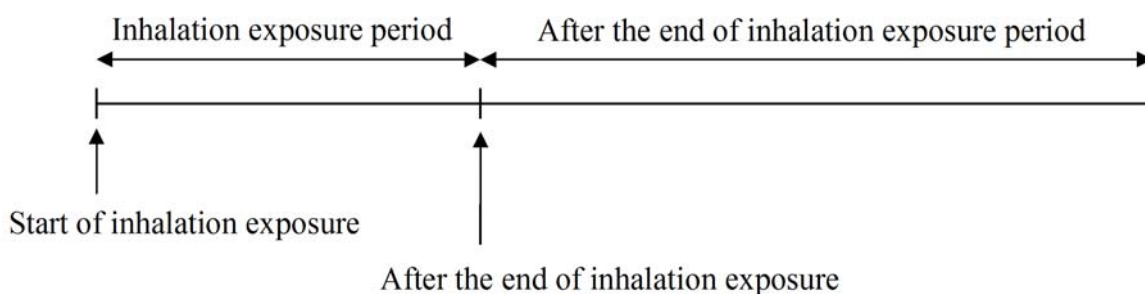


Figure 1. Inhalation experiment at two periods.

吸入暴露実験では、VOC 暴露濃度を ppm (volume/volume) の単位で表記している。ppm とは、100 万分のいくらかであるかという割合を示す数値であり、 $1\text{ppm}=0.0001\%$ である。ppm の表記を mg/m^3 表記にする式は、「 $\text{mg}/\text{m}^3=(\text{ppm}(\text{L})/10^{-6}(\text{L}))\times(\text{分子量}\times 10^3(\text{mg}))/(22.4\times 10^3(\text{m}^3))\times(273^\circ\text{C}/(273+25^\circ\text{C}))$ 」(温度 25°C 、1 気圧で計算した場合) で変換できる。

吸入暴露実験を実施するための吸入暴露装置は、主に全身暴露チャンバーまたは鼻部暴露チャンバーを用いて実施している。しかしながら、これまでの装置はチャンバーの構造面、安全面等から吸入暴露期間の採血は困難であった。また、動物をチャンバーから取り出して採血したとしても、VOC は揮発性が高いため正確な血液中濃度が得られない。従って、VOC に関する吸入暴露期間の血液中濃度の詳細な研究は極めて少ない。

従って、吸入暴露期間の正確な血液中濃度を測定することは、VOC の生理学的薬物動態 (Physiologically Based Pharmacokinetic: PBPK) モデル、毒性のメカニズムを解明するためのデータとして重要な研究課題である。

本研究は、ラットに吸入暴露しながら採血できる吸入暴露装置を開発した (Photographs

1-4)。この装置の新規性は、吸入暴露実験における吸入暴露期間の VOC の血液中濃度を測定できることである。その結果、吸入暴露期間に体内へ取り込まれた正確な VOC の動態が明らかになる。吸入暴露終了後の血液中濃度とともに評価すれば、従来の吸入暴露装置では不可能であった VOC の体内暴露量が明確になり、詳細な体内動態を把握することが可能となる。また、この装置は同一動物から複数回、採血できるため、最少の動物数で血液中 VOC 濃度の吸入暴露期間のデータが得ることができる。その結果は正確な血液中 VOC 濃度の経時変化と時間曲線下面積 (Area-Under-the-Curve: AUC) として活用でき、生体内での体内動態を把握できる。また、従来の全身暴露チャンバーでは、VOC によっても異なるが、0.5%程度、皮膚吸収があると報告されている^[2]。開発した装置は、動物をホルダー内に収容するため、VOC の皮膚からの吸収が更に軽減できる。



Photograph 1. The inhalation chamber system.



Photograph 2. Generator.



Photograph 3. Inhalation chamber.



Photograph 4. Automatic gas chromatography.

更に、本装置を用いた吸入暴露実験で VOC の組織中濃度を測定することで、体内での VOC の分布、蓄積がこれまで以上に明確になる。その血液、組織中濃度の結果は、吸入暴露での PBPK モデル、毒性メカニズムを解明するためのデータとして大いに活用できる。本装置の開発により、VOC の吸入暴露によるヒトへのリスクアセスメントのための基本的なデータ、作業現場や一般生活環境等の VOC 濃度の規制等の有用なデータとして活用が可能となる。更に、開発した装置で得られたデータは、ヒトに対する VOC の発がん性のメカニズム解析にも活用できる情報である。

VOC に関しては、以前から *in vivo* での分配係数^[3-5] が報告されている。開発した装置で得られた VOC の血液、組織中濃度と *in vivo* での分配係数を比較することで、生体内での VOC の分布、蓄積が平衡状態か過剰状態であるかを把握することができる。その結果は、吸入暴露による生体内の PBPK モデルのデータとして活用できる。

ヒトでは、主に吸入経路から VOC を体内に吸収されるが、VOC は屋外、屋内の空気、飲料水、様々な食品等に存在するため、VOC を複数の経路から暴露される可能性もある。従って、VOC を用いた複数投与での各投与経路の体内動態を把握することは重要な研究課題である。しかしながら、複数投与での各投与経路で小動物に暴露したとき、各投与経路から取り込まれた VOC が体内で混合するため、各投与経路に由来した体内動態を把握することはできない。

この複数投与での各投与経路での体内動態を把握する研究を実施するため、VOC の安定同位体に着目した。吸入暴露で VOC、経口投与で VOC の安定同位体を小動物に投与し、血液、組織サンプルを質量分析計 (Mass Spectrometer: MS) で異なるフラグメントピークを設定し、各投与経路における血液、組織中濃度を測定した。それらの結果と単独投与経路 (吸入暴露または経口投与) で投与した結果を比較し、体内における複数投与での各投与経路の VOC の分布、蓄積を明らかにした。

第二章では、代表的な VOC であるクロロホルム(CHCl_3)を用いて、開発した吸入暴露装置の性能試験とラットに吸入暴露し、血液中濃度を測定した結果について述べる。

第三章では、第二章で報告した CHCl_3 について、吸入暴露濃度を 4 濃度設定し、吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液中濃度と AUC を求めた。更に、吸入暴露濃度と AUC の関係から他の投与経路における吸入暴露等価濃度を推定した結果について述べる。

第四章では、第二、三章で報告した CHCl_3 について、血液、組織中濃度の経時変化と複数投与での各投与経路の体内動態について述べる。ラットに吸入暴露(CHCl_3)と経口投与(CHCl_3 の安定同位体)を実施し、MS を用いて各投与経路の血液、組織中濃度の経時変化と AUC を求めた。それらの結果と単独吸入暴露または単独経口投与した血液、組織中濃度と AUC を比較した結果について述べる。

第五章では、開発した吸入暴露装置を用いて、 CHCl_3 以外の VOC として、1,2-ジクロロエタン(DCE)、1,2-ジクロロプロパン(DCP)をラットに吸入暴露し、吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液、組織中濃度の経時変化と AUC を求めた結果について述べる。

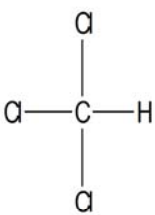
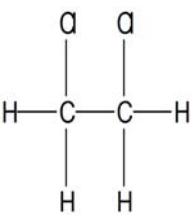
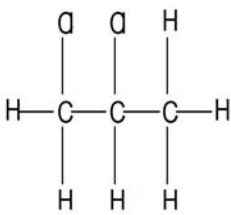
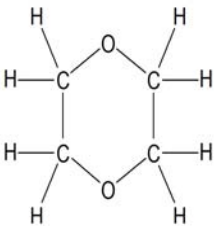
更に、第四章で確立した複数投与での各投与経路の体内動態について 1,4-ジオキサン(DX)をラットに吸入暴露(DX)と経口投与(DX の安定同位体)を実施し、MS を用いて各投与経路の血液、組織中濃度の経時変化と AUC を求めた。それらの結果と単独吸入暴露または単独経口投与した血液、組織中濃度と AUC を比較した結果について述べる。

総括では第二章から第五章までの結果をまとめ、今後の展望等について述べる。

1-2. 化学物質

本研究で使用した CHCl_3 、DCE、DCP、DX の情報を Table 1 に示した。

Table 1. Information of VOC.

	Substance name			
	Chloroform ^[6]	1,2-Dichloroethane ^[7]	1,2-Dichloropropane ^[8,9]	1,4-Dioxane ^[10]
• Molecular formulae	CHCl_3	$\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$	$\text{C}_3\text{H}_6\text{Cl}_2$	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$
				
• CAS No.	67-66-3	107-06-2	78-87-5	123-91-1
• Molecular mass	119.38	98.96	113.0	88.11
• Boling-point	61.1°C	83.5°C	96.4°C	101.1°C
• Solubility to water	Slightly soluble	Slightly soluble	Slightly soluble	Soluble
• IARC	Group 2B	Group 2B	Group 1	Group 2B
• LC50 (Rat) (Lethal concentration for 50%)	9780ppm/4hrs ^[11]	3000ppm/2.75hrs ^[12]	3000ppm/8hrs ^[13]	12780ppm/2hrs ^[14]
• LD50 (Rat) (Lethal dose for 50%)	445-2000mg/kg ^[15]	794mg/kg ^[12]	1700-2100mg/kg ^[13]	5170-7300mg/kg ^[14]
• Occupational exposure limits				
ACGIH ^[16]	10ppm	10ppm	10ppm	20ppm
JSOH ^[17]	3ppm	10ppm	1ppm	10ppm
• Partition coefficient				
Blood	20.8 ^[3]	30.4 ^[3]	18.7 ^[3]	1850 ^[5]
Liver	21.1	35.7	28.4	1557
Fat	203	344	499	851

IARC のヒトに対する物質の発がん性の評価は、下記の評価に分類される。

Group 1:ヒトに対する発がん性が認められる。

Group 2A:ヒトに対する発がん性がおそらくある。

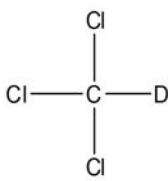
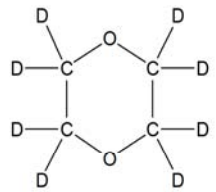
Group 2B:ヒトに対する発がん性が疑われる。

Group 3:ヒトに対する発がん性が分類できない。

Group 4:ヒトに対する発がん性がおそれくない。

また、本研究で使用した化学物質の安定同位体の情報を Table 2 に示した。

Table 2. Information of deuterated VOC.

	Substance name	
	Chloroform-d ^[18]	1,4-Dioxane-d ₈ ^[19]
• Molecular formulae	CDCl ₃	C ₄ D ₈ O ₂
		
• CAS No.	865-49-6	17647-74-4
• Molecular mass	120.38	96.16

本研究で使用した CHCl₃ (純度 99.0%以上)、DCE (純度 99.0%以上)、DCP (純度 99.5%以上)、DX (純度 99.5%以上) は、和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入した。VOC の安定同位体である CDCl₃ (純度 98.0%以上)、DX-d₈ (純度 99.0%以上) は、Cambridge Isotope Laboratories, Inc (アンドーバー、米国) から購入した。

1-2-1. クロロホルム

CHCl₃ はフルオロカーボン、医薬、殺虫剤等の中間合成過程の有機溶剤として広く使われている^[6]。一般環境下では、CHCl₃ は空気中、公共用水に検出されている^[20,21]。また、CHCl₃ は飲料水の塩素処理の過程においても生成される。Andelman^[22] や日本の環境省^[23] は、CHCl₃ が屋外や屋内の空気、飲料水、さまざまな食品に存在すると報告した。CHCl₃ は、世界中の政府機関で飲料水汚染物質として管理される^[24,25]。ヒトでは摂取、吸入、皮膚吸収によって CHCl₃ に暴露される可能性がある^[26,27]。

CHCl₃ の IARC のヒトに対する発がん性の評価は、Group 2B に分類されている^[6]。CHCl₃

の吸入暴露試験^[28]、経口投与試験^[29,30]において、ラットとマウスで腫瘍の発生が認められた。更に、複数投与(吸入暴露+経口投与試験)^[31]においても、ラットに腫瘍の発生が誘発されることが報告されている。

1-2-2. 1,2-ジクロロエタン

DCE は主に塩化ビニルの製造中間体として使われている^[32]。一般環境下では、DCE は屋外や屋内の空気、公共用水から検出されている^[22,33]。

DCE の IARC のヒトに対する発がん性の評価は、Group 2B に分類されている^[7]。しかしながら、ラットを使用した吸入暴露研究による DCE の発がん性に関して、矛盾した結果が報告されている。78 週間の吸入暴露試験で DCE の 150~250ppm の暴露濃度での Maltoni et al.^[34] の研究と 2 年間の吸入暴露試験で DCE の 50ppm の暴露濃度での Cheever et al.^[35] の研究では、雌雄のラットに顕著な腫瘍の増加は観察されなかった。一方、著者の所属機関である中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター(以下、当センター)の 2 年間の吸入暴露試験で DCE の 160ppm の暴露濃度で、雄ラットに腹膜の腫瘍、雌ラットに乳腺の腫瘍の顕著な増加が観察された^[36]。

1-2-3. 1,2-ジクロロプロパン

従来、DCP は土壌くん蒸剤、化学物質の生成中間体、産業用溶媒として使われ、ペンキ除去剤、家具等のニスから検出されていた^[37]。現在、DCP の大部分の使用は中止されているが、日本では DCP は外気、公共用水から検出されている^[38]。

DCP の IARC のヒトに対する発がん性の評価は、Group 3 に分類されていた^[8]。しかしながら、最近、日本の小規模の印刷会社の労働者は、有機溶剤として DCP を 1985~2006 年、ジクロロメタン(DCM)を 1985~1997/1998 年で使用し、その後、胆管がんを発症した報告があった^[39]。

国立がん研究機関(National Toxicology Program: NTP)は、DCP の経口投与による 2 年

間の動物実験では投与用量に関連し、雌雄マウスで肝臓腫瘍、雌ラットで乳腺の腺癌が増加したと報告した^[40]。当センターの2年間のDCPの吸入暴露試験では、200ppmを暴露した雄マウスでハーダー腺、雌マウスで肺腫瘍の顕著な増加^[41]、500ppmを暴露した雌雄ラットで鼻腔の腫瘍の顕著な増加^[42]が観察された。IARCは2014年7月、DCPに対する発がん性の評価をGroup 1に再変更した^[9]。

1-2-4. 1,4-ジオキサン

DXは広範囲にわたる有機製品の溶媒として^[10]、更に、塩素で処理された溶媒の安定剤としても使われている^[43,44]。一般環境下では、DXは職場の空気^[45]、一般の屋外や屋内の空気、公共用水から検出されている^[46-50]。

DXのIARCのヒトに対する発がん性の評価は、Group 2Bに分類されている^[10]。DXにおけるラットを用いた動物実験では、吸入暴露試験^[51]、経口投与試験^[52-57]によって、鼻腔、肝臓、腎臓、皮下組織、乳腺、腹膜を含む様々な組織で顕著な腫瘍の増加が報告されている。

1-3. 動物

本研究で使用した動物は、日本チャールス・リバー株式会社(神奈川、日本)から購入した。

動物の種、系統、清浄度、実験時の週齢と性をTable 3に示した。

Table 3. Animals.

	Chapters 2,3	Chapters 4,5
Species	Rat	Rat
Strain	CrI:CD(SD)IGS	F344/DuCrI:CrIj
Cleanliness	SPF (Specific Pathogen Free)	SPF
Sex	Male	Male
Age of experiment	10-week-old	18-week-old

第二章から第五章で使用した動物数、動物体重、飼育環境を Table 4 に示した。

Table 4. Animal number, body weight, and animal conditions.

	Animal number	Body weight	Temperature	Humidity
Chapter 2	12	341-368g	22 ± 3°C	51 ± 3%
Chapter 3	40	369-391g	22 ± 2°C	52 ± 12%
Chapter 4	135	243-301g	23 ± 2°C	55 ± 15%
DCE of Chapter 5	45	243-289g	22 ± 2°C	52 ± 12%
DCP of Chapter 5	84	285-332g	22 ± 2°C	55 ± 15%
DX of Chapter 5	135	264-298g	22 ± 2°C	50 ± 10%

第二、三、四章と第五章の DCE、DX の研究での動物は、「Guide for the care and use of laboratory animals」に適合して飼育した^[58]。第五章の DCP の研究での動物は、当センターの「Regulation for Proper Conduct of Animal Experiments in the Japan Bioassay Research Center」に従って飼育した。更に、すべての研究において、当センターの動物実験委員会によって審査し、承認された。

1-4. 吸入暴露装置の吸入暴露濃度の測定条件

本研究での吸入暴露装置内の各 VOC 蒸気は GL Sciences RT731 (東京、日本) を使って 15 分おきにガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography: GC) システム (Agilent Technologies 6890 (サンタクララ、米国)) に送気し、分析した (Photograph 4)。各 VOC 蒸気の暴露濃度測定の分析条件を Table 5 に示した。

Table 5. GC conditions.

Column	J&W DB-1 (0.53mmID×5m)
Oven temperature	40°C (CHCl ₃ , DCE and DX of Chapters 2-5), 70°C (DCP of Chapter 5)
Injection and detection temperature	200°C
Detector	FID (Flame Ionization Detector)
Carrier gas	Helium
Flow rate	7.5mL/min

1-5. 血液、組織サンプルの前処理

第二、三章では、血液は動物から 1 回当たり 0.1mL 採取して、0.1mL の蒸留水の入ったヘッドスペースサンプラー (Headspace sampler: HS) 用サンプル瓶 (10mL 用) に入れた。そして、セプタム付きアルミニウムキャップで直ちに蓋をして血液サンプルとした。

第四、五章では、血液は動物から 0.2mL 採取して、0.2mL の蒸留水の入った HS 用サンプル瓶 (10mL 用) に入れた。そして、セプタム付きアルミニウムキャップで直ちに蓋をして血液サンプルとした。組織 (第四章、第五章の DCE は約 0.1~1g、第五章の DCP は約 0.1~0.5g、第五章の DX は約 0.3~1g) は、動物から採取した各組織重量を測定した後、5mL の蒸留水の入った HS 用サンプル瓶 (10mL 用) に入れた。そして、セプタム付きアルミニウムキャップで直ちに蓋をして組織サンプルとした。

1-6. 血液、組織中の揮発性有機化合物濃度の測定条件

血液、組織中の VOC 濃度は、HS-GC/MS を用いて分析した。HS は、第二章から第五章のすべての VOC で Agilent Technologies 7694 (サンタクララ、米国) を使用した。GC/MS システムは、第二、三章と第五章の DCP に関して Agilent Technologies 5973N (サンタクララ、米国)、第四章に関して日立製作所 M-80B (東京、日本)、第五章の DCE、DX に関して Agilent Technologies 5989B (サンタクララ、米国) を使用した。HS の分析条件を Table 6、GC/MS の分析条件を Table 7 に示した。

Table 6. HS conditions.

Oven temperature	80°C (CHCl ₃ of Chapters 2,3 and DCE of Chapter 5), 60°C (CHCl ₃ , CDCl ₃ of Chapter 4), 100°C (DCP of Chapter 5), 110°C (DX, DX-d ₈ of Chapter 5)
Loop temperature	130°C (CHCl ₃ of Chapters 2,3 and DCE, DCP, DX, DX-d ₈ of Chapter 5) 80°C (CHCl ₃ , CDCl ₃ of Chapter 4)
Vial equilibration time	10 min (Blood) 30 min (Tissues)

Table 7. GC/MS conditions.

Column	J&W DB-1 (0.25mmID×60m) (CHCl ₃ of Chapter 2 and DCE, DCP of Chapter 5), Agilent Technologies Ultra-1 (0.2mmID×50m) (CHCl ₃ of Chapter 3), Agilent Technologies INNOWax (0.53mmID×15m) (CHCl ₃ , CDCl ₃ of Chapter 4), Agilent Technologies INNOWax (0.2mmID×50m) (DX, DX-d ₈ of Chapter 5)
Oven temperature	80°C (CHCl ₃ of Chapters 2,3 and CHCl ₃ , CDCl ₃ of Chapter 4), 100°C (DCE, DCP of Chapter 5), 130°C (DX, DX-d ₈ of Chapter 5)
Ion source temperature	230°C (CHCl ₃ of Chapters 2,3 and DCP of Chapter 5), 250°C (CHCl ₃ , CDCl ₃ of Chapter 4), 200°C (DCE, DX, DX-d ₈ of Chapter 5)
Carrier gas	Helium
Flow rate	1mL/min (CHCl ₃ of Chapters 2,3 and DCP, DCE, DX, DX-d ₈ of Chapter 5), 10mL/min (CHCl ₃ , CDCl ₃ of Chapter 4)
Ionization	EI (Electron Ionization)
Fragment peak	83m/z (CHCl ₃ of Chapters 2,3), 82.946m/z (CHCl ₃ of Chapter 4), 83.953m/z (CDCl ₃ of Chapter 4), 62m/z (DCE of Chapter 5), 63m/z (DCP of Chapter 5), 88m/z (DX of Chapter 5), 96m/z (DX-d ₈ of Chapter 5)
Collector slit	150µm (CHCl ₃ , CDCl ₃ of Chapter 4)

1-7. 統計検定

第四章、第五章の DX に関して、統計検定を実施した。血液、組織中濃度 (n=5) は、平均濃度 \pm S.D. で表し、同一採取時間の単独投与経路と複数投与での同じ投与経路間で Student's t 検定を実施した。P 値は <0.05 で有意にした。

1-8. まとめ

VOC の研究は、動物を使用した急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性と発がん性等の吸入暴露試験が実施されているが、吸入暴露期間での血液、組織中濃度等の体内動態の研究は極めて少ない。従って、吸入暴露期間の血液、組織中濃度を測定するため、吸入暴露装置を開発した。得られた血液、組織中濃度の結果は、吸入暴露での PBPK モデル、毒性メカニズムを解明するためのデータとして大いに活用でき、VOC の吸入暴露による体内動態を把握することは、ヒトへのリスクアセスメントのために必要な研究である。更に、VOC の複数投与による各投与経路の血液、組織中濃度を把握することは、複数投与での各投与経路の影響を評価するために重要である。

第二章

吸入暴露装置の開発

2-1. はじめに

第二章では吸入暴露装置の開発に関して述べる。本章は代表的なVOCであるCHCl₃を用いて開発した吸入暴露装置の性能試験とラットに吸入暴露し、血液中濃度を測定した結果について述べる。

本章は5節からなる。2-2では「研究の基本方針」、2-3では「吸入暴露装置と試験計画」、2-4では「結果と考察」、2-5では「結論」について述べる。

2-2. 研究の基本方針

本研究は、開発した吸入暴露装置の性能試験と本装置を用いてラットに吸入暴露し、吸入暴露期間の血液中濃度を測定するために実施した。

VOCにおける動物を用いた吸入暴露試験は、VOCの蒸気(気体)に暴露される可能性のあるヒトへのリスクアセスメントに有用なエンドポイントを決定するために用量反応関係について調査される。ほとんどの吸入暴露試験の暴露濃度はVOCの毒性、発がん性等のエンドポイントとして使われている。更に、ヒトへの健康に直接関連がある血液中VOC濃度とその経時変化も重要な情報である。

吸入暴露試験は、吸入暴露期間(動物にVOCの蒸気を暴露する一定の時間)と吸入暴露終了後(小動物にVOCの吸入暴露を終了した後、清浄空気を吸わせる時間)の2つの期間を設けて実施する。従来の吸入暴露試験に用いる吸入暴露チャンバーは、主に全身暴露チャンバーまたは鼻部暴露チャンバーを用いて動物に暴露するが、チャンバーの構造面、安全面等から吸入暴露期間の採血は困難である。

従来の報告では、鼻部暴露チャンバーを用いて吸入暴露期間での血液採取をした報告^[59]、全身暴露チャンバーを用いての吸入暴露期間での血液採取をした報告^[60-62]はあるが限られた情報しかない。全身暴露チャンバーは動物を個々に収容しVOC蒸気を暴露する。これらの環境下では吸入暴露期間、動物から血液を採取することは不可能なため、吸入暴

露濃度を反映した正確な血液中濃度データを得ることは困難である。従って、吸入暴露終了後、採取した血液中 VOC 濃度の結果を報告することが一般的である。

本研究は、吸入暴露期間、ラットの尻尾から血液を採取できる吸入暴露装置を開発した。VOC として代表的な CHCl_3 (CHCl_3 は、屋外、屋内の空気中で検出され^[6,63]、発がん性物質^[28,31]である)を用いて、開発した装置の性能実験とラットに吸入暴露し、吸入暴露期間の血液中濃度を測定した。

2-3. 吸入暴露装置と試験計画

2-3-1. 吸入暴露装置

開発した吸入暴露装置は、下記に示す 2 つのパーツから構成した。

1. 動物を収容し、 CHCl_3 蒸気に暴露する吸入暴露装置の本体。

吸入暴露装置の本体はアクリル樹脂製の供給ヘッダー、動物チャンバー、流量計、フローコントロールバルブ、ポリエステル製の排気ヘッダーで構成した (Figure 2)。

2. 動物の尻尾から血液を採取する動物用血液採取ホルダー器材。

動物用血液採取ホルダー器材は、下記に示した 2 つの役割をする器材から構成した。

1 つ目は、動物を収容する役割をする器材として、ドーム型のヘッドカバー、アクリル樹脂製の動物ホルダーで構成した。

2 つ目は、動物の尻尾を動物ホルダーの外 (動物の尻尾だけ暴露しない環境) に出す役割をする器材として、シリコンゴム製のセプタム、ステンレス製のバックアッププレート、それらを固定するホルダーナットで構成した (Figure 3)。

CHCl_3 の発生方法は、化学物質供給装置 (柴田科学株式会社) の発生容器内に液体の CHCl_3 を循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のバブリングにより CHCl_3 を蒸発させた。この CHCl_3 蒸気を循環式恒温槽で一定温度に冷却した後、清浄空気 (希釈空気) と混合し、設定濃度に調整した後、流量計を用いて一定量を吸入暴露装置 (Figure 2) へ供給した。

CHCl₃ 蒸気は供給ヘッダーを通して動物チャンバーに供給し、排気ヘッダーを通過した後、活性炭処理し排気した。一定の流量の CHCl₃ 蒸気で動物を暴露するため、フローコントロールバルブで流量を調整し、流量計で監視した。流量計とフローコントロールバルブは、各動物チャンバーに設置した。

その装置を設定した暴露濃度に維持した後、動物は動物用血液採取ホルダー器材 (Figure 3) に入れて、動物チャンバーに収容し、尻尾だけを除いた状態で動物を CHCl₃ 蒸気に暴露した (Figure 4)。

CHCl₃ 蒸気を動物に暴露するとき、動物ホルダーは動物の大きさや体重等に合ったサイズ (円形) を用意した。動物をヘッドカバー付動物ホルダーに収容した後、Figure 3 に示した動物ホルダーのスライドラインで動物の大きさに合わせて、ヘッドカバーを動物の尻尾全体が出る位置 Position X (Figure 3) までスライドさせ、ヘッドカバーで固定した。

CHCl₃ 蒸気の漏れを防ぐために動物の尻尾の太さより、小さい穴のあいたシリコン製セプタムとバックアッププレートに動物の尻尾全体を通した後、バックアッププレートで動物ホルダーを固定し吸入暴露を開始した。血液サンプルは、Figure 4 で示した状態で動物の尾静脈から採取した。

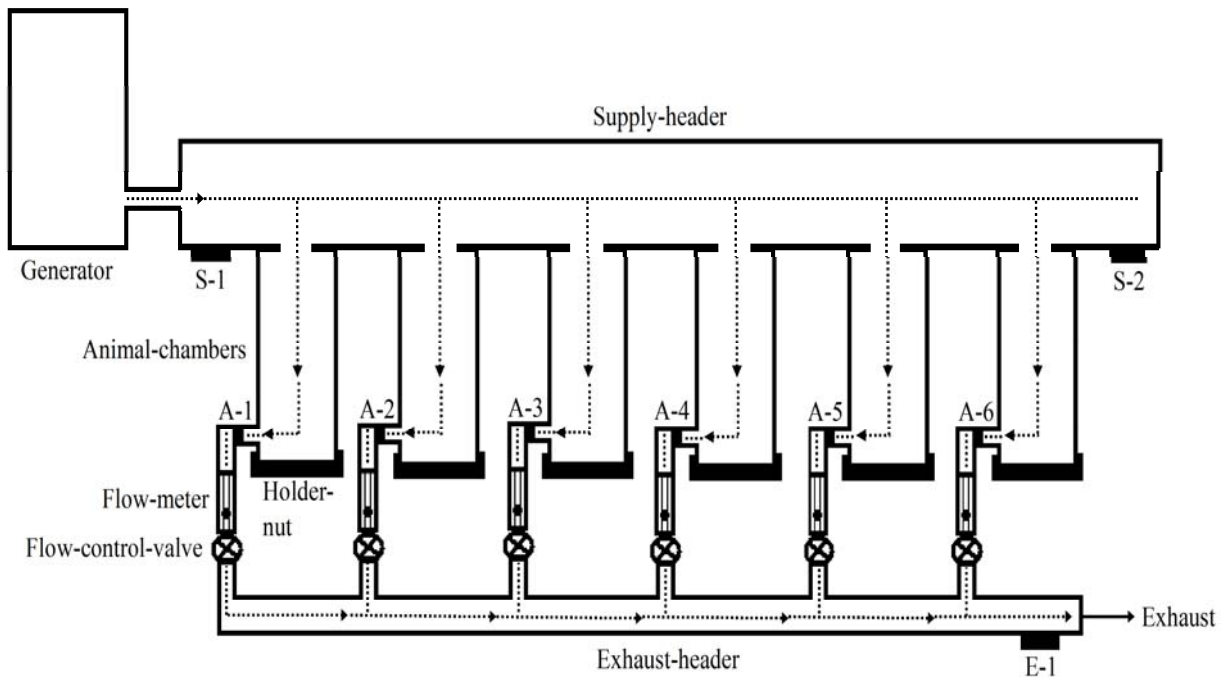


Figure. 2. Schematic diagram of inhalation apparatus.

S-1, S-2: sampling ports of supply-header, A-1-6: sampling ports of animal-chambers, E1: sampling port of exhaust-header.

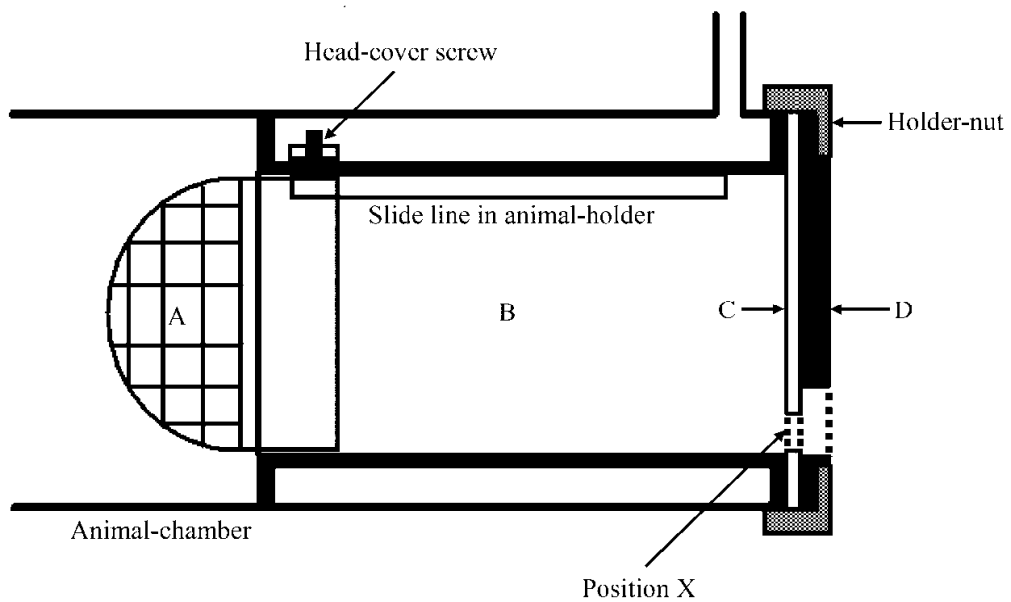


Figure 3. Blood-collection module of inhalation exposure system.

Animal-housing assembly (A: Head-cover, B: Animal-holder) and tail-holder assembly (C: Silicon-septum, D: Backup-plate).

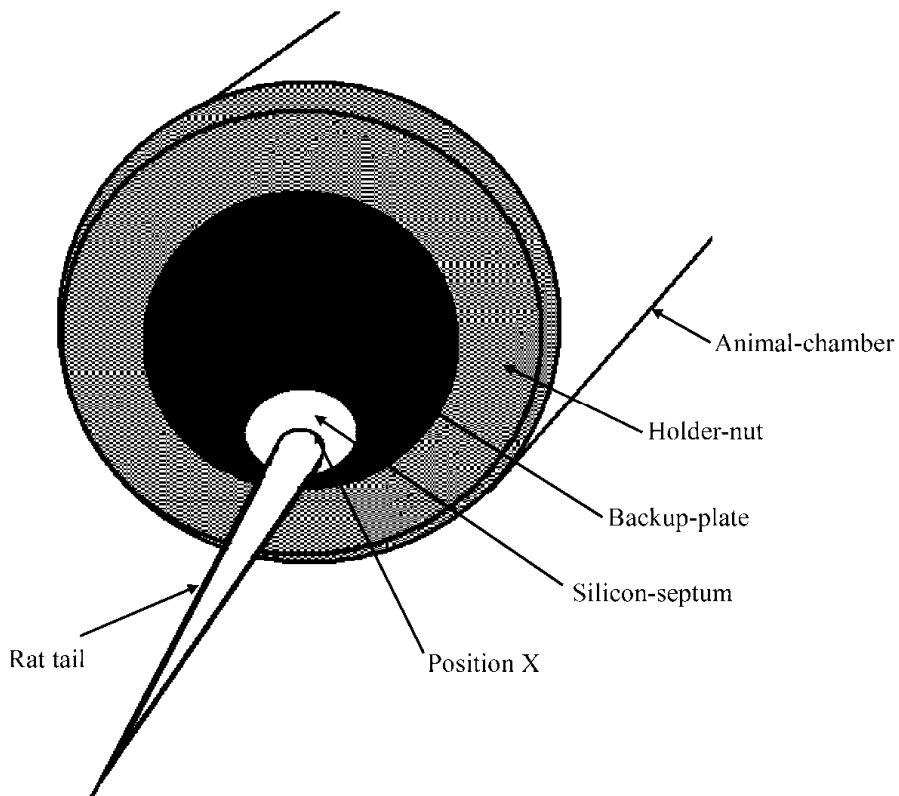


Figure 4. Rat tail protruding through tail-holder assembly when blood-collection module is in place in inhalation exposure system.

2-3-2. 試験計画

開発した吸入暴露装置の性能実験とラットに吸入暴露し、吸入暴露期間の血液中濃度を測定するために試験計画を立案した。

吸入暴露装置は、 CHCl_3 蒸気をサンプルする 9 つのサンプリング箇所(供給ヘッダー(S-1 と S-2)、動物チャンバー(A-1～A-6)、排気ヘッダー(E-1))と動物チャンバーの上部にある流量計を用いて、100ppm の CHCl_3 蒸気を 6 時間暴露し、下記に示した 3 つの実験で開発した装置の性能について検証した。

<実験 1> 吸入暴露装置の性能試験(装置内に動物がいない状態)

装置内の 9 つのサンプリング箇所から CHCl_3 蒸気濃度、6 つの動物チャンバーの流量計から流量を測定した。

<実験 2> 吸入暴露装置の性能試験(装置内に動物がいる状態)

装置内に 6 匹の動物を収容し、実験 1 と同様、装置内の 9 つのサンプリング箇所から CHCl_3 蒸気濃度、6 つの動物チャンバーの流量計から流量を測定した。その流量は、動物の尻尾から CHCl_3 蒸気が漏れていないか、流量計で監視した。

<実験 3> 吸入暴露装置の性能試験(装置内に動物がいる状態で尾静脈から血液を採取)

吸入暴露装置に 6 匹の動物を収容し CHCl_3 蒸気を 6 時間暴露し、吸入暴露期間、ラット尾静脈から血液を採取した。血液サンプルを採取する時間は、1 匹当たり、吸入暴露開始 1、30、60、120、180、240、300、360 分の計 8 回、設定した。吸入暴露期間、実験 2 と同様に CHCl_3 蒸気濃度と流量を測定し、吸入暴露期間と採血中に CHCl_3 蒸気が漏れていないか、流量計で監視した。

2-4. 結果と考察

開発した吸入暴露装置は、代表的な VOC である CHCl_3 を用いた吸入暴露期間、各動物の尾静脈から血液を採取することができた。

2-4-1. <実験 1> 吸入暴露装置の性能試験(装置内に動物がいない状態)

吸入暴露装置の 9 つのサンプリング箇所(供給ヘッダー(S-1、S-2)、動物チャンバー(A-1～A-6)、排気ヘッダー(E-1))での CHCl_3 蒸気平均暴露濃度 \pm 標準偏差と変動係数を Table 8 に示した。

吸入暴露装置内での各サンプリング箇所での CHCl_3 蒸気平均暴露濃度は、100.0～101.5ppm の範囲、変動係数は 1.87%以下であった。吸入暴露期間、各動物チャンバーでの流量は、250～260mL/min の範囲で維持された。

以上の結果、吸入暴露装置内に供給した CHCl_3 蒸気は、均一で安定した濃度で供給す

ることができた。従って、この装置は良好な環境で暴露できる性能があることを確認した。

2-4-2. <実験 2> 吸入暴露装置の性能試験(装置内に動物がいる状態)

実験 1 と同様、吸入暴露装置の 9 つのサンプリング箇所(供給ヘッダー(S-1 と S-2)、動物チャンバー(A-1～A-6)、排気ヘッダー(E-1))での CHCl_3 蒸気の平均暴露濃度 \pm 標準偏差と変動係数を Table 8 に示した。

吸入暴露装置内での各サンプリング場所での CHCl_3 蒸気の平均暴露濃度は、100.1～101.3ppm の範囲、変動係数は 1.85%以下であった。吸入暴露期間、各動物チャンバーでの流量は、250～260mL/min の範囲で維持された。

開発した吸入暴露装置内の動物チャンバーに動物を収容して、 CHCl_3 蒸気を吸入暴露した結果、その装置内に供給した CHCl_3 蒸気は、均一で安定した濃度で供給することができた。更に、Figure 3 に示した動物の尻尾周辺の空気から CHCl_3 蒸気は検出されなかった。従って、バックアッププレートとシリコンセプタムの穴に動物の尻尾の付け根が効果的に密着していた。

以上の結果、動物を収容した場合でも、この装置は良好な環境で暴露できる性能があることを確認した。

Table 8. CHCl₃ vapor concentration at each sampling port.

Parts name	Sampling port	Study-1 ^a		Study-2 ^b	
		Mean ± S.D. (ppm)	C.V. (%)	Mean ± S.D. (ppm)	C.V. (%)
Supply-header	S-1	101.5 ± 0.83 ^c	0.82	101.1 ± 1.87	1.85
	S-2	100.7 ± 0.77	0.77	100.9 ± 1.53	1.52
Animal-chamber	A-1	100.2 ± 1.32	1.32	100.8 ± 0.61	0.61
	A-2	100.8 ± 0.84	0.83	101.3 ± 1.50	1.48
	A-3	101.1 ± 1.43	1.41	100.5 ± 1.16	1.16
	A-4	100.6 ± 1.90	1.87	100.7 ± 1.27	1.26
	A-5	100.0 ± 1.58	1.58	100.9 ± 0.98	0.97
	A-6	101.2 ± 1.89	1.87	100.9 ± 1.22	1.21
Exhaust-header	E-1	100.6 ± 1.63	1.62	100.1 ± 1.67	1.66

^a A performance study of the system without rats.

^b Confirmation of the performance study of the system with rats.

^c The CHCl₃ vapor concentration at each sampling port is expressed as the mean ± S.D. of concentrations measured at every 15 min over the course of a 6 hr exposure period.

2-4-3. <実験 3>吸入暴露装置の性能実験(装置内に動物がいる状態で尾静脈から血液を採取)

開発した装置を用いて CHCl₃ 蒸気(100ppm)を 6 時間、ラットに吸入暴露した。血液サンプルは吸入暴露期間に各動物から採取した。CHCl₃ 暴露濃度は、供給ヘッダー(Figure 1 の S-1 と S-2)と排気ヘッダー(E-1)の各サンプリング箇所測定した。平均暴露濃度 ± 標準偏差は 100.8 ± 0.82ppm(S-1)、101.6 ± 0.81ppm(S-2)、100.8 ± 0.94ppm(E-1)であり、それらの変動係数は 0.82%(S-1)、0.80%(S-2)、0.93%(E-1)であった。吸入暴露期間、各動物チャンバーでの流量は 250~260mL/min の範囲で維持された。従って、この装置は良好な環境で暴露できる性能があることを確認した。

この開発した装置を用いて吸入暴露期間、血液サンプルは各動物から 8 回採取できた。HS-GC/MS によって分析した血液サンプルの CHCl₃ 濃度を Table 9 に示した。吸入暴露開

始 1 分で血液サンプルから CHCl_3 は検出された。その結果、動物は呼気から CHCl_3 蒸気を肺へ吸収し、体内へ分布したことが証明できた。吸入暴露開始 1~60 分で血液中 CHCl_3 濃度は増加し、その後、60~360 分で血液中 CHCl_3 濃度は 1.89~2.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で維持された。その血液中 CHCl_3 濃度の変動係数は、5.02~12.96%の範囲にあった。この開発した装置で吸入暴露した 6 匹の動物から採取した血液中 CHCl_3 濃度は、ほぼ同じ値を示した。更に、6 匹の動物の血液中 CHCl_3 濃度は、吸入暴露期間、ほぼ同じ経時変化を示した。

Table 9. CHCl_3 concentration in blood samples.

Blood collection time (min)	CHCl_3 concentration in blood		
	Mean	\pm S.D. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	C.V. (%)
1	0.42	\pm 0.05 ^{a)}	12.21
30	1.44	\pm 0.08	5.61
60	1.91	\pm 0.10	5.02
120	2.04	\pm 0.26	12.96
180	1.89	\pm 0.20	10.41
240	1.91	\pm 0.20	10.60
300	1.98	\pm 0.24	11.95
360	1.95	\pm 0.25	12.55

^a n=6.

最後に、この装置で 6 時間/日、5 日間、100ppm の暴露濃度で CHCl_3 蒸気を 6 匹の動物に吸入暴露した(吸入暴露終了後、動物は装置内から取り出しケージに収容し、餌、水を自由摂取させた)。5 日間連続暴露による全動物は顕著な体重減少が認められず、動物は正常な状態(吸入暴露期間、吸入暴露終了後)であった。従って、開発した装置は動物に化学物質を数日間、暴露できることが確認できた。

2-5. 結論

吸入暴露装置の開発により、VOC の吸入暴露期間、各動物の尾静脈から血液を採取す

ることが可能となった。この装置は吸入暴露期間、他の VOC の血液中濃度の経時変化を調べるためにも有用である。この情報は VOC の吸入暴露によるヒトへのリスクアセスメントのための基本的なデータとして活用できる。

本章に関する内容について以下の論文発表を行っている。

Take, M.; Ohnishi, M.; Nagano, K.; Yamamoto, S.; Fukushima, S.

Design and performance of a system for blood collection of rats under whole-body inhalation exposure.

J. Toxicol. Sci., **2009**, *34*, 221-226.

第三章

クロロホルムの吸入暴露濃度と血液中濃度の時間曲線下面積(AUC):

吸入暴露濃度と AUC の関係から他の投与経路を吸入暴露等価濃度への推定

3-1. はじめに

第三章では、第二章で報告した CHCl_3 について、吸入暴露濃度を4濃度設定し、吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液中濃度の経時変化と AUC を求めた。吸入暴露濃度と AUC の関係から他の投与経路を吸入暴露等価濃度へ推定した結果について述べる。

本章は5節からなる。3-2では「研究の基本方針」、3-3では「試験計画」、3-4では「結果と考察」、3-5では「結論」について述べる。

3-2. 研究の基本方針

本研究は、 CHCl_3 を用いて吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液中濃度の経時変化、AUC を求め、吸入暴露濃度と AUC の関係から他の投与経路を吸入暴露等価濃度へ推定するために実施した。

いくつかの暴露濃度を設定して、実施した吸入暴露実験における化学物質の血液中濃度の経時変化とそのデータから計算した AUC は、化学物質の毒性を評価する1つの手段として必要である。他の投与経路での化学物質の体内暴露量を把握することは、投与経路ごとの化学物質の毒性を比較することができる。ヒトでは化学物質に様々な環境下で暴露される可能性がある。従って、近年、日本の環境省は化学物質の環境リスク初期評価ガイドラインにおいて、経口投与用量と吸入暴露濃度の相互変換の必要性について提言している [64]。

CHCl_3 の体内動態研究に関して、経口投与試験 [61,65-67]、腹腔内投与試験 [61,65]、吸入暴露試験 [61,65,67,68] で実施した CHCl_3 の血液中濃度の経時変化と AUC の情報が報告されている。しかしながら、吸入暴露試験による CHCl_3 の血液中濃度の経時変化と AUC の大部分の研究は、吸入暴露終了後のデータを報告しているだけである。従って、吸入暴露の CHCl_3 の影響と他の投与経路で暴露した CHCl_3 の影響を直接、比較することはできない。

第二章で述べた吸入暴露装置 [68] を用いて、本研究は 50、100、200、400ppm の CHCl_3

蒸気をラットに吸入暴露し、吸入暴露期間と吸入暴露終了後に血液サンプルを採取し、 CHCl_3 の血液中濃度の経時変化とそのデータから計算する総AUCを得るために実施した。更に、経口投与でラットに12.5、25、50、100mg/kg body weightの投与用量の CHCl_3 を投与し、吸入暴露等価濃度に変換するために総AUCを求めた。

吸入暴露濃度とAUC/kg body weightの関係は、「 $\text{AUC/kg body weight} = 0.0391 \times \text{吸入暴露濃度}$ 」で示された。この関係式を用いて、経口投与でラットに CHCl_3 を投与して得た各経口投与用量(12.5、25、50、100mg/kg)のAUC/kg body weightから吸入暴露等価濃度を推定した。この吸入暴露等価濃度は、別の投与経路で暴露した体内暴露量を評価するために有用な手段の1つである。更に、この情報は暴露によるヒトへのリスクアセスメントと化学物質の規制のためにも重要である。

3-3. 試験計画

吸入暴露試験(4暴露濃度)、経口投与試験(4投与用量)を実施するために試験計画を立案した。

動物は40匹を使用し、吸入暴露と経口投与の2つのグループ(各グループ: 20匹)に分けた。

吸入暴露グループは、各暴露濃度5匹のラットを使用して50、100、200、400ppmの CHCl_3 蒸気に360分、暴露した。経口投与グループは、各投与用量5匹のラットを使用してコーン油に溶解した CHCl_3 を12.5、25、50、100mg/kg body weightの投与用量で動物に経口投与した。

吸入暴露グループの動物は、第二章で述べた開発した吸入暴露装置を用いて、 CHCl_3 蒸気を暴露した^[68]。 CHCl_3 蒸気は発生器を用いて液体 CHCl_3 を循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のバブリングにより液体 CHCl_3 を蒸発させ発生した。50、100、200、400ppmに設定した吸入暴露装置での実際の CHCl_3 暴露濃度は、 49.9 ± 0.8 、 99.2 ± 2.8 、 201.3 ± 4.0 、 399.6 ± 4.1 ppm(平均暴露濃度 \pm 標準偏差)であった。

吸入暴露、経口投与グループの血液サンプルは、各ラットの尾静脈から採取した。血液サンプルの採取時間は、吸入暴露グループでは吸入暴露開始0、15、30、60、180、360分、吸入暴露終了後60、180、1080分、経口投与グループでは経口投与後0、15、30、60、180、360、420、540、1440分に設定した。

3-4. 結果と考察

3-4-1. 吸入暴露グループ

吸入暴露グループの各暴露濃度(50、100、200、400ppm)における吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液中 CHCl_3 濃度を Figure 5 に示した。血液中 CHCl_3 濃度は、すべての暴露濃度において吸入暴露開始前 0 分で検出されなかった。50、100ppm では、血液中 CHCl_3 濃度は吸入暴露開始 30 分まで増加し、30~360 分まで一定濃度で維持された。200ppm では、血液中 CHCl_3 濃度は吸入暴露開始 180 分まで増加し、180~360 分まで一定濃度で維持された。一方、400ppm では、血液中 CHCl_3 濃度は吸入暴露期間を通して増加した。

吸入暴露期間、血液中 CHCl_3 濃度は肺から吸収される一定に維持された CHCl_3 暴露濃度と血液-組織間の分配係数^[69] の関係に依存する。50、100、200ppm では、肺から吸収される一定に維持された CHCl_3 暴露濃度が、平衡関係に達するまで血液中 CHCl_3 濃度は増加した。平衡関係に達した後、血液中 CHCl_3 濃度は、吸入暴露が終了するまで一定濃度で維持された。Figure 5 で示したように、血液中 CHCl_3 濃度と平衡関係に達した時間は、暴露量に対応した。本研究の 50、100ppm の CHCl_3 に暴露したラットの血液中 CHCl_3 濃度は、第二章で述べた結果と第四章で述べる結果の 100ppm の CHCl_3 に暴露したラットの血液中 CHCl_3 濃度^[67,68] とほぼ同じ経時変化を示した。

低暴露濃度(50、100、200ppm)と対照的に、400ppm を暴露したラットの血液中 CHCl_3 濃度は吸入暴露期間を通して増加した。このことは 360 分間の吸入暴露期間、肺から

吸収される一定に維持された CHCl_3 暴露濃度と血液中 CHCl_3 濃度の間で平衡関係に達しなかったことを示している。400ppm では、低暴露濃度 (50、100、200ppm) に対して体内での CHCl_3 濃度がより増加したことから、400ppm の CHCl_3 蒸気を暴露したラットは、代謝の飽和があった可能性がある。以上の結果、50、100、200、400ppm の吸入暴露期間での血液中 CHCl_3 濃度とその経時変化が明確になった。

吸入暴露終了後、ラット体内に CHCl_3 が吸収されないため、血液中 CHCl_3 濃度は減少した (Figure 5)。すべての暴露濃度 (50、100、200、400ppm) において吸入暴露終了後 180 分まで血液中 CHCl_3 濃度は検出されたが、吸入暴露終了後 1080 分では検出されなかった。それらの血液中 CHCl_3 濃度は、第四章で我々が述べる結果と他の研究者が報告した血液中 CHCl_3 濃度^[61,65,67] とほぼ同じ経時変化を示した。

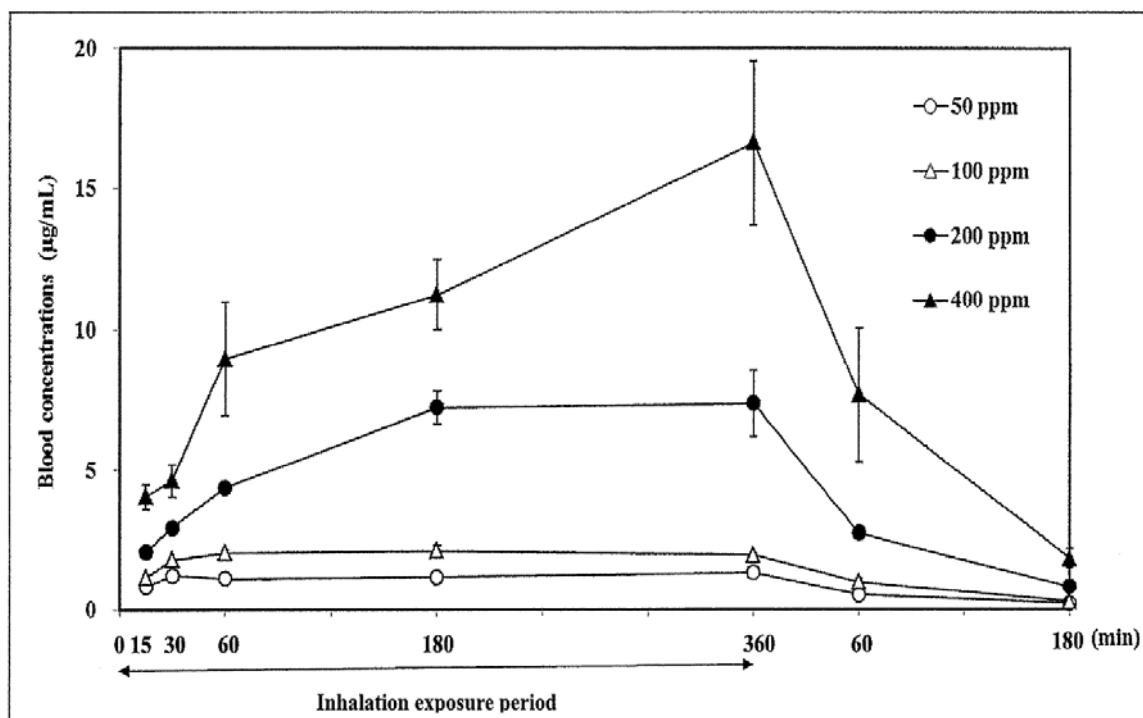


Figure 5. The concentration of CHCl_3 in the blood of rats exposed to CHCl_3 by inhalation (n=5 for each collection time point).

吸入暴露終了後の血液中 CHCl_3 濃度の半減期 (half-live: $T_{1/2}$) と吸入暴露での 0~1440

分の AUC 値 (AUC₀₋₁₄₄₀: 吸入暴露期間 360 分と吸入暴露終了後 1080 分) を Table 10 に示した。その T_{1/2} 値は 55~66 分であり、すべての暴露濃度 (50、100、200、400ppm: 公比 2) でほぼ同じ時間を示した。50ppm の AUC₀₋₁₄₄₀ 値に対する 100、200、400ppm の AUC₀₋₁₄₄₀ 値の比率は、1.62 (100/50ppm)、5.00 (200/50ppm)、9.11 (400/50ppm) であった。これらの比率は吸入暴露濃度の公比に近い値であった。

Sasso et al. ^[70] の PBPK モデルの報告は、第四章で述べる我々のデータ ^[67] を使って CHCl₃ の PBPK モデルを確認した。本研究で得られた血液中 CHCl₃ 濃度の経時変化と AUC は、更なる CHCl₃ の PBPK モデルの開発に役立つデータとなる。

Table 10. T_{1/2} and AUC of the concentration of CHCl₃ in the blood vs. time during and after exposure to CHCl₃ by inhalation.

Route	Dose (ppm)	T _{1/2} (min)	Total AUC ^a (mg/mL×min)	AUC/kg body weight ((mg/mL×min)/kg)
Inhalation	50	66	0.65 ^b	1.71 ^c
	100	65	1.05	2.76
	200	55	3.25	8.55
	400	56	5.92	15.58

^a The AUC values of the concentration of CHCl₃ in the blood from 0 to 1440 min (Total AUC₀₋₁₄₄₀: the 360 min inhalation exposure period and 1080 min following the exposure period).

^b n=5.

^c Total AUC value / average body weight (0.38 kg) of animals.

3-4-2. 時間曲線下面積 (AUC) と吸入暴露濃度の関係

AUC/kg body weight の値 (Table 10) と吸入暴露濃度の関係を Figure 6 に示した。AUC/kg body weight と吸入暴露濃度の間で、良好な相関関係 (r=0.988) が認められた。以上の結果、AUC/kg body weight と吸入暴露濃度の関係に基づいて、他の投与経路で暴露

した CHCl_3 の AUC の結果を吸入暴露等価濃度へ推定できることが明らかになった。

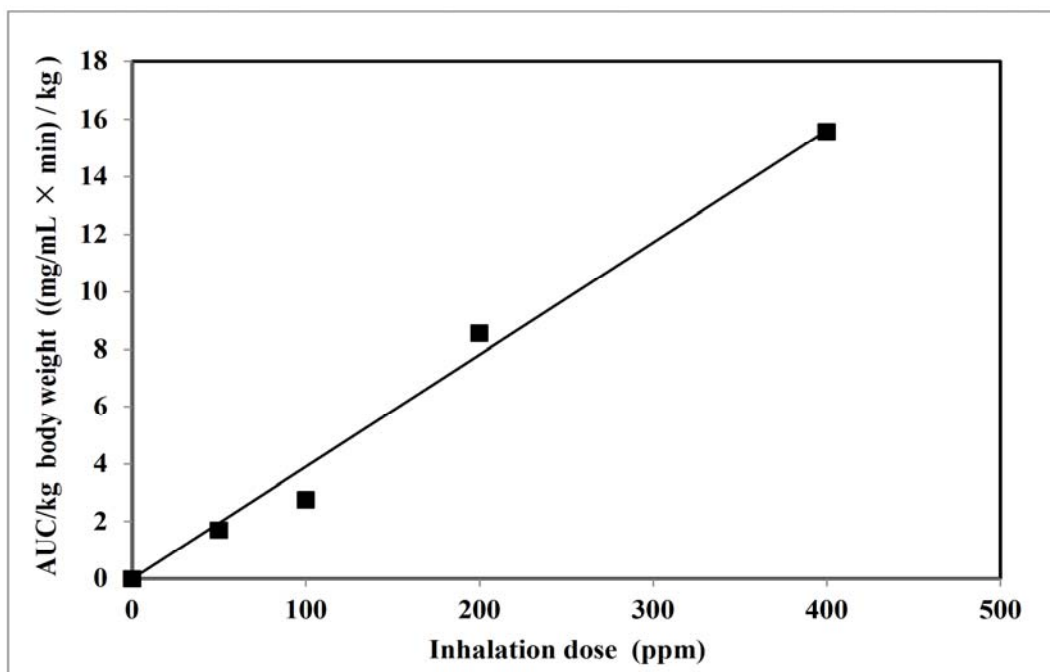


Figure 6. Relationship of the AUC/kg body weight value and the inhalation dose. The solid line has a slope of 0.0391 and an intercept of 0 to give $\text{AUC/kg body weight} = 0.0391 \times \text{inhalation dose}$. The correlation between the AUC/kg body weight values and the inhalation doses has an r of 0.988.

3-4-3. 経口投与グループ

経口投与グループの血液中 CHCl_3 濃度を Figure 7 に示した。経口投与後、血液中 CHCl_3 濃度は増加し、12.5mg/kg では経口投与後 30 分で、25、50、100mg/kg では経口投与後 60 分で最高濃度 (C_{max}) に達した。その後、すべての経口投与グループ (12.5、25、50、100mg/kg) の血液中 CHCl_3 濃度は時間とともに減少した。12.5mg/kg では経口投与後 420 分、25、50、100mg/kg では経口投与後 540 分まで、血液中 CHCl_3 濃度が検出された (血液中 CHCl_3 濃度は、経口投与開始前 0 分、経口投与後 1440 分では検出されなかった)。本研究で得られた血液中 CHCl_3 濃度は、第四章で我々が述べる結果と他の研究者が報告した血液中 CHCl_3 濃度^[61,65,67]と同様な経時変化を示した。

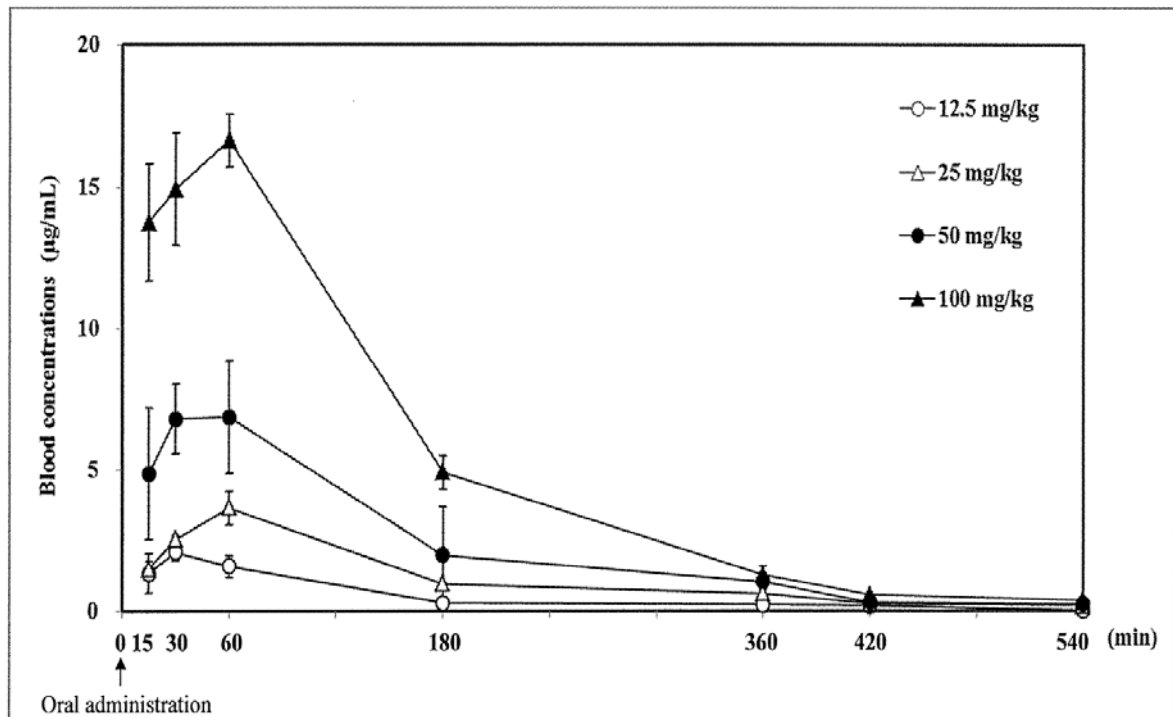


Figure 7. The concentration of CHCl₃ in the blood of rats orally administered CHCl₃ (n=5 for each collection time point).

経口投与グループの血液中 CHCl₃ 濃度の T_{1/2} 値と経口投与での 0~1440 分の AUC 値 (AUC₀₋₁₄₄₀) を Table 11 に示した。その T_{1/2} 値は 81~104 分であり、すべての経口投与用量 (12.5、25、50、100mg/kg: 公比 2) でほぼ同じ時間を示した。12.5mg/kg の AUC₀₋₁₄₄₀ 値に対する 25、50、100 mg/kg の AUC₀₋₁₄₄₀ 値の比率は、2.21 (25/12.5mg/kg)、4.39 (50/12.5mg/kg)、9.93 (100/12.5mg/kg) であった。これらの比率は経口投与用量の公比に近い値であった。

Table 11. $T_{1/2}$ and AUC of the concentration of $CHCl_3$ in the blood vs. time after oral administration of $CHCl_3$.

Route	Dose (mg/kg)	$T_{1/2}$ (min)	Total AUC ^a (mg/mL×min)
Oral administration	12.5	99	0.28 ^b
	25	104	0.62
	50	93	1.23
	100	81	2.78

^a The AUC values of the concentration of $CHCl_3$ in the blood from 0 to 1440 min.

^b n=5.

3-4-4. 他の投与経路でのクロロホルムの吸入暴露等価濃度

Figure 6 に示した AUC/kg body weight の値と吸入暴露濃度の関係に基づいて、本研究で実施した経口投与グループの吸入暴露等価濃度を下記に示した計算式から推定した。

計算式:「吸入暴露等価濃度 = AUC/kg body weight の値/0.0391」

経口投与グループの吸入暴露等価濃度は、12.5mg/kg では 19ppm、25mg/kg では 42ppm、50mg/kg では 83ppm、100mg/kg では 187ppm と推定できた (Table 12)。

Wang et al.^[61] の研究は、コーン油に溶解した $CHCl_3$ を 100、200、400mg/kg の投与用量をラットに経口投与または腹腔内投与し、血液中 $CHCl_3$ 濃度の AUC 値を報告した。Wang et al. の研究の 100mg/kg の経口投与の吸入暴露等価濃度は、240ppm と推定できた (Table 12)。この推定した吸入暴露等価濃度は、本研究の経口投与グループの 100mg/kg と近い値であった。

更に、Wang et al.^[65] の研究は、コーン油に溶解した $CHCl_3$ を 100、200、400mg/kg の投与用量で経口投与し、投与前日、餌を与えたラットと絶食したラットの血液中 $CHCl_3$ 濃度の AUC 値を報告した。Wang et al. の研究の 100mg/kg の吸入暴露等価濃度は、餌を与えたラットで 275ppm、絶食したラットで 183ppm と推定できた (Table 12)。

餌を与えたラットと絶食したラットを比較した場合、絶食したラットは胃に内容物が存在しないため、体内への化学物質の吸収はより速く、絶食したラットは餌を与えた動物に比べ肝臓でより高い CHCl_3 の代謝を促進する^[65]。従って、絶食したラットの AUC 値は、餌を与えたラットより血液中濃度は低値を示すが、本研究での経口投与グループのラットに投与前日、餌を与えた 100mg/kg の吸入暴露等価濃度は 187ppm で、Wang et al.^[65] の研究の絶食した 100 mg/kg の吸入暴露等価濃度 (183ppm) に近い値を示した。この異なった結果は動物種、飼育環境等の要因の変化であると考えられた。従って、他の暴露経路を吸入暴露等価濃度に推定する場合、動物種、飼育環境等の要因の変化を最小限にする必要がある。

第四章で我々が述べる研究では、水に溶解した CHCl_3 を 55mg/kg の投与用量でラットに経口投与し、血液中 CHCl_3 濃度の AUC 値を報告した^[67]。その研究の 55mg/kg の吸入暴露等価濃度は 76ppm と推定できた (Table 12)。この推定した吸入暴露等価濃度は、本研究の 50mg/kg の経口投与グループと近い値であった。

Wang et al.^[61,65] の研究の 200、400mg/kg の推定した吸入暴露等価濃度は、本研究で得られた「AUC/kg body weight の値と吸入暴露濃度」の関係カーブの範囲を超えていたため、Wang et al.の研究データから推定した吸入暴露等価濃度は参考値とした。吸入暴露等価濃度は AUC/kg body weight の値と 50~400ppm の吸入暴露濃度の相関関係に基づいて推定した。なぜなら、400ppm の吸入暴露濃度では、ラット体内での CHCl_3 の代謝、排泄における遅延が起きた可能性があるため、400ppm を超える吸入暴露濃度と AUC/kg body weight の値の関係は成立しないと考えた。従って、他の投与経路における吸入暴露等価濃度の推定は、400ppm の吸入暴露濃度を超えると推定できない可能性がある。

参考として、Wang et al.^[61,65] の研究の経口投与と腹腔内投与における 400mg/kg の推定した吸入暴露等価濃度は、彼らの研究での経口投与と腹腔内投与 100mg/kg^[61,65]、第四章で我々が述べる経口投与 55mg/kg^[67] に対して、投与用量の公比以上に高値であった (Table 12)。この高値の要因として、100mg/kg より高用量の 400mg/kg の CHCl_3 を経口投与、腹腔内投与したラット体内では、 CHCl_3 の代謝とクリアランスに遅延が生じたことが示唆され

た。

Withey et al.^[66]の研究では、ベジタブルオイルに溶解したCHCl₃を75mg/kgの投与用量でラットに経口投与し、血液中CHCl₃濃度のAUC値を報告した。Withey et al.の研究の75mg/kgの吸入暴露等価濃度は、13ppmと推定できた(Table 12)。この値は、本研究の結果よりかなり低い値であった。この結果は動物種、投与溶媒、飼育環境等の要因の違いによることが考えられる。

第四章で我々が述べる研究^[67]では、6時間、100ppmのCHCl₃に吸入暴露したラットのAUC/kg body weightの値から推定した吸入暴露等価濃度は、50ppmであった(Table 12)。この結果は、使用した動物の種の違いに起因するかもしれない。しかしながら、本研究での100ppmのAUC/kg body weightの値は、2.76mg/mL・min/kg body weight (Table 1)で計算した場合((1.96mg/mL・min/kg body weight × 100ppm) / (2.76mg/mL・min/kg body weight) = 71ppm)、71ppmと推定された。従って、本研究結果と第四章で我々が述べる研究結果^[67]は比較的、近い値を示した。

Wang et al.^[61,65]の研究は、CHCl₃の吸入暴露終了後に得られたAUCも報告している。しかし、吸入暴露期間と吸入暴露終了後のデータを集めた本研究と第四章で我々が述べる研究^[67]とは異なり、Wang et al.の研究は吸入暴露終了後のデータだけであり、総AUCに関わる情報がなかった。従って、吸入暴露等価濃度に関して、Wang et al.の結果と本研究の結果を比較することはできなかった。

Table 12. Inhalation equivalent doses for CHCl₃ administered by other routes.

	Route	Solvent	Rats		Dose (mg/kg)	AUC/kg (mg/mL×min/kg)	Inhalation equivalent dose (ppm)
			(Strain)	(kg) ^a			
This study	Oral administration	Corn oil	SD	0.38	12.5	0.74	19
				(Fed)	25	1.63	42
					50	3.24	83
					100	7.32	187
Wang et al. ^[64]	Oral administration	Corn oil	Wistar	0.26	100	9.37	240
					200	34.72	888 ^b
					400	177.72	4545 ^b
	Intraperitoneally	Corn oil		0.26	100	15.98	409 ^b
					200	64.20	1642 ^b
					400	241.92	6187 ^b
Wang et al. ^[65]	Oral administration	Corn oil	Wistar	0.26	100	10.75	275
				(Fed)	200	37.20	951 ^b
					400	120.13	3073 ^b
		Corn oil		0.26	100	7.16	183
				(Fasting)	200	25.90	662 ^b
					400	105.53	2699 ^b
	Intraperitoneally	Corn oil		0.26	100	17.08	437 ^b
				(Fed)	200	68.06	1741 ^b
					400	168.08	4299 ^b
		Corn oil		0.26	100	15.98	409 ^b
				(Fasting)	200	49.60	1268 ^b
					400	147.14	3763 ^b
Withey et al. ^[66]	Oral administration	Vegetable oil	Wistar	0.40	75	0.50	13
		Water			75	4.35	111
Take et al. ^[67]	Oral administration	Water	F344	0.265	55	2.98	76
	Inhalation (6hr)	–				100 ppm	1.96

^a Average body weight.

^b Extrapolated value (The value was larger than the range of the curve in Figure 6).

ヒトでは、様々な投与経路(摂取、吸入、皮膚吸収等)で CHCl₃ に暴露される可能性があるため^[26,27]、投与経路が CHCl₃ の毒性に、どのような影響を及ぼすか理解することが重要

である。毒性を評価する方法の 1 つとして、体内での蓄積を反映する本研究の AUC データは、異なる経路で暴露された CHCl_3 の毒性を比較することを可能にした。1 つの投与経路で暴露された CHCl_3 の体内への蓄積に起因する毒性は、他の投与経路で暴露された CHCl_3 の体内への蓄積に起因する毒性とは異なる。従って、本研究は暴露によるヒトへのリスクアセスメントと CHCl_3 のような化学物質の規制のために重要な情報である。

本研究は吸入暴露での AUC データを得るために、吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液中 CHCl_3 濃度を測定した。「吸入暴露濃度と AUC/kg body weight の値」の関係に基づいて、他の投与経路の AUC を吸入暴露等価濃度に推定した。最後に、吸入暴露期間のデータが少ないため、吸入暴露期間を通じた総 AUC を得ることで投与量の効果を明らかにすることができた。

3-5. 結論

本研究の目的は吸入暴露による総 AUC の値を得ることであった。吸入暴露での総 AUC データを得るために、吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液の CHCl_3 濃度を測定した。吸入暴露経路での総 AUC を決定することが CHCl_3 の投与経路と投与量の間関係を調査するために重要である。本研究は 50、100、200、400ppm の CHCl_3 吸入暴露濃度と AUC に基づく、「吸入暴露濃度と AUC/kg body weight」に相関関係を得た。この関係に基づいて、 CHCl_3 を経口投与した研究で得られた総 AUC から、吸入暴露等価濃度を計算した。計算した吸入暴露等価濃度は体内蓄積に反映する AUC を用いるため、異なる投与経路で暴露された CHCl_3 の影響を直接、比較することができた。最後に、本研究で得た吸入暴露と経口投与による血液中濃度、AUC の結果は、げっ歯類の動物での CHCl_3 の PBPK モデルとして重要なデータになる。

本章に関する内容について以下の論文発表を行っている。

Take, M.; Takeuchi, T.; Haresaku, M.; Matsumoto, M.; Nagano, K.; Yamamoto, S.;
Takamura-Enya, T.; Fukushima, S.

Estimation of chloroform inhalation dose by other routes based on the relationship of area under the blood concentration-time curve (AUC)-inhalation dose to chloroform distribution in the blood of rats.

J. Environ. Sci. Health Pt. A, **2014**, *49*, 253-261.

第四章

クロロホルムの血液、組織中濃度と

安定同位体を用いた複数投与による各投与経路の体内動態

4-1. はじめに

第四章では、第二、三章で述べた CHCl_3 について、血液中濃度の経時変化と血液の AUC に加え、各組織中濃度の経時変化と各組織の AUC を求めた。

更に、複数投与による各投与経路での血液、組織中濃度の経時変化と AUC を求めるため、ラットに吸入暴露(CHCl_3)と経口投与(CHCl_3 の安定同位体)し、MS を用いて複数投与による各投与経路での体内動態を把握した。それらの結果と単独吸入暴露または単独経口投与した血液、組織中濃度と AUC を比較した結果について述べる。

本章は 5 節からなる。4-2 では「研究の基本方針」、4-3 では「試験計画」、4-4 では「結果と考察」、4-5 では「結論」について述べる。

4-2. 研究の基本方針

本研究は、 CHCl_3 について複数投与による各投与経路での血液、組織中濃度の経時変化と AUC を把握するため、ラットに吸入暴露(CHCl_3)と経口投与(CHCl_3 の安定同位体)を用いて実施した。

CHCl_3 を用いた 2 年間の動物実験において吸入暴露^[28]、経口投与^[29,30] でラットとマウスに腎臓腫瘍の発生が観察された。更に、ラットを使用した 2 年間の複数投与(吸入暴露+経口投与)研究でも、腎臓で CHCl_3 毒性と腫瘍が著しい発生が認められ、この研究では単独投与に対して、複数投与での CHCl_3 投与影響が腎臓毒性と発がん性に更なる影響があったと報告している^[31]。単独投与経路による化学物質の影響に対して複数投与経路による影響は、累積効果と異なる場合があると米国合衆国環境保護庁 (United States Environmental Protection Agency) が提示している^[71]。

単独投与経路による CHCl_3 の体内動態研究に関しては、血液中濃度^[61,66,68,72,73]、血液と組織中濃度^[74,75] の分布、PBPK モデル^[76] などの報告がある。しかしながら、複数投与による各投与経路の体内動態の報告はない。従って、血液、組織中 CHCl_3 濃度の複数投与

による各投与経路の分布を調査することも重要な研究課題である。

本研究は、複数投与による各投与経路の体内分布を調査するため、吸入暴露は CHCl_3 、経口投与は CHCl_3 の安定同位体 (CDCl_3) を用いて動物に投与した。血液、組織サンプルは、MS で CHCl_3 と CDCl_3 の異なるフラグメントピークを設定し、測定した。本研究は、 CHCl_3 の複数投与での各投与経路の分布を調査した最初の報告である。

4-3. 試験計画

単独吸入暴露試験、単独経口投与試験、複数投与(吸入暴露+経口投与)試験の研究を実施するために試験計画を立案した。

動物は、135 匹を使用し、単独吸入暴露、単独経口投与、複数投与の各グループ 45 匹のラットを分けた(各採取時間で 5 匹の動物からサンプルを採取した)。

単独吸入暴露グループは、第二章で述べた開発した吸入暴露装置を用いて CHCl_3 蒸気に最大 360 分、動物に暴露した^[73]。 CHCl_3 蒸気は、発生器を用いて液体 CHCl_3 を循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のバブリングにより液体 CHCl_3 を蒸発させ発生し、100ppm の暴露濃度に設定した。この暴露濃度は、当センターで複数投与による 2 年間の発がん性試験を実施し、Nagano. et al.^[31] が報告した 100ppm の CHCl_3 暴露濃度に設定した。

単独経口投与グループは、水で溶解した CDCl_3 を 1000ppm(w/w) の溶液に調製し、投与用量 55mg/kg body weight でラットに経口投与した。この投与用量は、当センターで複数投与による 2 年間の発がん性試験を実施し、Nagano. et al.^[31] が報告した CHCl_3 の 1 日の平均摂水量に設定した。

複数投与グループは、水で溶解した CDCl_3 を 1000ppm(w/w) の溶液に調製し、投与用量 55mg/kg body weight(単独経口投与グループと同じ投与用量)でラットに経口投与した。直ぐに吸入暴露装置に動物を収容し、最大 360 分、100ppm の CHCl_3 蒸気(単独吸入暴露グループと同じ吸入暴露濃度)を暴露した(Figure 8)。100ppm に設定した吸入暴露装置での実際の CHCl_3 暴露濃度(平均暴露濃度 ± 標準偏差)は、 100.3 ± 0.99 ppm(単独吸入暴露

グループ)、 100.4 ± 1.62 ppm (複数投与グループの吸入暴露経路)であった。

血液サンプルは各ラットの尾静脈から採取した後、すぐにエーテル麻酔下で解剖し、組織サンプル(肝臓、腎臓、脂肪)を採取した。吸入暴露経路の血液、組織サンプルの採取時間は、吸入暴露開始 0、15、30、60、180、360 分と吸入暴露終了後 30、120、1080 分に設定した。経口投与経路の血液、組織サンプルの採取時間は、経口投与後 0、15、30、60、180、360、390、480、1440 分に設定した。

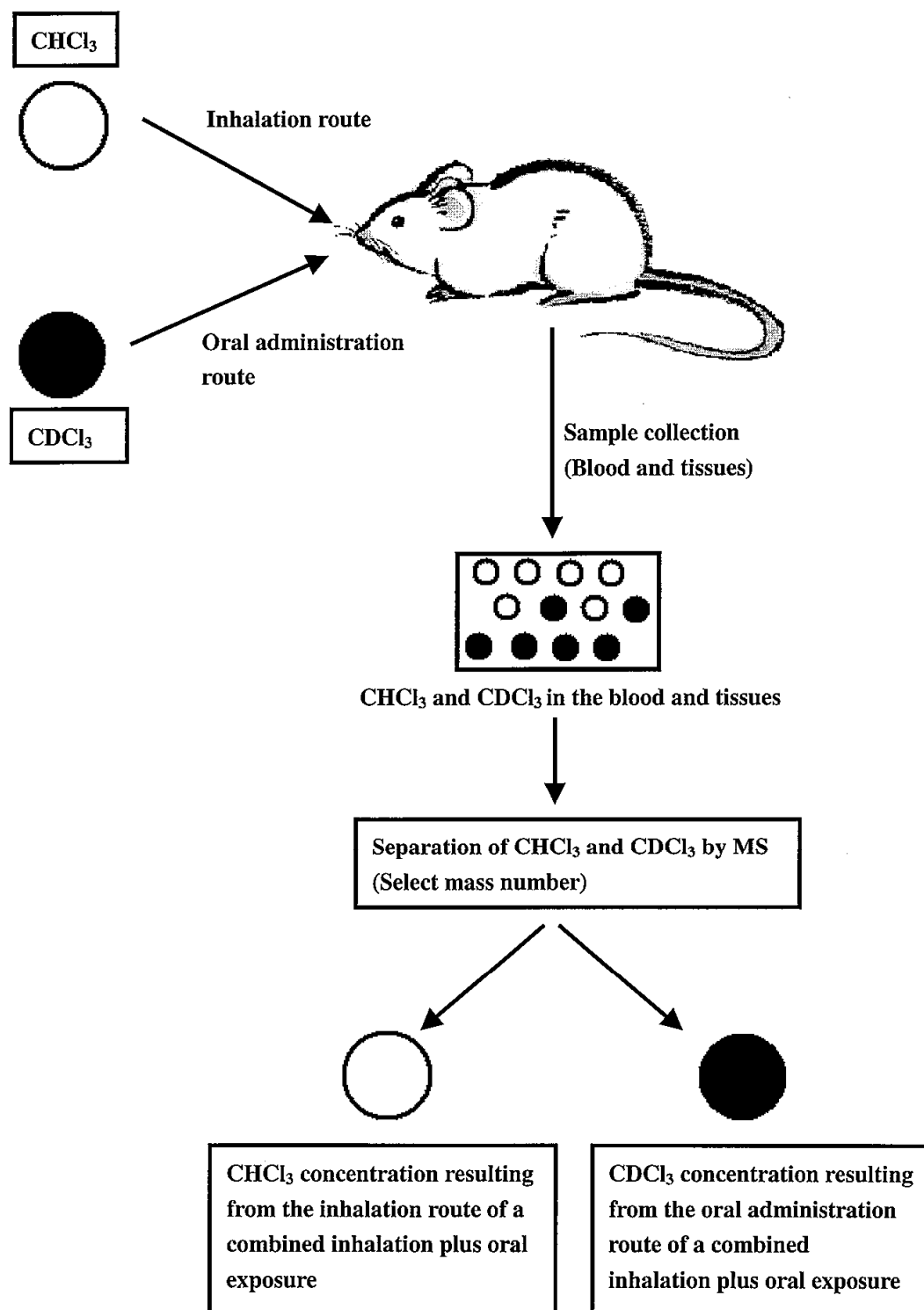


Figure 8. Following the chloroform delivered by inhalation (CHCl_3) and the chloroform delivered orally (CDCl_3) when chloroform is administered simultaneously by inhalation and oral gavage.

4-4. 結果と考察

4-4-1. 単独吸入暴露グループ

血液、各組織(肝臓、腎臓、脂肪)中 CHCl_3 濃度は吸入暴露開始前 0 分で検出されなかった。吸入暴露期間、血液、肝臓、腎臓中 CHCl_3 濃度は、吸入暴露開始 30 分後まで増加し、30~360 分まで一定濃度で維持した(Table 13)。吸入暴露終了後、血液、肝臓、腎臓中 CHCl_3 濃度は時間とともに減少し、 CHCl_3 は吸入暴露終了後 120 分まで検出されたが、1080 分では検出されなかった。

吸入暴露期間、血液、肝臓、腎臓中 CHCl_3 濃度の分布は、血液-組織間の分配係数^[69]の関係に依存する。この期間中、各組織中 CHCl_3 濃度は肝臓の代謝によって減少する^[76-79]が、肝臓から減少した CHCl_3 は吸入暴露により、血液から輸送される CHCl_3 で補充され、一定濃度に維持される。吸入暴露期間、血液、肝臓、腎臓中 CHCl_3 濃度は肺から吸収され、一定に維持された CHCl_3 暴露濃度が、平衡関係に達するまで血液、肝臓、腎臓中 CHCl_3 濃度は増加した。肺から吸収され、一定に維持された CHCl_3 暴露濃度と血液中 CHCl_3 濃度が一定濃度に達すると各組織中 CHCl_3 濃度は吸入暴露が終了するまで一定濃度で維持された。この経時変化は、第二章で述べた血液中 CHCl_3 濃度^[10]と同様な経時変化を示した。吸入暴露終了後、ラット体内に CHCl_3 が吸収されないため、血液、肝臓、腎臓中 CHCl_3 濃度は減少した。

対照的に、脂肪中 CHCl_3 濃度は、吸入暴露期間を通して増加した(Table 13)。このことは CHCl_3 の高い脂溶性により、血液-脂肪分配係数によって血液で平衡に達するまで、脂肪中 CHCl_3 濃度が増加する^[3,4,76]。吸入暴露終了後、ラット体内に CHCl_3 が吸収されないため、脂肪中 CHCl_3 濃度も減少し、 CHCl_3 は吸入暴露終了後 120 分まで検出されたが、1080 分では検出されなかった。

4-4-2. 単独経口投与グループ

血液、各組織(肝臓、腎臓、脂肪)中 CDCl_3 濃度は経口投与開始前 0 分で検出されなかった。経口投与後、血液、各組織中 CDCl_3 濃度は増加し、経口投与後 30 分で C_{max} に達した後、時間とともに減少した(Table 14)。血液、各組織中 CDCl_3 濃度は経口投与後 480 分まで検出されたが、1440 分では検出されなかった。血液、各組織中 CDCl_3 濃度の経時変化は、血液-組織の分配係数^[69] の関係に依存し、血液、各組織中 CDCl_3 濃度とほぼ同じ経時変化を示した。

この血液中 CDCl_3 濃度の経時変化は、我々の研究^[80]、Wang et al.^[61] の研究で報告した経口投与における血液中 CHCl_3 濃度と同様な経時変化を示し、 CDCl_3 と CHCl_3 は化学的性質に関して相違ないことから、本研究で使用したラットでの CDCl_3 の体内動態は CHCl_3 と同じ動態を示すと結論できた。

4-4-3. 複数投与(吸入暴露+経口投与)グループ

<複数投与グループの吸入暴露経路>

血液、各組織(肝臓、腎臓、脂肪)中 CHCl_3 濃度は吸入暴露開始前 0 分と吸入暴露終了後 1080 分で検出されなかった。複数投与グループの吸入暴露経路の血液、各組織中 CHCl_3 濃度の経時変化は単独吸入暴露グループとほぼ同じ経時変化を示した(Table 13)。しかしながら、このグループでの各組織中 CHCl_3 濃度は、単独吸入暴露グループより高い濃度を示した採取時間があった。

それらの 2 つのグループの間の CHCl_3 濃度に関して有意差があった採取時間と%比(複数投与グループの吸入暴露経路/単独吸入暴露グループ $\times 100$)は、肝臓で吸入暴露期間 180 分(136%)、吸入暴露終了後 30 分(189%)、120 分(272%)、腎臓で吸入暴露期間 360 分(165%)、吸入暴露終了後 30 分(193%)、120 分(388%)、脂肪で吸入暴露期間 180 分(151%)、360 分(149%)、吸入暴露終了後 30 分(185%)、120 分(257%)(Table 13)で単独吸入暴露グループ対して、複数投与グループの吸入暴露経路で有意に高値を示した。

<複数投与グループの経口投与経路>

血液、各組織(肝臓、腎臓、脂肪)中 CDCl_3 濃度は、経口投与開始前 0 分と経口投与後 1440 分で検出されなかった。複数投与グループの経口投与経路の血液、各組織中 CDCl_3 濃度の経時変化は、単独経口投与グループと同じ経時変化を示した(Table 14)。血液、各組織中 CDCl_3 濃度の C_{max} は経口投与後 30 分、その後、 CDCl_3 濃度は時間とともに減少し、経口投与後 480 分まで血液、各組織中に CDCl_3 が検出された。しかしながら、このグループでの血液と各組織中 CDCl_3 濃度は、単独経口投与グループより高い濃度を示した採取時間があった。

それらの2つのグループの間の CDCl_3 濃度に関する有意差があった採取時間と%比(複数投与グループの経口投与経路/単独経口投与グループ $\times 100$)は、血液で経口投与後 30 分(122%)、肝臓で経口投与後 30 分(173%)、60 分(154%)、180 分(214%)、360 分(188%)、390 分(178%)、480 分(363%)、腎臓で経口投与後 30 分(218%)、60 分(247%)、180 分(220%)、360 分(235%)、390 分(231%)、480 分(200%)、脂肪で経口投与後 60 分(151%)、180 分(200%)、360 分(380%)、390 分(338%)、480 分(331%) (Table 14)で単独経口投与グループに対して、複数投与グループの経口投与経路で有意に高値を示した。

Table 13. CHCl₃ concentrations (mean ± SD) in the blood and tissues at each collection time point by inhalation route.

	Collection time						
	During exposure period					After end of exposure period	
	15	30	60	180	360	30	120 (min)
Inhalation route							
Blood (µg/mL)							
Inhalation alone administration group							
	0.184±0.024 ^a	1.062±0.335	1.072±0.234	1.258±0.168	1.022±0.113	0.552±0.159	0.148±0.052
Combined inhalation plus oral administration group							
	0.212±0.019	1.182±0.180	1.164±0.210	1.190±0.190	0.854±0.197	0.528±0.111	0.128±0.089
	(115%) ^b	(111%)	(109%)	(95%)	(84%)	(96%)	(86%)
Liver (µg/g)							
Inhalation alone administration group							
	0.134±0.046	0.568±0.137	0.730±0.262	0.758±0.204	0.690±0.105	0.220±0.037	0.040±0.016
Combined inhalation plus oral administration group							
	0.184±0.054	0.752±0.286	0.848±0.215	1.028±0.147 [*]	0.908±0.385	0.416±0.078 [*]	0.109±0.028 [*]
	(137%)	(132%)	(116%)	(136%)	(132%)	(189%)	(273%)
Kidney (µg/g)							
Inhalation alone administration group							
	0.084±0.046	0.454±0.105	0.518±0.222	0.520±0.137	0.376±0.009	0.134±0.005	0.016±0.009
Combined inhalation plus oral administration group							
	0.104±0.061	0.478±0.253	0.612±0.197	0.630±0.081	0.620±0.205 [*]	0.258±0.108 [*]	0.062±0.023 [*]
	(124%)	(105%)	(118%)	(121%)	(165%)	(193%)	(388%)
Abdominal fat (µg/g)							
Inhalation alone administration group							
	1.048±0.416	4.218±1.517	6.064±1.481	10.434±2.397	11.882±0.955	6.268±1.935	1.362±0.913
Combined inhalation plus oral administration group							
	1.124±0.539	3.678±1.163	7.338±2.487	15.742±2.263 [*]	17.702±0.956 [*]	11.566±3.006 [*]	3.504±1.080 [*]
	(107%)	(87%)	(121%)	(151%)	(149%)	(185%)	(257%)

^{*} Significantly different from the inhalation alone administration group (p ≤ 0.05).

^a mean ± S.D. (n=5 for each collection time/group).

^b % (CHCl₃ concentration in the blood or each tissue of combined inhalation plus oral administration group / CHCl₃ concentration in the blood or each tissue of inhalation alone administration group × 100).

Table 14. CDCl_3 concentrations (mean \pm SD) in the blood and tissues at each collection time point by oral administration route.

	Collection time						
	After oral administration						
	15	30	60	180	360	390	480 (min)
Oral administration route							
Blood ($\mu\text{g/mL}$)							
Oral alone administration group							
	4.526 \pm 0.858 ^a	6.660 \pm 0.709	4.652 \pm 1.103	0.970 \pm 0.085	0.222 \pm 0.111	0.146 \pm 0.054	0.094 \pm 0.066
Combined inhalation plus oral administration group							
	3.812 \pm 0.555 (84%) ^b	8.098 \pm 0.877 [*] (122%)	6.160 \pm 1.923 (132%)	1.536 \pm 1.156 (158%)	0.352 \pm 0.180 (159%)	0.198 \pm 0.063 (136%)	0.103 \pm 0.051 (110%)
Liver ($\mu\text{g/g}$)							
Oral alone administration group							
	2.858 \pm 0.603	7.006 \pm 2.834	2.800 \pm 0.285	0.402 \pm 0.115	0.120 \pm 0.010	0.072 \pm 0.035	0.016 \pm 0.005
Combined inhalation plus oral administration group							
	3.294 \pm 0.836 (115%)	12.146 \pm 1.852 [*] (173%)	4.304 \pm 1.193 [*] (154%)	0.862 \pm 0.163 [*] (214%)	0.226 \pm 0.050 [*] (188%)	0.128 \pm 0.033 [*] (178%)	0.058 \pm 0.040 [*] (363%)
Kidney ($\mu\text{g/g}$)							
Oral alone administration group							
	1.438 \pm 0.551	3.562 \pm 1.349	1.298 \pm 0.438	0.220 \pm 0.073	0.046 \pm 0.005	0.026 \pm 0.005	0.012 \pm 0.004
Combined inhalation plus oral administration group							
	2.018 \pm 0.606 (140%)	7.766 \pm 0.838 [*] (218%)	3.208 \pm 1.014 [*] (247%)	0.484 \pm 0.076 [*] (220%)	0.108 \pm 0.022 [*] (235%)	0.060 \pm 0.023 [*] (231%)	0.024 \pm 0.009 [*] (200%)
Abdominal fat ($\mu\text{g/g}$)							
Oral alone administration group							
	20.820 \pm 8.377	50.402 \pm 29.659	44.402 \pm 12.773	11.462 \pm 2.640	2.086 \pm 1.050	1.252 \pm 0.875	0.550 \pm 0.299
Combined inhalation plus oral administration group							
	26.506 \pm 10.378 (127%)	85.510 \pm 23.148 (170%)	67.240 \pm 8.920 [*] (151%)	22.872 \pm 2.985 [*] (200%)	7.920 \pm 5.144 [*] (380%)	4.236 \pm 1.438 [*] (338%)	1.818 \pm 0.851 [*] (331%)

* Significantly different from the oral alone administration group ($p \leq 0.05$).

^a mean \pm S.D. (n=5 for each collection time/group).

^b % (CDCl_3 concentration in the blood or each tissue of combined inhalation plus oral administration group / CDCl_3 concentration in the blood or each tissue of oral alone administration group $\times 100$).

血液、各組織中 CHCl_3 、 CDCl_3 濃度の 0~480 分の AUC (AUC_{0-480}) 値を Table 15 に示した。複数投与グループの各投与経路の肝臓、腎臓、脂肪の AUC_{0-480} 値は、単独投与グループより高かった。

吸入暴露経路で、単独吸入暴露グループに対する複数投与グループの吸入暴露経路の AUC_{0-480} 値の比率は、0.95 (血液)、1.34 (肝臓)、1.33 (腎臓)、1.50 (脂肪) であった。経口投与経路で、単独経口投与グループに対する複数投与グループの経口投与経路の AUC_{0-480} 値の比率は、1.32 (血液)、1.66 (肝臓)、2.23 (腎臓)、1.76 (脂肪) であった。すべてのグループでの脂肪の AUC 値は血液と他の組織に比べ高く、その AUC の値は脂肪-血液の分配係数に反映した結果であった [3,4,76]。

以上の結果、考慮する項目として、腎臓の単独経口投与グループに対する複数投与グループの経口投与経路の AUC_{0-480} 値の比率が、2.23 倍であり、血液 (1.32 倍)、肝臓 (1.66 倍)、脂肪 (1.76 倍) より高かったことである。このことは、当センターで実施した Nagano et al. [31] の複数投与の研究結果におけるラット腎臓の腫瘍発生の顕著な増加と関連するかもしれない。

Table 15. AUC of CHCl₃ and CCl₄ in the blood and tissues.

Group name		AUC ₀₋₄₈₀	
		Inhalation route (CHCl ₃)	Oral administration route (CCl ₄)
Blood	Inhalation alone administration	443 ^{a, b}	—
	Oral alone administration	—	748
	Combined inhalation plus oral administration	422 (0.95) ^c	986 (1.32)
Liver	Inhalation alone administration	271 ^d	—
	Oral alone administration	—	488
	Combined inhalation plus oral administration	363 (1.34)	809 (1.66)
Kidney	Inhalation alone administration	177	—
	Oral alone administration	—	240
	Combined inhalation plus oral administration	236 (1.33)	534 (2.23)
Abdominal fat	Inhalation alone administration	3815	—
	Oral alone administration	—	6815
	Combined inhalation plus oral administration	5720 (1.50)	11963 (1.76)

^a Values represent AUC₀₋₄₈₀ of the mean concentration at each collection time.

^b µg/mL × min.

^c Values represent ratio of AUC₀₋₄₈₀ value of combined inhalation plus oral administration to inhalation alone administration or oral alone administration group.

^d µg/g × min.

複数投与グループによる各投与経路の体内動態を把握できたことで、体内での CHCl₃ の組織への分布の関連性が明らかになった。経口投与経路では動物に水で溶解した CCl₄ を直接、胃の中に投与するため、CCl₄ は胃粘膜を通して吸収されて、最初に血液によって肝臓に輸送された後、他の組織に分布する。CCl₄ は比較的早い時間(経口投与後 30 分)に C_{max} に達し、その後、体内の CCl₄ は、代謝、排泄により減少した。一方、吸入暴露経路では、動物に CHCl₃ 蒸気を連続的(360 分間)に肺から体内に吸収し、血液に運搬されて他の組織に分布される。この吸入暴露期間では肺から吸収される一定に維持された CHCl₃ 暴露濃度が体内に吸収されるため、肺-血液間と血液-組織間で一定濃度で維持される。ま

た、吸入暴露期間、脂肪に関しては血液-脂肪間の分配比が平衡関係に達するまで CHCl_3 の蓄積が増加した。

複数投与グループの投与影響として、吸入暴露経路から CHCl_3 蒸気が常にラット体内に吸収されるため、経口投与経路での体内に吸収された CDCl_3 の肺からの排泄が妨げられ、組織の CDCl_3 の排泄に遅延が生じた可能性がある。単独経口投与グループに対して複数投与グループの経口投与経路での高い肝臓、腎臓中 CDCl_3 濃度は、代謝、排泄による CDCl_3 の除去機能に影響を及ぼし、単独吸入暴露グループに対して複数投与グループの吸入暴露経路による肝臓、腎臓で高い CHCl_3 濃度を示した採取時間があった。

4-4-4. クロロホルムの分配係数の比率と投与経路の関係

Gargas et al.^[4] の研究に基づいた CHCl_3 の分配係数は、血液:20.8、肝臓:21.1、脂肪:203 であった。血液の分配係数を 1 としたときの比率は、肝臓/血液:1.01、脂肪/血液:9.76 であった。吸入暴露経路での分配係数と各採取時間における血液中 CHCl_3 濃度に対する各組織中 CHCl_3 濃度の比率を Table 16、経口投与経路での分配係数と各採取時間における血液中 CDCl_3 濃度に対する各組織中 CDCl_3 濃度の比率を Table 17 に示した。

単独吸入暴露グループでは、肝臓/血液の CHCl_3 濃度の比率は 0.24~0.73 あり、肝臓/血液の分配係数の比率より低値であった。対照的に、脂肪/血液の CHCl_3 濃度の比率は 3.97~11.61 であり、脂肪/血液(9.76)の分配係数の比率より高値を示した採取時間(吸入暴露開始 360 分と吸入暴露終了後 30 分)があった(Table 16)。

複数投与グループの吸入暴露経路では、肝臓/血液の CHCl_3 濃度の比率は 0.64~1.06、脂肪/血液の CHCl_3 濃度の比率は 3.11~27.58 であり、肝臓/血液(1.01)、脂肪/血液(9.76)の分配係数の比率より高値を示した採取時間(肝臓:吸入暴露開始 360 分、脂肪:吸入暴露開始 180 分~吸入暴露終了後 120 分)があった。単独吸入暴露グループに対して複数投与グループの吸入暴露経路の肝臓/血液の CHCl_3 濃度の比率は、すべての採取時間で高値、脂肪/血液の CHCl_3 濃度の比率は、吸入暴露開始 180 分~吸入暴露終了後 120 分で高値、

腎臓/血液の CHCl_3 濃度の比率は、吸入暴露開始 30 分を除く、すべての採取時間で高値であった (Table 16)。これらの結果は、複数投与の影響であると示唆される。

Table 16. Ratios of the blood and tissues partition coefficients and the ratios of the concentrations of CHCl_3 in the blood and tissues by inhalation route.

	Partition coefficient (Ratio)		Collection time						
			During exposure period					After end of exposure period	
			15	30	60	180	360	30	120 (min)
Inhalation alone administration group									
Blood	20.8 ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Liver	21.1	1.01 ^b	0.73 ^c	0.53	0.68	0.60	0.68	0.40	0.27
Abdominal fat	203	9.76	5.70	3.97	5.66	8.29	11.63	11.36	9.20
Kidney	—	—	0.46	0.43	0.48	0.41	0.37	0.24	0.11
Combined inhalation plus oral administration group									
Inhalation route									
Blood	20.8	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Liver	21.1	1.01	0.87	0.64	0.73	0.86	1.06	0.79	0.77
Abdominal fat	203	9.76	5.30	3.11	6.30	13.23	20.73	21.83	27.58
Kidney	—	—	0.49	0.40	0.53	0.53	0.73	0.49	0.48

^a Gargas et al. [4]

^b Partition coefficient value of the liver or abdominal fat / the partition coefficient value of the blood.

^c Mean concentration in the liver, abdominal fat, or kidney (n=5) / mean concentration in the blood (n=5).

単独経口投与グループでは、肝臓/血液の CDCl_3 濃度の比率は 0.17~1.05、脂肪/血液の CDCl_3 濃度の比率は 4.60~11.82 であり、肝臓/血液 (1.01)、脂肪/血液 (9.76) の分配係数の比率より高値を示した採取時間 (肝臓: 経口投与後 30 分、脂肪: 経口投与後 180 分) があつた (Table 17)。

複数投与グループの経口投与経路では、肝臓/血液の CDCl_3 濃度の比率は 0.56~1.50、脂肪/血液の CDCl_3 濃度の比率は 6.95~22.50 であり、肝臓/血液 (1.01)、脂肪/血液 (9.76) の分配係数の比率より高値を示した採取時間 (肝臓: 経口投与後 30 分、脂肪: 経口投与後

30 分～経口投与後 480 分)があった。単独経口投与グループに対して複数投与グループの経口投与経路の肝臓/血液、脂肪/血液、腎臓/血液の CDCl_3 濃度の比率は、すべての採取時間で高値であった (Table 17)。これらの結果は、吸入暴露経路に対して経口投与経路の複数投与の影響がより大きいことが分かった。

Table 17. Ratios of the blood and tissues partition coefficients and the ratios of the concentrations of CDCl_3 in the blood and tissues by oral administration route.

	Partition coefficient (Ratio)		Collection time						
			After oral administration						
			15	30	60	180	360	390	480 (min)
Oral alone administration group									
Blood	20.8 ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Liver	21.1	1.01 ^b	0.63 ^c	1.05	0.60	0.41	0.54	0.49	0.17
Abdominal fat	203	9.76	4.60	7.57	9.54	11.82	9.40	8.58	5.85
Kidney	—	—	0.32	0.53	0.28	0.23	0.21	0.18	0.13
Combined inhalation plus oral administration group									
Oral administration route									
Blood	20.8	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Liver	21.1	1.01	0.86	1.50	0.70	0.56	0.64	0.65	0.56
Abdominal fat	203	9.76	6.95	10.56	10.92	14.89	22.50	21.39	17.65
Kidney	—	—	0.53	0.96	0.52	0.32	0.31	0.30	0.23

^a Gargas et al. [4]

^b Partition coefficient value of the liver or abdominal fat / the partition coefficient value of the blood.

^c Mean concentration in the liver, abdominal fat, or kidney (n=5) / mean concentration in the blood (n=5).

最後に、体内での CHCl_3 と CDCl_3 の排泄の遅延は、脂肪に高い蓄積があったためだと推測される。しかしながら、当センターで実施した複数投与実験での CHCl_3 での腎臓腫瘍の増加 [31] に関連する実際のメカニズムは解明されていない。しかしながら、1 つの可能性として、単独投与グループに対して複数投与グループの組織中 CHCl_3 と CDCl_3 の体内での吸収の増加と物性(脂溶性)による脂肪への高い蓄積が認められたことに関連があるかもしれない。

4-5. 結論

本研究で2つの経路で CHCl_3 を投与したラットの各投与経路における血液、組織中 CHCl_3 の分布、蓄積の詳細が明らかになった。複数投与による CHCl_3 と CDCl_3 を使用した実験は、MSを用いることで生体内の血液、組織中濃度が把握できた。その複数投与における影響は単独投与グループに比べ、各組織中濃度で高値を示した。この結果は、環境汚染物質である CHCl_3 の毒性と発がん性等を評価するとき、複数投与での各投与経路の影響を考慮して評価する必要があると示唆される。

本章に関する内容について以下の論文発表を行っている。

Take, M.; Yamamoto, S.; Ohnishi, M.; Matsumoto, M.; Nagano, K.; Hirota, T.;

Fukushima, S.

Chloroform distribution and accumulation by combined inhalation plus oral exposure routes in rats.

J. Environ. Sci. Health Pt. A, **2010**, 45, 1616-1624.

第五章

1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパン、1,4-ジオキサンの体内動態

5-1. はじめに

第五章では、第三、四章で CHCl_3 を用いて確立した手法を用いて、他の VOC である DCE、DCP、DX の体内動態について述べる。

DCE と DCP の研究では、ラットに吸入暴露し、吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液、組織中濃度の経時変化と AUC を求めた。

DX の研究では、ラットに吸入暴露 (DX) と経口投与 (DX の安定同位体) で複数投与し、MS を用いて各投与経路での血液、組織中濃度の経時変化と AUC を求めた。それらの結果と単独吸入暴露、単独経口投与した血液、組織中濃度と AUC を比較した結果について述べる。

本章は 3 節からなる。5-2 では「1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパンの体内動態」、5-3 では「1,4-ジオキサンの体内動態」について述べる。

5-2. 1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパンの体内動態

5-2-1. 1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパンの研究の基本方針

本研究は、DCE、DCP を用いてラットに吸入暴露し、吸入暴露期間と吸入暴露終了後の体内動態を把握するために実施した。

VOC の毒性をより良く評価する要因として、吸入暴露での血液、組織中濃度とその経時変化を把握することは重要である。

5-2-1-1. 1,2-ジクロロエタンの研究の基本方針

DCE の体内動態に関して、血液中 DCE 濃度^[5,35,66,72,81,82]、組織中 DCE 濃度^[81]、DCE の尿中の代謝物^[82-85] は報告されている。しかしながら、吸入暴露における体内動態の研究は、血液、組織中 DCE 濃度の経時変化が報告されただけで限られた情報しかない^[81]。

また、当センターで実施した DCE の発がん性が認められた吸入暴露濃度(160ppm) [36] でのラットにおける血液、組織中 DCE 濃度とその経時変化は報告されていない。

本研究は、当センターで DCE を 2 年間のラットの吸入暴露試験で腹膜の中皮腫が観察された 160ppm の吸入暴露濃度 [36] を設定し、吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液、組織中 DCE 濃度を把握することを目的とした。

5-2-1-2. 1,2-ジクロロプロパンの研究の基本方針

DCP の体内動態に関して、血液中 DCP 濃度の経時変化 [86] が報告されただけで限られた情報しかない。

本研究は、当センターで DCP を 2 年間のラットの吸入暴露試験で実施した 80ppm (低暴露濃度) と 500ppm (高暴露濃度: 鼻腔の腫瘍) の吸入暴露濃度 [42] を設定し、吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液、組織中 DCP 濃度を把握することを目的とした。

5-2-2. 1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパンの試験計画

DCE、DCP の吸入暴露研究を実施するために試験計画を立案した。

5-2-2-1. 1,2-ジクロロエタンの試験計画

動物は、40 匹使用した(各採取時間において 5 匹の動物からサンプルを採取した)。

動物は第二章で述べた開発した吸入暴露装置を用いて、DCE 蒸気に最大 360 分、吸入暴露した [68]。DCE 蒸気は、発生器を用いて液体 DCE を循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のバブリングにより液体 DCE を蒸発させ発生した。吸入暴露濃度は当センターで実施した試験で発がん性(腹膜の中皮腫)が認められた 160ppm に設定した [36]。160ppm に設定した吸入暴露装置での実際の DCE 暴露濃度は、 160 ± 2 ppm (平均暴露濃度 \pm 標準偏差)であった。

血液サンプルは、各ラットの尾静脈から採取した後、すぐにエーテル麻酔下で解剖し、組

織サンプル(肺、肝臓、脳、腎臓、脂肪)を採取した。血液、組織サンプルの採取時間は、吸入暴露開始 0、30、60、180、360 分と吸入暴露終了後 60、180、1080 分に設定した。

5-2-2-2. 1,2-ジクロロプロパンの試験計画

動物は、84 匹使用し、80、500ppm の 2 つのグループ(各グループ:42 匹)に分けた(各採取時間で 6 匹の動物からサンプルを採取した)。

ラットは第二章で述べた開発した吸入暴露装置を用いて、当センターで 2 年間のラットの吸入暴露試験で実施した 80、500ppm^[42] の DCP 蒸気に最大 360 分、暴露した^[68]。80、500ppm の DCP 蒸気は、発生器を用いて液体 DCP を循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のバブリングにより液体 DCP を蒸発させ発生した。80、500ppm に設定した吸入暴露装置での実際の DCP 吸入暴露濃度は、 80.2 ± 0.9 、 502.1 ± 8.6 ppm(平均暴露濃度 \pm 標準偏差)であった。

血液サンプルは、各ラットの尾静脈から採取した後、すぐにイソフルラン麻酔下で解剖し、組織サンプル(肺、肝臓、腎臓、脂肪)を採取した。血液、組織サンプルの採取時間は、吸入暴露開始 0、60、180、360 分と吸入暴露終了後 60、180、1080 分に設定した。

5-2-3. 1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパンの結果と考察

5-2-3-1. 1,2-ジクロロエタンの結果と考察

5-2-3-1-1. 血液、組織中 1,2-ジクロロエタン濃度

血液、肺、肝臓、脳、腎臓、脂肪中 DCE 濃度は吸入暴露開始前 0 分、吸入暴露終了後 1080 分で検出されなかった。

吸入暴露期間、血液、肺、肝臓、脳、腎臓中 DCE 濃度は、吸入暴露開始 60 分後まで増加し、60～360 分まで一定濃度で維持された(Table 18)。

吸入暴露期間、血液、肺、肝臓、脳、腎臓中 DCE 濃度の分布は肺から吸収される一定に維持された DCE 暴露濃度と血液-組織間の分配係数^[69] の関係に依存する。この期間、各組織中 DCE 濃度は DCE の代謝^[87-90] によって、肝臓から減少するが肝臓から減少した DCE は肺から吸収され、一定に維持された DCE 暴露濃度により血液から各組織へ DCE が輸送され、一定濃度に保たれた。吸入暴露期間、血液、肺、肝臓、脳、腎臓中 DCE 濃度は、肺から吸収され、一定に維持された DCE と血液中 DCE 濃度が平衡関係になるまで増加し、平衡関係に達すると吸入暴露が終了するまで一定濃度で維持された。

吸入暴露期間の血液中 DCE 濃度は、以前報告された吸入暴露研究^[5,81] とほぼ同じ経時変化を示した。吸入暴露開始 360 分での平均血液中 DCE 濃度は、50ppm で 1.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[5]、200ppm で 3.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ ^[81] であった。本研究での吸入暴露開始 360 分での平均血液中 DCE 濃度は、 $3.13 \pm 0.42\mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 18) であり、暴露濃度に対応した値であった。

血液、他の組織とは対照的に、脂肪中 DCE 濃度は吸入暴露期間を通して増加した (Table 14)。脂肪中 DCE 濃度は各採取時間で他の組織より非常に高い濃度を示した (脂肪中 DCE 濃度は吸入暴露開始前 0 分で検出されなかった)。DCE は脂溶性が高い物性を持つ化学物質のため^[7]、脂肪中 DCE 濃度が高かった。他の組織と比べて、脂肪中 DCE 濃度は血液-脂肪の分配係数^[4,91] の関係に依存する。しかしながら、本研究の吸入暴露濃度 160ppm では、脂肪中 DCE 濃度は平衡関係にならなかった。

吸入暴露終了後、血液、各組織中 DCE 濃度は時間とともに比較的速く、減少した。DCE は血液、各組織中に吸入暴露終了後 180 分まで検出された。この期間の血液、各組織中 DCE 濃度は主に 2 つの要因に依存する。1 つ目は呼気、排泄、肝臓での代謝^[14-17] による DCE の除去、2 つ目は体内での DCE の平衡関係を保つため、貯蔵組織から血液で輸送される DCE の再分布により体内から DCE は減少した。

本研究の吸入暴露終了後の血液、各組織中 DCE 濃度の減少は、以前報告された結果とほぼ同じ経時変化を示した^[5,35,66,72,81,82]。血液、各組織中 DCE 濃度の $T_{1/2}$ は吸入暴露終了後 46 分 (血液)、29 分 (肺)、31 分 (肝臓)、27 分 (脳)、29 分 (腎臓)、34 分 (脂肪) であった。

Table 18. DCE concentration in the blood and tissues.

	During exposure period				After end of exposure period	
	30	60	180	360	60	180 (min)
Blood	1.66 ± 0.48 ^a	3.51 ± 0.42	3.38 ± 0.32	3.13 ± 0.42	0.99 ± 0.10 (68.4%) ^b	0.23 ± 0.06 (92.7%)
Lung	1.48 ± 0.24 ^c	2.07 ± 0.88	2.24 ± 0.88	2.04 ± 0.40	0.32 ± 0.09 (84.3%)	0.03 ± 0.01 (98.5%)
Liver	1.62 ± 0.15	3.21 ± 0.68	3.78 ± 1.51	3.59 ± 0.86	0.78 ± 0.16 (78.3%)	0.07 ± 0.04 (98.1%)
Brain	1.45 ± 0.21	2.26 ± 0.56	2.38 ± 0.54	2.13 ± 0.49	0.40 ± 0.14 (81.2%)	0.02 ± 0.01 (99.1%)
Kidney	1.45 ± 0.25	2.80 ± 1.01	2.52 ± 0.86	2.23 ± 0.30	0.50 ± 0.15 (77.6%)	0.03 ± 0.02 (98.7%)
Abdominal fat	12.88 ± 2.72	29.01 ± 7.92	41.03 ± 14.87	48.10 ± 13.61	9.76 ± 1.59 (79.7%)	1.34 ± 0.67 (97.2%)

^a µg/mL (mean ± S.D.).

^b The elimination percentage of DCE from the blood or tissue at 60 or 180 min after the end of the 360 min exposure period.

((DCE concentration in the blood or tissue at the end of the 360 min exposure period – DCE concentration in the blood or tissue at 60 or 180 min after the end of the exposure period) / (DCE concentration in the blood or tissue at the end of the 360 min exposure period) × 100).

^c µg/g (mean ± S.D.).

本研究での血液、各組織中 DCE 濃度は、吸入暴露終了後 180 分まで検出されたが、以前報告された研究より、DCE の検出時間は若干、長かった。Spreafico et al. ^[81] の研究は、DCE 蒸気を SD ラットに吸入暴露し、50ppm では DCE の検出時間は吸入暴露終了後 45 分(血液)、30 分(肝臓)、20 分(肺)、120 分(脂肪)、250ppm では吸入暴露終了後 180 分(血液)、120 分(肝臓)、90 分(肺)、180 分(脂肪)まで検出されたと報告した。また、Reitz et al. ^[82] の研究は、150ppm の DCE 蒸気を Osborne-Mendel ラットに吸入暴露し、DCE の検出

時間は吸入暴露終了後 80 分(血液)まで検出されたと報告した。本研究と他の研究を比較して DCE の消失時間が若干、異なっていた要因は、動物の週齢、系統、飼育環境等の違いによるものと考えられる。

本研究では、160ppm の DCE 蒸気を吸入暴露した後のラット体内から血液、各組織の DCE の除去率は、吸入暴露終了後 60 分で 68.4%~84.3%、吸入暴露終了後 180 分で 92.7~99.1%であった (Table 18)。Reitz et al.^[82] の研究は、150ppm の DCE 蒸気を吸入暴露終了後のラット体内からの DCE の除去率は、吸入暴露終了後 60 分で約 92%(血液)、Spreafico et al.^[81] の研究は、250ppm の DCE 蒸気を吸入暴露終了後のラット体内からの DCE の除去率は、吸入暴露終了後 60 分で 75~95%(血液、肺、脂肪)の範囲であった。しかしながら、Cheever et al.^[35] の研究は、50ppm の DCE 蒸気を吸入暴露した後のラット体内からの DCE の除去率は、吸入暴露終了後 135 分で 21.4%(血液)であった。本研究の吸入暴露終了後 60 分の DCE の除去率の結果は、Reitz et al.^[82] と Spreafico et al.^[81] の研究結果より、わずかに低いのが、Cheever et al.^[35] の研究結果より高かった。

本研究での血液、肺、肝臓、脳、腎臓、脂肪の吸入暴露終了後 180 分の DCE の除去率は 92.7~99.1%であり、ラット体内から DCE はほぼ排出された。本研究は、他の研究と比較すると概ね一致した結果を示した。

5-2-3-1-2. 1,2-ジクロロエタンの時間曲線下面積(AUC)と分配係数

血液、肺、肝臓、脳、腎臓、脂肪中 DCE 濃度の 0~540 分の AUC (AUC₀₋₅₄₀:360 分の吸入暴露期間と吸入暴露終了後 180 分) 値を Table 19 に示した。脂肪の AUC₀₋₅₄₀ 値は、血液、他の組織の AUC₀₋₅₄₀ 値より著しく高値であった。血液の AUC₀₋₅₄₀ 値に対する各組織の AUC₀₋₅₄₀ 値の比率は、0.62(肺/血液)、1.05(肝臓/血液)、0.66(脳/血液)、0.73(腎臓/血液)、11.90(脂肪/血液)であった。より高い脂肪の AUC 値と脂肪/血液の AUC 比率は、血液に対する脂肪の分配係数が高いことが要因である^[4,91]。

Table 19. AUC and ratios in the blood and tissues.

	AUC ₀₋₅₄₀	Ratio
Blood	1299 ^a	1.00
Lung	811 ^b	0.62 ^c
Liver	1362	1.05
Brain	863	0.66
Kidney	946	0.73
Abdominal fat	15450	11.90

^a μg/mL × min.

^b μg/g × min.

^c AUC₀₋₅₄₀ value of the lung, liver, brain, kidney, or abdominal fat / AUC₀₋₅₄₀ value of the blood.

5-2-3-1-3. 1,2-ジクロロエタンの分配係数の比率

Gargas et al.^[4]の研究に基づいたDCEの分配係数は、血液:30.4、肝臓:35.7、脂肪:344であった。血液の分配係数を1としたときの比率は、肝臓/血液:1.17、脂肪/血液:11.32であった。

分配係数と各採取時間における血液中DCE濃度に対する各組織中DCE濃度の比率をTable 20に示した。吸入暴露期間、本研究の肝臓/血液のDCE濃度の比率は0.91~1.15であり、肝臓/血液(1.17)の分配係数の比率とほぼ一致していた。対照的に、脂肪/血液のDCE濃度の比率は7.76~15.37であり、脂肪/血液(11.32)の分配係数の比率より高値の採取時間もあった。特に、他の組織とは異なりDCEの吸入暴露時間とともに、脂肪/血液のDCE濃度の比率は増加した。

吸入暴露終了後、組織/血液のDCE濃度の比率は、すべての組織で時間とともに減少した。脂肪/血液と肝臓/血液のDCE濃度の比率は、肺/血液、脳/血液、腎臓/血液のDCE濃度の比率より高かった。

採取時間と体内分布の関係を把握するため、組織/血液のDCE濃度の比率と分配係数の組織/血液の比率と比較することは重要である。本研究の結果、吸入暴露期間の180、360

分の脂肪/血液の DCE 濃度の比率が 12.14 と 15.37 であり、分配係数の脂肪/血液の比率の 11.32 より高かった。吸入暴露期間の 180、360 分の肝臓/血液の DCE 濃度の比率が分配係数の肝臓/血液とほぼ一致していることから、160ppm の DCE の吸入暴露により、肝臓での DCE の代謝の遅延が生じたことが考えられる。

本研究において、血液、肺、肝臓、脳、腎臓中 DCE 濃度は、吸入暴露期間開始 60～360 分まで一定であった (Table 18)。更に、その期間の各組織/血液の DCE 濃度の比率は、0.59～0.66 (肺/血液)、0.91～1.15 (肝臓/血液)、0.64～0.70 (脳/血液)、0.71～0.80 (腎臓/血液) であり (Table 20)、各組織の DCE 濃度の比率は、吸入暴露期間の各採取時間と同程度であった。吸入暴露終了後、DCE が体内に吸収されないため、肺/血液、肝臓/血液、脳/血液、腎臓/血液の DCE 濃度の比率は時間とともに減少した。

Table 20. Ratios of the blood and tissues partition coefficients and the ratios of the concentrations of DCE in the blood and tissues.

	Partition coefficient (Ratio)		Collection time					
			During the exposure period				After the end of the exposure period	
			30	60	180	360	60	180 (min)
Blood	30.4 ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Liver	35.7	1.17 ^b	0.98 ^c	0.91	1.12	1.15	0.79	0.30
Abdominal fat	344	11.32	7.76	8.26	12.14	15.37	9.86	5.83
Lung	—	—	0.89	0.59	0.66	0.65	0.32	0.13
Brain	—	—	0.87	0.64	0.70	0.68	0.40	0.09
Kidney	—	—	0.87	0.80	0.75	0.71	0.51	0.13

^a Gargas et al.^[4]

^b Partition coefficient value of the liver or abdominal fat/partition coefficient value of the blood.

^c Mean concentration in the liver, abdominal fat, lung, brain, or kidney (n=5) / mean concentration in the blood (n=5).

DCE は肝臓で代謝され、代謝物は主に尿で排出される。尿中の DCE の代謝物として、Thiodiacetic acid、Thiodiacetic acid sulfoxide^[82] と S-carboxymethcysteine、Thiodiacetic

acid、Chloroacetic acid^[83] が報告されている。吸入暴露実験では、DCE 蒸気をラットに吸入暴露したとき、肺からラット体内に吸収され、血液によって各組織に輸送される。その後、DCE は肝臓によって代謝され、代謝物は腎臓に輸送され尿で排出される。

本研究の血液、各組織中 DCE 濃度と各組織/血液の DCE 濃度の比率は、吸入暴露期間と吸入暴露終了後において、ラット体内に吸収された DCE が代謝され、排出されたことを示す結果であった。

DCE の吸入暴露試験の体内動態に関しては、血液、組織中 DCE 濃度の経時変化が報告されただけで、限られた情報だけしかない^[81]。本研究で得られた血液、組織中 DCE 濃度の経時変化は、DCE の PBPK モデルの開発に役立つデータとなる。

雄ラットに 160ppm の DCE 蒸気を吸入暴露した本研究は、脂肪に多くの DCE の蓄積が認められた。脂肪への DCE の多くの蓄積は、当センターで実施した Nagano et al.^[36] の研究で報告された雄のラットに腹膜の腫瘍が観察された結果を連想させる。更に、DCE、1,1,1-トリクロロエタン (TCE)、ジクロロメタン (DCM) は、塩素化炭化水素化合物で、非常に脂質性が高い VOC である。当研究センターで実施した 2 年間の動物を用いた TCE^[92] と DCM^[93] 蒸気の吸入暴露試験で、雄ラットの腹膜に腫瘍の顕著な発生が報告されている。仮説として、塩素化炭化水素を含む化学物質の脂肪への多くの蓄積は、腹膜の中皮腫の形成に何か関連があるかもしれないことが考えられる。

5-2-3-2. 1,2-ジクロロプロパンの結果と考察

5-2-3-2-1. 血液、組織中 1,2-ジクロロプロパン濃度

80、500ppm とも血液、肺、肝臓、腎臓、脂肪中 DCP 濃度は吸入暴露開始前 0 分で検出されなかった。

< 80ppm >

吸入暴露期間、血液、肺、肝臓、腎臓中 DCP 濃度は、吸入暴露開始 60 分後まで増加し、

60～360分までわずかに増加する傾向を示した(Table 21)。吸入暴露終了後、血液、肺、肝臓、腎臓中 DCP 濃度は、時間とともに減少した。DCP は血液、肺、肝臓、腎臓中に吸入暴露終了後 180 分まで検出されたが、1080 分では検出されなかった。

吸入暴露期間、血液、肺、肝臓、腎臓中 DCP 濃度は肺から吸収され、一定に維持された DCP 暴露濃度と血液-組織間の分配係数^[69]の関係と DCP の代謝と排出に依存する。その期間、肺から吸収され、一定に維持された DCP 暴露濃度と血液中 DCP 濃度の関係は血液中 DCP 濃度が、わずかに増加傾向を示したため、平衡関係にならなかったと考えられる。

肺、肝臓、腎臓中 DCP 濃度は、肺から吸収され、一定に維持された DCP 暴露濃度と血液間、組織に DCP を輸送する血液と組織間で平衡関係に達するまで、DCP は血液から各組織へ吸収され増加する。それらの組織中 DCP 濃度は、代謝(主に肝臓)、呼気(肺)、排出(主に腎臓)により減少するが、肺から吸収され、一定に維持された DCP 暴露濃度により、DCP は各組織に補充される。それらの組織の DCP の一定濃度に達する時間は、吸入暴露開始 60 分で成立した。その後、血液から吸収された組織の DCP は、分布、代謝、排出のバランスが釣り合い一定濃度で推移した。

対照的に、80ppm の脂肪中 DCP 濃度は吸入暴露期間を通して増加し、各採取時間で他の組織より非常に高い濃度であった(Table 21)。この高い脂肪中 DCP 濃度は DCP の高い脂溶性(物性)^[94]によるもので、他の組織同様、血液-脂肪間の分配係数^[4]に依存する。他の組織では代謝、排泄によって平衡関係を保っていたが、他の組織より脂肪の分配係数^[19]が非常に高いのため、脂肪への DCP の蓄積が認められた。この要因により、脂肪中 DCP 濃度は、吸入暴露期間、平衡関係が成立しなかった。

Timchalk et al.^[86]の研究は、頭部吸入暴露チャンバーを用いて 5、50、100ppm の^{[14]C} DCP 蒸気に、6 時間、吸入暴露した 7 週齢の F344 ラットの血液中^{[14]C}DCP 濃度を報告した。Timchalk et al.^[86]の研究の 50ppm を暴露したラットの血液中^{[14]C}DCP 濃度の最大濃度は、本研究の 80ppm の血液中 DCP 濃度より高かった。このことは、動物の週齢^[95]と使用した動物チャンバーの違いによるものであると考えられた。

吸入暴露終了後、血液・各組織(肺、肝臓、腎臓、脂肪)中 DCP 濃度は、時間とともに減少した。各組織中 DCP 濃度は吸入暴露終了後 180 分で検出された。吸入暴露終了後 1080 分では、DCP は肺、肝臓、腎臓で検出されなかったが脂肪では検出された。吸入暴露終了後の各組織中 DCP 濃度は、主に 2 つの要因に依存する。1 つ目は呼気、排出、代謝^[86,96-98]による血液からの DCP の除去、2 つ目は体内での DCP を平衡関係に保つため、貯蔵組織から血液で輸送される DCP の再分布、この 2 つの要因で体内から DCP は減少する。しかしながら、脂肪中 DCP の蓄積は他の組織より非常に高く、血液での DCP 濃度が低かったため、体内での DCP は吸入暴露終了 1080 分後、脂肪で検出された。

< 500ppm >

吸入暴露期間、血液、肺、肝臓、腎臓、脂肪中 DCP 濃度の経時変化は、吸入暴露期間を通して時間とともに増加し、同じ経時変化を示した (Table 21)。それらの結果は、各組織中 DCP 濃度は肺から吸収され、一定に維持された DCP 暴露濃度と血液中 DCP 濃度の関係で 360 分間の吸入暴露期間、平衡関係にならなかった。更に、500ppm の血液中 DCP 濃度は、80ppm の血液中 DCP 濃度より、約 10~15 倍高く、500ppm の組織中 DCP 濃度は、80ppm の各組織中 DCP 濃度より、4~23 倍高い濃度を示し、500ppm の DCP 蒸気に暴露したラットは、体内での代謝による飽和があったことが考えられる。80ppm に対して 500ppm の DCP 蒸気を暴露したラットの体内の DCP は、吸入暴露濃度の公比 (6.25) 以上の比率で DCP の分布が認められた。

80ppm と同様、500ppm を吸入暴露したラットの脂肪中 DCP 濃度は、各採取時間で他の組織でより非常に高かった。80ppm で報告したように、この高い脂肪中 DCP 濃度は DCP の高い脂溶性によるものである^[94]。

吸入暴露終了後、血液、各組織中 DCP 濃度は時間とともに減少した。血液、各組織中 DCP 濃度は吸入暴露終了後 180 分で検出された。吸入暴露終了後 1080 分では肺を除く血液、各組織で DCP が検出された。吸入暴露終了後 1080 分での脂肪中 DCP 濃度は、血

液、肝臓、腎臓より約 100 倍高く分布していた。

Timchalk et al.^[86]の研究では、吸入暴露による DCP の排出経路は主に尿、呼気で、少量が糞で除去されると報告した。また、吸入暴露期間終了 24 時間後にラット体内からほとんどの DCP が除去されが、6 時間吸入暴露した 42 時間後に少量の^[14C]DCP が呼気中に検出された。これらの結果は、本研究(吸入暴露終了 1080 分後、多くの DCP が体内から除去されたが、80ppm の脂肪、500ppm の血液、肝臓、腎臓、脂肪で DCP が検出された)と同じような結果であった。

Table 21. DCP concentration in the blood and tissues.

	During exposure period			After end of exposure period		
	60	180	360	60	180	1080 (min)
80ppm group						
Blood	0.25 ± 0.13 ^a	0.30 ± 0.07	0.41 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.21 ± 0.03	N.D. ^b
Lung	0.36 ± 0.09 ^c	0.27 ± 0.08	0.27 ± 0.10	0.12 ± 0.07	0.01 ± 0.01	N.D.
Liver	0.96 ± 0.20	0.85 ± 0.12	0.99 ± 0.12	0.30 ± 0.03	0.13 ± 0.02	N.D.
Kidney	0.63 ± 0.16	0.72 ± 0.20	0.70 ± 0.08	0.28 ± 0.08	0.09 ± 0.01	N.D.
Abdominal fat	6.19 ± 1.30	12.65 ± 2.29	20.49 ± 3.67	10.95 ± 1.78	7.01 ± 1.12	0.17 ± 0.09
500ppm group						
Blood	2.51 ± 0.56 ^a	4.60 ± 0.89	5.85 ± 1.08	4.35 ± 0.59	2.42 ± 0.45	0.07 ± 0.03
Lung	2.05 ± 0.67 ^c	4.71 ± 2.19	6.23 ± 1.47	3.58 ± 0.82	0.77 ± 0.33	N.D.
Liver	6.94 ± 1.26	14.85 ± 2.87	19.06 ± 2.93	8.65 ± 1.35	2.29 ± 0.43	0.06 ± 0.02
Kidney	4.82 ± 1.04	9.52 ± 1.54	12.26 ± 1.67	7.85 ± 1.97	1.75 ± 0.23	0.04 ± 0.01
Abdominal fat	26.22 ± 4.57	154.62 ± 68.79	270.65 ± 55.83	226.23 ± 21.78	115.83 ± 21.14	4.99 ± 2.19

^a µg/mL (mean ± SD).

^b N.D. : not detected.

^c µg/g (mean ± SD).

5-2-3-2-2. 1,2-ジクロロプロパンの半減期($T_{1/2}$)と時間曲線下面積(AUC)

吸入暴露終了後の血液、各組織中 DCP 濃度の $T_{1/2}$ と 0~1440 分から血液、各組織中 DCP 濃度の AUC (AUC_{0-1440} :360 分の吸入暴露期間と吸入暴露終了後 1080 分) 値を Table 22 に示した。

血液の $T_{1/2}$ 値は、80ppm と 500ppm でほぼ同じ時間であった。500ppm の血液中 DCP 濃度の AUC_{0-1440} の値は、80ppm の値より高かった。80ppm の AUC_{0-1440} の値に対する 500ppm の AUC_{0-1440} の値の比率は 13 倍であり、この値は DCP 暴露濃度 ($500/80\text{ppm} = 6.25$) の比率より高値であった。

各組織の $T_{1/2}$ 値は、肺で最も早く、脂肪で最も長かった。また、500ppm の肺、肝臓、腎臓の $T_{1/2}$ 値は、80ppm より長かった。脂肪の $T_{1/2}$ 値は、2 つのグループとも血液とほぼ同じ時間を示した。500ppm の血液と脂肪の DCP の $T_{1/2}$ 値は、肺、肝臓、腎臓より長かった。以上の結果、DCP は血液によって蓄積が認められた脂肪から他の組織へ輸送されるが、500ppm の脂肪は 80ppm に比べ DCP の蓄積がより多いことが影響したため、500ppm の肺、肝臓、腎臓の $T_{1/2}$ 値は、80ppm より長い時間であった。

各組織の AUC_{0-1440} 値は 80ppm より 500ppm で高かった。同様に、各組織での 80ppm の AUC_{0-1440} 値に対する 500ppm の AUC_{0-1440} 値の比率は、19 (肺)、17 (肝臓)、16 (腎臓)、15 倍 (脂肪) であり、それらの値は、吸入暴露濃度 ($500/80\text{ppm} = 6.25$) の公比より高かった。更に、血液の AUC_{0-1440} 値に対する脂肪の AUC_{0-1440} 値の比率は、血液と他の組織に比べ著しく高かった。しかしながら、80ppm の血液の AUC_{0-1440} 値に対する肺、肝臓、腎臓、脂肪の AUC_{0-1440} 値の比率は、500ppm の比率とはほぼ同じ値を示した。これらの結果は、DCP 蒸気のラット体内で高い濃度が認められた脂肪の蓄積が要因であると示唆される。上記で示したように、2 つの暴露濃度の各組織の DCP の $T_{1/2}$ 値に関しては、脂肪に蓄積された大量の DCP がラット体内で DCP の代謝、除去に影響を及ぼしたと考えられた。

本研究の吸入暴露による吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液、各組織中 DCP 濃度と AUC の値は、DCP の PBPK モデルの開発のために貴重なデータになると考えられる。

Table 22. $T_{1/2}$, AUC, and ratios in the blood and tissues.

	80 ppm group			500 ppm group		
	$T_{1/2}$	AUC ₀₋₁₄₄₀	Ratio	$T_{1/2}$	AUC ₀₋₁₄₄₀	Ratio
Blood	182 ^a	251 ^b	1.00	168	3272	1.00
Lung	39	122 ^c	0.49 ^d	61	2352	0.73
Liver	57	425	1.69	125	7113	2.20
Kidney	59	317	1.26	127	4951	1.53
Abdominal fat	154	9553	38.06	186	139711	43.12

^a min.

^b $\mu\text{g}/\text{mL} \times \text{min}$.

^c $\mu\text{g}/\text{g} \times \text{min}$.

^d AUC₀₋₁₄₄₀ value of the lung, liver, kidney, or abdominal fat/AUC₀₋₁₄₄₀ value of the blood.

5-2-3-2-3. 1,2-ジクロロプロパンの分配係数と各組織濃度の関係

DCP の血液と組織の分配係数、DCP の血液と組織中濃度の比率の関係を Table 23 に示した。DCP の分配係数^[4] は、18.7(血液/空気)、28.4(肝臓/空気)、499(脂肪/空気)、血液/空気に対する肝臓/空気、脂肪/空気の比率は、1.52(肝臓/血液)、26.68(脂肪/血液)であった。

吸入暴露期間、肝臓/血液の DCP 濃度の比率は、2.41～3.84(80ppm)、2.76～3.26(500ppm)の範囲であった。2つのグループの肝臓/血液の DCP 濃度の比率は同程度であったが、肝臓/血液の分配係数の比率(1.52)より約2倍高かった。肺/血液、腎臓/血液の DCP 濃度の比率も2つのグループで同程度であった。その比率は、腎臓で肝臓より15～34%(80ppm)、30～36%(500ppm)で低く、肺で腎臓でより43～63%(80ppm)、50～57%(500ppm)で低い結果であった。脂肪/血液の DCP 濃度の比率は、24.79～49.98(80ppm)、10.45～46.26(500ppm)の範囲で、それらの値は吸入暴露期間を通して時間とともに増加した。2つのグループの吸入暴露開始180、360分の値は、脂肪/血液の分配係数の比率(26.68)より高かった。以上の結果、脂肪/血液、肝臓/血液の DCP 濃度の比率は分配係数

の比率より高く、ラット体内で DCP が高濃度で分布したことが認められた。

吸入暴露終了後、2つのグループの肝臓/血液、肺/血液、腎臓/血液の DCP 濃度の比率は、時間とともに減少した (Table 23)。同様に、80ppm の脂肪/血液の DCP 濃度の比率は時間とともに減少したが、吸入暴露終了後 60、180 分の値は、脂肪/血液の分配係数の比率 (26.68) より高かった。対照的に、500ppm の脂肪/血液の DCP 濃度の比率は、吸入暴露終了後、時間とともに減少する傾向が認められず、脂肪/血液の分配係数の比率より著しく高かった。その要因として、脂肪で維持された DCP の大きな蓄積が考えられる。

当センターで、雄ラットを 125、250、500、1000、2000ppm の DCP 蒸気で 13 週間の吸入暴露実験を実施した^[42]。その結果、2000ppm の DCP 蒸気に暴露したラットで肝臓の小葉中心性肥大 (小葉中心性腫脹) が観察された。しかしながら、すべての吸入暴露濃度で肺、腎臓、脂肪に関する病理所見は観察されなかった。

Table 23. Ratios of the blood and tissues partition coefficients and ratios of the concentrations of DCP, DCE, and CHCl₃ in the blood and tissues.

	Partition coefficient (Ratio)		Collection time							
			During exposure period			After end of exposure period				
			60	180	360	30	60	120	180	1080 (min)
DCP 80 ppm group										
Blood	18.7 ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	— ^b	1.00	— ^b	1.00	— ^c
Liver	28.4	1.52 ^d	3.84 ^e	2.83	2.41	—	0.97	—	0.62	—
Abdominal fat	499	26.68	24.76	42.17	49.98	—	35.32	—	33.38	—
Lung	— ^f	—	1.44	0.90	0.66	—	0.39	—	0.05	—
Kidney	—	—	2.52	2.40	1.71	—	0.90	—	0.43	—
DCP 500 ppm group										
Blood	18.7 ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	— ^b	1.00	— ^b	1.00	1.00
Liver	28.4	1.52 ^d	2.76 ^e	3.23	3.26	—	1.99	—	0.95	0.86
Abdominal fat	499	26.68	10.45	33.61	46.26	—	52.01	—	47.86	71.29
Lung	— ^f	—	0.82	1.02	1.06	—	0.82	—	0.32	— ^c
Kidney	—	—	1.92	2.07	2.10	—	1.80	—	0.72	0.57
DCE 160 ppm ^g										
Blood	30.4 ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	— ^b	1.00	— ^b	1.00	— ^c
Liver	35.7	1.17 ^d	0.91 ^h	1.12	1.15	—	0.79	—	0.30	—
Abdominal fat	344	11.32	8.26	12.14	15.37	—	9.86	—	5.83	—
CHCl ₃ 100 ppm ⁱ										
Blood	20.8 ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	— ^b	1.00	— ^b	— ^c
Liver	21.1	1.01 ^d	0.68 ^h	0.60	0.68	0.40	—	0.27	—	—
Abdominal fat	203	9.76	5.66	8.29	11.63	11.36	—	9.20	—	—

^a Gargas et al.^[4]

^b Blood not collected.

^c Compound not detected.

^d Partition coefficient value of the liver or abdominal fat / partition coefficient value of the blood.

^e Mean concentration in the liver, abdominal fat, lung, or kidney (n=6) / mean concentration in the blood (n=6).

^f Partition coefficient not determined.

^g Take et al.^[99]

^h Mean concentration in the liver or abdominal fat (n=5) / mean concentration in the blood (n=5).

ⁱ Take et al.^[67]

5-2-3-2-4. 1,2-ジクロロプロパン、1,2-ジクロロエタン、クロロホルムとの関係

我々は、第五章の DCE と第四章の CHCl_3 で 18 週齢の F344 の雄ラットを用いた吸入暴露による DCE^[99]、 CHCl_3 ^[67] の血液、組織中濃度研究について述べた。DCE、 CHCl_3 は DCP と同様、脂溶性の高い塩素系炭化水素化合物で VOC でもある。その結果、本研究の DCP と同様、DCE、 CHCl_3 は脂肪に蓄積が観察された^[67,99]。

DCE の分配係数^[4] は、30.4(血液/空気)、35.7(肝臓/空気)、344(脂肪/空気)で、血液/空気に対する肝臓/空気と脂肪/空気の比率は、1.17(肝臓/血液)、11.32(脂肪/血液)であった。 CHCl_3 の分配係数^[4] は、20.8(血液/空気)、21.1(肝臓/空気)、203(脂肪/空気)で、血液/空気に対する肝臓/空気と脂肪/空気の比率は、1.01(肝臓/血液)、9.76(脂肪/血液)であった(Table 23)。

吸入暴露期間、DCE、 CHCl_3 の肝臓/血液の濃度の比率は、分配係数の比率(Table 23)とほぼ同じ値か、または低く、脂肪/血液の濃度の比率は分配係数の比率よりわずかに高かった。吸入暴露終了後、DCE、 CHCl_3 の肝臓/血液、脂肪/血液の比率は時間とともに減少し、各組織の濃度の比率は分配係数の比率より低い値を示した。DCP に関しては、DCE、 CHCl_3 の各組織の濃度の比率に対して、DCP の 80、500ppm の肝臓/血液、脂肪/血液の比率は、高値であった。以上の結果、DCP は肝臓、脂肪での蓄積が DCE、 CHCl_3 より大きいため、DCP の代謝、排出によるラット体内のクリアランスは、DCE、 CHCl_3 より遅いことが示唆された。

5-2-4. 1,2-ジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパンの結論

5-2-4-1. 1,2-ジクロロエタンの結論

DCE の研究は、吸入暴露での吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液、組織中 DCE 濃度の体内分布を調査した。ラット体内の脂肪への DCE の蓄積は、血液と他の組織より著しく多かった。本研究で得た結果は、DCE の PBPK モデルの基本的なデータとして貴重

な情報である。また、本研究の脂肪への多くの DCE の蓄積が認められた結果は、吸入暴露によって DCE 蒸気に暴露したラットの腹膜の中皮腫に何か関連があるかもしれない要因の 1 つとして考えられる。

5-2-4-2. 1,2-ジクロロプロパンの結論

DCP の研究は、吸入暴露での吸入暴露期間中と吸入暴露終了後の血液、組織中 DCP 濃度の体内分布を把握できた。DCP の脂肪への蓄積は、血液、他の組織でより著しく高く示された。また、DCP は吸入暴露終了後 1080 分においてもラット体内で検出された。以前報告された吸入暴露における DCP の体内動態^[86]は限られた情報しかないため、本研究で得た吸入暴露における血液、組織中 DCP 濃度の経時変化、体内分布に関する結果は DCP の PBPK モデルの基本的データとして貴重な情報となる。更に、DCP の吸入暴露によるヒトへのリスクアセスメントのための情報として役立つデータである。

5-3. 1,4-ジオキサンの体内動態

5-3-1. 1,4-ジオキサンの研究の基本方針

本研究は、DX について複数投与による各投与経路での血液、組織中濃度の経時変化と AUC を把握するため、ラットに吸入暴露 (DX) と経口投与 (DX の安定同位体 (DX-d₈)) を用いて研究を実施した。

単独投与経路による DX の体内動態研究に関しては、血漿中 DX 濃度^[100,101]、PBPK モデル^[5,102-105]などの報告がある。DX はヒトに対して屋外、屋内の空気、飲料水等から暴露される可能性があり、複数の経路で暴露されたとき組織への蓄積とそれに伴う化学物質の毒性は強化される報告^[31,67,71,106]がある。従って、複数投与による各投与経路の化学物質の影響を調査することは、組織への蓄積と化学物質の毒性を把握するために重要な研究課題である。

第四章で述べた CHCl_3 と CHCl_3 の安定同位体を用いて、複数投与(吸入暴露+経口投与)による各投与経路の血液、組織中 CHCl_3 、 CDCl_3 濃度の分布について述べた^[67]。その研究に基づいて、DX を吸入暴露、DX-d₈ を経口投与で動物に投与し、MS を用いて血液、組織中濃度の分布を調べた。更に、単独投与経路の血液、組織中濃度の分布を調べ、複数投与での各投与経路と比較した。

5-3-2. 1,4-ジオキサンの試験計画

単独吸入暴露試験、単独経口投与試験、複数投与(吸入暴露+経口投与)試験の研究を実施するために試験計画を立案した。

動物は、135 匹を使用し、単独吸入暴露、単独経口投与、複数投与の各グループ 45 匹のラットを分けた(各採取時間で 5 匹の動物からサンプルを採取した)。

単独吸入暴露グループの動物は、第二章で述べた開発した吸入暴露装置を用いて DX 蒸気に最大 360 分、吸入暴露した^[68]。DX 蒸気は、発生器を用いて液体 DX を循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のバブリングにより液体 DX を蒸発させ発生した。DX の吸入暴露濃度は、250ppm とした。この濃度は、当センターで実施したラットを用いた DX の 2 年間の吸入暴露実験で腹膜の中皮腫を誘発した最も低い濃度に設定した^[51]。

単独経口投与グループのラットは、水で溶解した DX-d₈ を 1000ppm (w/w) に調製し、65mg/kg body weight の投与用量で経口投与した。この投与用量は、当センターで実施したラットを用いた DX の 2 年間の経口投与実験で、1000ppm/水の DX で投与した 1 日の平均摂水量 (65mg/kg body weight) で、腹膜の中皮腫を誘発した最も低い投与用量に設定した^[57]。

複数投与グループの動物は、水で溶解した DX-d₈ を 1000ppm (w/w) に調製し、65mg/kg body weight の投与用量(単独経口投与グループと同じ投与用量)で経口投与した。直ぐに吸入暴露装置に動物を収容し、最大 360 分、250ppm の DX 蒸気(単独吸入暴露グループと同じ吸入暴露濃度)を吸入暴露した。250ppm に設定した吸入暴露装置での実際の DX 暴

露濃度(平均暴露濃度 ± 標準偏差)は、251 ± 3ppm(単独吸入暴露グループ)、250 ± 3ppm(複数投与グループの吸入暴露経路)であった。

血液サンプルは、各ラットの尾静脈から採取した後、すぐにエーテル麻酔下で解剖し、組織サンプル(肺、肝臓、脳、腎臓、脂肪)を採取した。吸入暴露経路の血液、組織サンプルの採取時間は、吸入暴露開始 0、30、60、180、360 分と吸入暴露終了後 60、120、360、720 分に設定した。経口投与経路の血液、組織サンプルの採取時間は、経口投与後 0、30、60、180、360、420、480、720、1080 分に設定した。

5-3-3. 1,4-ジオキサンの結果と考察

5-3-3-1. 単独吸入暴露グループ

血液、各組織(肺、肝臓、脳、腎臓、脂肪)中 DX 濃度は吸入暴露開始前 0 分で検出されなかった。吸入暴露期間、血液、各組織中 DX 濃度は、吸入暴露開始 180 分後まで増加し、180~360 分まで一定濃度で維持された(Table 24)。吸入暴露終了後、血液、各組織中 DX 濃度は時間とともに減少した。DX は血液、各組織中に吸入暴露終了後 120 分まで検出されたが、360、720 分では検出されなかった。

吸入暴露期間、血液、各組織への DX の分布は、肺から吸収され、一定に維持された DX 暴露濃度と血液-組織間の分配係数^[69,102,103]の関係に依存する。この期間、DX は主に肝臓により代謝され組織から DX は排出されるが肺から吸収され、一定に維持された DX 暴露濃度により血液から各組織へ DX が輸送され、組織に補充される。従って、各組織中 DX 濃度は肺から吸収され、一定に維持された DX 暴露濃度と血液間での分配に依存した。

本研究での血液中 DX 濃度は PBPK モデル^[5,102-105]で報告された結果とほぼ同じ経時変化を示した。また、以前に報告された吸入暴露研究で、雄ラットに 52ppm の DX を暴露した血漿中 DX 濃度で 7.3µg/mL^[100]、400ppm では 48µg/mL^[101]であった。本研究での吸入

暴露開始 360 分での血液中 DX 濃度は $22.0 \pm 2.7 \mu\text{g/mL}$ であった。我々の結果は、以前報告された吸入暴露濃度に対応した血液中濃度を示した。

吸入暴露終了後の血液、各組織中 DX 濃度の減少は、主に 2 つの要因に依存する。1 つ目は呼気からの DX の排泄、主に肝臓での DX の代謝^[5,100,107-111]、2 つ目は体内で平衡関係を保つため貯蔵組織から血液で輸送される DX の再分布により、これらの要因で血液、各組織中の DX は体内から減少した。

本研究の吸入暴露終了後の血液中 DX 濃度の減少は、以前に報告された結果^[97] とほぼ同じ経時変化を示した。また、各組織中 DX 濃度は、すべての採取時間で肺、肝臓、脳、腎臓中 DX 濃度は、脂肪中 DX 濃度より高かった。このことは、血液-脂肪間の分配係数が他の組織より低いことが要因であると示唆される^[5,102]。

本研究と Sweeny et al.^[5] の PBPK モデル研究を比較した。本研究結果は吸入暴露期間、血液中 DX 濃度は吸入暴露開始 0~180 分まで増加し、180 分以降、吸入暴露終了まで一定濃度で維持された。吸入暴露終了後、DX は血液中に吸入暴露終了後 120 分まで検出されたが、吸入暴露終了後 360 分で体内から DX は検出されなかった。Sweeny et al. の PBPK モデル研究結果は吸入暴露期間、血液中 DX 濃度は吸入暴露開始 0~360 分まで増加を示し、吸入暴露終了後、DX は血液中に吸入暴露終了後 120 分まで検出されるが、その後、体内から DX は検出されないと予測した。

本研究のデータと Sweeny et al. の PBPK モデル研究に大きな違いがあった。1 つ目は本研究のデータは吸入暴露期間、血液中 DX 濃度が平衡関係に達した時間は吸入暴露開始 180~360 分であったが、PBPK モデル研究 (52ppm の DX 暴露濃度) では吸入暴露期間を通して血液中 DX 濃度は増加すると予想した。この違いは、PBPK モデルと比較して本研究の実験 (250ppm の DX 暴露濃度) で暴露した DX 暴露濃度は、PBPK モデルを予測した暴露濃度に比べ、高い吸入暴露濃度であった。2 つ目は本研究の DX の吸入暴露終了時の血液中 DX 濃度は $22.0 \pm 2.7 \mu\text{g/mL}$ で、PBPK モデルの血液中 DX 濃度は約 $9 \mu\text{g/mL}$ の濃度を予測し、本研究で得た血液中 DX 濃度は、PBPK モデルで予測された血液中 DX 濃度

の約2倍(公比:250/52ppm=4.8倍)であった。以上の結果、高い暴露濃度で動物にDXを暴露したとき、体内に吸収するDXも多いため、低い暴露濃度に比べ肝臓での代謝が促進された要因で血液中DX濃度に影響があったと考えられた。

5-3-3-2. 単独経口投与グループ

血液、各組織(肺、肝臓、脳、腎臓、脂肪)中DX-d₈濃度は経口投与開始前0分で検出されなかった。経口投与後、血液、各組織中DX-d₈濃度は増加し、経口投与後60分にC_{max}に達した後、時間とともに減少した(Table 25)。血液、各組織中DX-d₈濃度は経口投与後480分まで検出されたが、経口投与後720、1080分では検出されなかった。

上記に示した経時変化は、主に3つの機能に依存する。機能1は経口投与での血液によるDX-d₈の輸送、機能2は血液と他の組織間の分配係数、機能3は代謝、排泄による組織からのDX-d₈の除去がある。最初に、機能1と2で血液によってDX-d₈を各組織に輸送し、血液と組織間で体内に分布する。次に、機能2で体内に分布したDX-d₈は機能3により代謝、排泄され体内から除去される。各組織でのDX-d₈の分布は血液と各組織間の分配係数^[69,102,103]に依存する。血液、各組織中DX-d₈濃度は、ほぼ同じ経時変化を示した。また、単独吸入暴露グループと同様、すべての採取時間で肺、肝臓、脳、腎臓中DX-d₈濃度は、脂肪中DX-d₈濃度より高かった。

Sweeny et al.^[5]のPBPKモデル研究と本研究の経口投与によるラットの血液中DX-d₈濃度は、ほぼ同じ経時変化を示した。本研究の結果は経口投与後、すぐに血液中DX-d₈濃度は増加し、経口投与後60分でC_{max}に達した。その後、血液中DX-d₈濃度は減少し、経口投与後420分まで体内にDX-d₈が検出された。Sweeny et al.のPBPKモデルの推定は経口投与後、すぐに血液中DX濃度は増加し、経口投与後60分でC_{max}に達し、その後、血液中DX濃度は減少した。血液中DX濃度は経口投与後480分では検出されなかった。C_{max}における血液中濃度に関して、本研究のデータとPBPKモデルで大きな違いがあった。本研究(ラットに65mg/kg body weightのDX-d₈を経口投与)ではC_{max}が100.73 ± 5.05

μg/mL であり、PBPK モデル(マウスに 200mg/kg body weight の DX を経口投与)では Cmax が約 100μg/mL と予測した。この PBPK モデルで予測される DX の血液中濃度は、本研究の実験で測定された血液中濃度より非常に低かった。この結果は、ラットとマウスの肝臓の代謝を比較したとき、ラットに対してマウスが非常に高い代謝率^[5]を示すことが要因の 1 つであると示唆される。

5-3-3-3. 複数投与(吸入暴露+経口投与)グループ

<複数投与グループの吸入暴露経路>

血液、各組織(肺、肝臓、脳、腎臓、脂肪)中 DX 濃度は吸入暴露開始前 0 分と吸入暴露終了後 720 分で検出されなかった。複数投与グループの吸入暴露経路の血液、各組織中 DX 濃度はほぼ同じ経時変化を示した(Table 24)。吸入暴露期間、血液、各組織中 DX 濃度は暴露時間に対応して増加した。吸入暴露終了後、血液、各組織中 DX 濃度は時間とともに減少し、吸入暴露終了後 360 分まで検出された。

複数投与の吸入暴露経路と単独吸入暴露の 2 つのグループでの DX の分布に関して、3 つの大きな違いがあった。1 つ目は吸入暴露期間、単独吸入暴露グループの血液、各組織中 DX 濃度は、一定時間、体内で平衡関係を維持したが、複数投与グループの吸入暴露経路の血液、各組織中 DX 濃度は、暴露時間に対応して増加した。2 つ目は複数投与グループの吸入暴露経路の血液、各組織中 DX 濃度は、単独吸入暴露グループの血液、各組織中 DX 濃度に対して、ほぼすべての採取時間において著しく高い濃度であった。3 つ目はラット体内からの DX の除去は、複数投与グループの吸入暴露経路の血液、各組織中 DX 濃度(最終検出時間:吸入暴露終了後 360 分)は、単独吸入暴露グループの血液、各組織中 DX 濃度(最終検出時間:吸入暴露終了後 120 分)に対して非常に長かった。

各採取時間における血液、各組織中 DX 濃度の単独吸入暴露グループに対する複数投与グループの吸入暴露経路の DX 濃度の%比(複数投与グループの吸入暴露経路/単独吸入暴露グループ×100)を Table 24 に示した。各採取時間で血液、各組織中 DX 濃度の複

数投与グループの吸入暴露経路の%比は、単独吸入暴露グループより高かった。

<複数投与グループの経口投与経路>

血液、各組織(肺、肝臓、脳、腎臓、脂肪)中 DX-d₈濃度は、経口投与開始前 0 分と経口投与後 1080 分で検出されなかった。各採取時間における血液、各組織中 DX-d₈濃度を Table 25 に示した。血液、各組織中 DX-d₈濃度は、単独経口投与グループとほぼ同じ経時変化を示した。血液、各組織中 DX-d₈濃度の Cmax は 60 分に達し、その後、血液、各組織中 DX-d₈濃度は時間とともに減少した。

しかしながら、複数投与の経口投与経路と単独経口投与の 2 つのグループで DX-d₈の分布に関して、2 つの大きな違いがあった。1 つ目は複数投与グループの経口投与経路の血液、各組織中 DX-d₈濃度は、単独経口投与グループの血液、各組織中 DX-d₈濃度よりも経口投与後 60~720 分まで顕著に高い濃度であった。特に、経口投与後 360~480 分で高い濃度を示した。2 つ目は体内からの DX-d₈の除去は、単独経口投与グループの血液、各組織中に比べ、複数投与グループの経口投与経路で非常に長かった。単独経口投与グループでは経口投与後 720 分で DX-d₈は体内で検出されなかったが、複数投与グループの経口投与経路の血液、各組織中では低い濃度であったが、ラット体内から DX-d₈は検出された。

各採取時間における血液、各組織中 DX 濃度の単独経口投与グループに対する複数投与グループの経口投与経路の DX 濃度の%比(複数投与グループの経口投与経路/単独経口投与グループ×100)を Table 25 に示した。経口投与後 30 分での血液、組織中の DX-d₈濃度の%比を除いて、各採取時間において、血液、各組織中 DX-d₈濃度の複数投与グループの経口投与経路の%比は、単独経口投与グループより高かった。

Table 24. DX concentrations (mean \pm SD) in the blood and tissues at each collection time point by inhalation route.

Inhalation route	Collection time						
	During exposure period			After end of exposure period			
	30	60	180	360	60	120	360 (min)
Blood ($\mu\text{g/mL}$)							
Inhalation alone administration group	3.93 \pm 1.19 ^a	9.74 \pm 3.69	20.11 \pm 7.01	22.02 \pm 2.65	8.53 \pm 1.11	3.73 \pm 0.38	0.00 \pm 0.00
Combined inhalation plus oral administration group	7.67 \pm 1.17 [*] (195%) ^b	25.19 \pm 2.10 [*] (259%)	61.39 \pm 3.68 [*] (305%)	75.86 \pm 6.35 [*] (345%)	53.49 \pm 5.08 [*] (627%)	31.96 \pm 8.56 [*] (857%)	0.13 \pm 0.02 [*]
Lung ($\mu\text{g/g}$)							
Inhalation alone administration group	13.35 \pm 1.36	15.18 \pm 4.34	23.47 \pm 6.44	21.40 \pm 9.11	11.02 \pm 2.76	5.33 \pm 2.50	0.00 \pm 0.00
Combined inhalation plus oral administration group	24.30 \pm 5.38 [*] (182%)	46.25 \pm 8.65 [*] (305%)	109.57 \pm 12.31 [*] (467%)	126.60 \pm 17.77 [*] (592%)	78.72 \pm 10.83 [*] (714%)	47.19 \pm 8.14 [*] (885%)	0.77 \pm 0.14 [*]
Liver ($\mu\text{g/g}$)							
Inhalation alone administration group	9.96 \pm 1.26	11.73 \pm 4.32	18.48 \pm 4.98	16.42 \pm 8.51	8.75 \pm 1.69	4.37 \pm 1.64	0.00 \pm 0.00
Combined inhalation plus oral administration group	20.68 \pm 4.78 [*] (208%)	38.94 \pm 7.98 [*] (332%)	90.53 \pm 10.22 [*] (490%)	104.19 \pm 10.24 [*] (635%)	63.96 \pm 8.49 [*] (731%)	39.36 \pm 7.17 [*] (901%)	0.95 \pm 0.26 [*]
Brain ($\mu\text{g/g}$)							
Inhalation alone administration group	8.71 \pm 1.41	9.40 \pm 3.93	16.68 \pm 5.29	14.52 \pm 6.39	5.58 \pm 1.36	3.06 \pm 1.19	0.00 \pm 0.00
Combined inhalation plus oral administration group	16.16 \pm 2.36 [*] (186%)	36.45 \pm 7.72 [*] (388%)	77.14 \pm 8.18 [*] (462%)	83.30 \pm 6.14 [*] (574%)	59.32 \pm 9.31 [*] (1063%)	35.26 \pm 10.55 [*] (1152%)	0.50 \pm 0.10 [*]
Kidney ($\mu\text{g/g}$)							
Inhalation alone administration group	12.19 \pm 1.72	13.40 \pm 4.98	18.44 \pm 5.13	17.20 \pm 8.98	8.74 \pm 2.00	5.14 \pm 1.21	0.00 \pm 0.00
Combined inhalation plus oral administration group	19.30 \pm 4.15 [*] (158%)	40.38 \pm 8.51 [*] (301%)	95.47 \pm 13.05 [*] (518%)	106.96 \pm 18.53 [*] (622%)	61.83 \pm 7.86 [*] (707%)	39.44 \pm 6.23 [*] (767%)	0.61 \pm 0.20 [*]
Abdominal fat ($\mu\text{g/g}$)							
Inhalation alone administration group	5.94 \pm 1.02	8.66 \pm 3.38	11.54 \pm 2.83	10.33 \pm 4.46	5.22 \pm 0.79	2.17 \pm 0.68	0.00 \pm 0.00
Combined inhalation plus oral administration group	11.98 \pm 3.39 [*] (202%)	24.60 \pm 3.75 [*] (284%)	47.13 \pm 5.91 [*] (408%)	57.41 \pm 10.00 [*] (556%)	36.04 \pm 5.41 [*] (690%)	20.39 \pm 6.41 [*] (940%)	0.83 \pm 0.16 [*]

* Significantly different from the inhalation alone administration group ($p \leq 0.05$).

^a mean \pm S.D. ($n=5$ for each collection time/group).

^b % (DX concentration in the blood or each tissue of combined inhalation plus oral administration group / DX concentration in the blood or each tissue of inhalation alone administration group \times 100).

Table 25. DX-d₈ concentrations (mean ± SD) in the blood and tissues at each collection time point by oral administration route.

	Collection time						
	After oral administration						
	30	60	180	360	420	480	720 (min)
Oral administration route							
Blood (µg/mL)							
Oral alone administration group	69.91 ± 15.08 ^a	100.73 ± 5.05	86.57 ± 11.62	6.93 ± 1.88	0.95 ± 0.44	0.29 ± 0.03	0.00 ± 0.00
Combined inhalation plus oral administration group	64.36 ± 8.31 (92%) ^b	121.98 ± 4.07 [*] (121%)	102.91 ± 7.33 [*] (119%)	63.24 ± 5.69 [*] (913%)	42.67 ± 6.67 [*] (4492%)	25.55 ± 8.94 [*] (8810%)	0.15 ± 0.02 [*]
Lung (µg/g)							
Oral alone administration group	205.56 ± 4.83	214.14 ± 11.52	144.14 ± 12.39	39.26 ± 13.62	5.04 ± 3.54	2.44 ± 1.19	0.00 ± 0.00
Combined inhalation plus oral administration group	227.64 ± 25.09 (111%)	255.67 ± 12.15 [*] (119%)	178.70 ± 22.09 [*] (124%)	103.84 ± 14.33 [*] (264%)	60.18 ± 4.38 [*] (1194%)	38.46 ± 10.12 [*] (1576%)	0.81 ± 0.23 [*]
Liver (µg/g)							
Oral alone administration group	170.57 ± 8.06	187.95 ± 13.84	119.41 ± 18.15	30.98 ± 7.62	3.15 ± 2.77	1.46 ± 0.74	0.00 ± 0.00
Combined inhalation plus oral administration group	191.14 ± 18.35 (112%)	213.73 ± 11.59 [*] (114%)	147.52 ± 13.65 [*] (124%)	84.76 ± 8.67 [*] (274%)	47.48 ± 4.08 [*] (1507%)	30.73 ± 8.05 [*] (2105%)	0.68 ± 0.24 [*]
Brain (µg/g)							
Oral alone administration group	138.90 ± 6.33	173.85 ± 11.94	104.46 ± 22.07	26.52 ± 8.23	3.75 ± 3.49	1.64 ± 0.65	0.00 ± 0.00
Combined inhalation plus oral administration group	157.02 ± 16.57 (113%)	207.70 ± 26.00 [*] (119%)	130.04 ± 10.18 [*] (124%)	70.31 ± 5.30 [*] (265%)	46.03 ± 6.72 [*] (1227%)	30.01 ± 13.37 [*] (1830%)	0.47 ± 0.12 [*]
Kidney (µg/g)							
Oral alone administration group	172.88 ± 11.24	184.50 ± 12.51	133.15 ± 16.95	32.38 ± 11.53	3.53 ± 3.02	1.29 ± 0.96	0.00 ± 0.00
Combined inhalation plus oral administration group	187.38 ± 9.40 (108%)	228.56 ± 19.35 [*] (124%)	159.09 ± 15.41 [*] (119%)	89.63 ± 15.75 [*] (277%)	47.64 ± 0.38 [*] (1350%)	32.35 ± 8.35 [*] (2508%)	0.40 ± 0.10 [*]
Abdominal fat (µg/g)							
Oral alone administration group	85.82 ± 3.50	91.49 ± 7.04	52.92 ± 7.19	15.24 ± 4.68	2.68 ± 1.56	1.40 ± 0.53	0.00 ± 0.00
Combined inhalation plus oral administration group	97.21 ± 11.98 (113%)	117.40 ± 11.34 [*] (128%)	64.66 ± 8.61 [*] (122%)	39.02 ± 7.35 [*] (256%)	23.27 ± 1.12 [*] (868%)	14.77 ± 5.19 [*] (1055%)	0.64 ± 0.29 [*]

* Significantly different from the oral alone administration group ($p \leq 0.05$).

^a mean ± S.D. (n=5 for each collection time/group).

^b % (DX-d₈ concentration in the blood or each tissue of combined inhalation plus oral administration group / DX-d₈ concentration in the blood or each tissue of oral alone administration group × 100).

複数投与グループの0～1080分の各組織中DXとDX-d₈濃度のAUC(吸入暴露経路のAUC₀₋₁₀₈₀:360分の吸入暴露期間と吸入暴露終了後360分、経口投与経路のAUC₀₋₁₀₈₀:経口投与後720分)値をTable 26に示した。このグループの吸入暴露経路におけるAUC₀₋₇₂₀から経口投与経路の経口投与等価用量を推定した。その結果、吸入暴露経路の各組織の推定した経口投与等価用量は39.4～46.9mg/kg body weightに相当した。これらの値は経口投与した投与用量65 mg/kg body weightに対して、やや低い値であった。

Table 26. AUC of DX and DX-d₈ in the tissues of the combined inhalation plus oral administration group.

	AUC ₀₋₇₂₀		Estimated inhalation dose (mg/kg body weight)
	Inhalation route	Oral administration route	
Lung	47724 ^a	74751	41.5 ^b
Liver	39473	61604	41.6
Brain	33697	55542	39.4
Kidney	40466	65154	40.4
Abdominal fat	21482	29786	46.9

^a μg/g×min.

^b Estimated inhalation dose = oral administration dose (65 mg/kg body weight)×AUC₀₋₇₂₀ value in each tissue by the inhalation route/AUC₀₋₇₂₀ value in each tissue by the oral administration route.

単独投与経路に対して、複数投与グループの組織で高い分布を示した。経口投与経路では動物に水で溶解したDX-d₈を直接、胃の中に投与するため、DX-d₈は胃粘膜を通して吸収され、血液によって肝臓に輸送された後、他の組織に分布する。一方、吸入暴露経路では、動物にDX蒸気を連続的(360分間)に肺から体内に吸収し血液に運搬されて他の組織に分布する。

複数投与グループの経口投与経路の影響は、経口投与後30分以外のすべての採取時間で単独経口投与グループに対して複数投与グループの経口投与経路で顕著な高値が

観察された。また、複数投与グループの吸入暴露経路の影響は、すべての採取時間で単独吸入暴露グループに対して複数投与グループの吸入暴露経路で顕著な高値が観察された。

吸入暴露開始 30 分での単独吸入暴露グループに対して複数投与グループの吸入暴露経路の血液、各組織中 DX 濃度は、顕著に高値を示したが、経口投与後 30 分での単独経口投与グループに対して複数投与グループの経口投与経路の血液、各組織中 DX-d₈ 濃度は、同程度であった。この結果は、経口投与後 30 分の血液、各組織中 DX-d₈ 濃度が吸入暴露開始 30 分の血液、各組織中 DX 濃度より、約 5~10 倍高い濃度で体内に分布した。吸入暴露経路では、DX は肺から動物体内に吸収し、その後、DX は代謝、排泄によって体内から失われるが、その損失は肺から吸収される一定に維持された DX 暴露濃度により血液から各組織へ補充される。しかしながら、経口投与経路での体内の DX-d₈ の分布が非常に高かったため、吸入暴露経路の DX の代謝、排泄の遅延が生じ、単独吸入暴露グループの体内分布より複数投与グループの吸入暴露経路での体内分布が高い濃度を示したと考えられる。また、複数投与グループの吸入暴露経路の DX の吸入暴露時間が短時間(30 分)であり、血液、各組織中 DX 濃度が経口投与経路に比べ、約 5~10 倍低い濃度であることから、経口投与経路の血液、各組織中 DX-d₈ 濃度に影響を与えない濃度であったと示唆される。

単独吸入暴露グループに対して複数投与グループの吸入暴露経路、単独経口投与グループに対して複数投与グループの経口投与経路の%比は、採取時間に伴い増加した (Tables 24,25)。この結果は、複数投与グループの各投与経路で暴露した動物体内での DX の除去効果の減衰を示唆する。特に、後半の採取時間において、複数投与グループの各投与経路での血液、各組織中 DX、DX-d₈ 濃度は、各単独投与グループに対して相加効果以上の分布を示し、動物体内での DX、DX-d₈ の除去効果の減衰の要因だけではなく、肝臓における代謝の飽和が関連していると考えられる。

各組織中 DX と DX-d₈ の分布は主に 2 つの要因がある。1 つ目は DX に関して、水に非

常に溶解、また、大部分の有機溶剤にも溶解する物性がある^[10,43]。2 つ目は組織の分配係数^[5,99]が高いことである。その結果、体内の DX、DX-d₈ の分布は、分配係数の比率にほぼ一致した。

5-3-3-4. 1,4-ジオキサン¹の分配係数の比率と投与経路の関係

Sweeny et al.^[5]の研究に基づいた DX の分配係数は、血液:1850、肝臓:1557、脂肪:851 であった。血液の分配係数を 1 としたときの比率は、肝臓/血液:0.84、脂肪/血液:0.46 であった。吸入暴露経路での分配係数と各採取時間における血液中 DX 濃度に対する各組織中 DX 濃度の比率を Table 27、経口投与経路での分配係数と各採取時間における血液中 DX-d₈ 濃度に対する各組織中 DX-d₈ 濃度の比率を Table 28 に示した。

単独吸入暴露グループでは、肝臓/血液の DX 濃度の比率は 0.75~2.53 であり、肝臓/血液 (0.84) の分配係数の比率より、吸入暴露開始 360 分を除く、すべての採取時間で高値、脂肪/血液の DX 濃度の比率は 0.47~1.51 であり、脂肪/血液 (0.46) の分配係数の比率より、すべての採取時間で高値を示した (Table 27)。

複数投与グループの吸入暴露経路では、肝臓/血液の DX 濃度の比率は 1.20~7.31、脂肪/血液の CHCl₃ 濃度の比率は 0.64~6.38 であり、肝臓/血液 (0.84)、脂肪/血液 (0.46) の分配係数の比率より、すべての採取時間で高値を示した。単独吸入暴露グループに対して複数投与グループの吸入暴露経路の肝臓/血液、脂肪/血液の DX 濃度の比率は、すべての採取時間で高値、肺/血液、脳/血液の DX 濃度の比率は、吸入暴露開始 30 分を除く、すべての採取時間で高値、腎臓/血液の DX 濃度の比率は、吸入暴露開始 30 分、吸入暴露終了後 120 分を除く、すべての採取時間で高値であった (Table 27)。これらの結果は、単独吸入暴露グループに対して複数投与の影響がより大きいことが分かった。

Table 27. Ratios of the blood and tissues partition coefficients and the ratios of the concentrations of DX in the blood and tissues by inhalation route.

	Partition coefficient (Ratio)		Collection time						
			During exposure period				After end of exposure period		
			30	60	180	360	60	120	360 (min)
Inhalation alone administration group									
Blood	1850 ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Liver	1557	0.84 ^b	2.53 ^c	1.20	0.92	0.75	1.03	1.17	
Abdominal fat	851	0.46	1.51	0.89	0.57	0.47	0.61	0.58	
Lung	—	—	3.40	1.56	1.17	0.97	1.29	1.43	
Brain	—	—	2.22	0.97	0.83	0.66	0.65	0.82	
Kidney	—	—	3.10	1.38	0.92	0.78	1.02	1.38	
Combined inhalation plus oral administration group									
Inhalation route									
Blood	1850	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Liver	1557	0.84	2.70	1.55	1.47	1.37	1.20	1.23	7.31
Abdominal fat	851	0.46	1.56	0.98	0.77	0.76	0.67	0.64	6.38
Lung	—	—	3.17	1.84	1.78	1.67	1.47	1.48	5.92
Brain	—	—	2.11	1.45	1.26	1.10	1.11	1.10	3.85
Kidney	—	—	2.52	1.60	1.56	1.41	1.16	1.23	4.69

^a Sweeny et al. [5]

^b Partition coefficient value of the liver or abdominal fat / the partition coefficient value of the blood.

^c Mean concentration in the liver, abdominal fat, lung, brain, or kidney (n=5) / mean concentration in the blood (n=5).

単独経口投与グループでは、肝臓/血液の DX-d₈ 濃度の比率は 1.38～5.03、脂肪/血液の DX-d₈ 濃度の比率は 0.61～4.83 であり、肝臓/血液(0.84)、脂肪/血液(0.46)の分配係数の比率より、すべての採取時間で高値を示した (Table 28)。

複数投与グループの経口投与経路では、肝臓/血液の DX-d₈ 濃度の比率は 1.13～4.53、脂肪/血液の DX-d₈ 濃度の比率は 0.55～4.27 であり、肝臓/血液(0.84)、脂肪/血液(0.46)の分配係数の比率より、すべての採取時間で高値を示した。単独経口投与グループに対して複数投与グループの経口投与経路の肝臓/血液、脂肪/血液、肺/血液、脳/血液、腎臓/血液

の DX-d₈ 濃度の比率は、高値を示す採取時間が少なかった (Table 28)。このことは、単独経口投与グループの血液中 DX-d₈ 濃度が経口投与後 360 分以降、急速に減衰したため、各組織/血液の比率に影響を与えたことが要因である。

Table 28. Ratios of the blood and tissues partition coefficients and the ratios of the concentrations of DX-d₈ in the blood and tissues by oral administration route.

	Partition coefficient (Ratio)		Collection time						
			After oral administration						
			30	60	180	360	420	480	720 (min)
Oral alone administration group									
Blood	1850 ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Liver	1557	0.84 ^b	2.44 ^c	1.87	1.38	4.47	3.32	5.03	
Abdominal fat	851	0.46	1.23	0.91	0.61	2.20	2.82	4.83	
Lung	—	—	2.94	2.13	1.67	5.67	5.31	8.41	
Brain	—	—	1.99	1.73	1.21	3.83	3.95	5.66	
Kidney	—	—	2.47	1.83	1.54	4.67	3.72	4.45	
Combined inhalation plus oral administration group									
Oral administration route									
Blood	1850	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Liver	1557	0.84	2.97	1.75	1.43	1.34	1.11	1.20	4.53
Abdominal fat	851	0.46	1.51	0.96	0.63	0.62	0.55	0.58	4.27
Lung	—	—	3.54	2.10	1.74	1.64	1.41	1.51	5.40
Brain	—	—	2.44	1.70	1.26	1.11	1.08	1.17	3.13
Kidney	—	—	2.91	1.87	1.55	1.42	1.12	1.27	2.67

^a Sweeny et al. [5]

^b Partition coefficient value of the liver or abdominal fat / the partition coefficient value of the blood.

^c Mean concentration in the liver, abdominal fat, lung, brain, or kidney (n=5) / mean concentration in the blood (n=5).

最後に、DX の肺、脳、腎臓の分配係数の報告はないため、肺/血液、脳/血液、腎臓/血液の DX と DX-d₈ 濃度の比率を比較することは、DX の毒性を評価のために重要な情報である。

5-3-4. 1,4-ジオキサンの結論

本研究で2つの経路でDXを投与したラットの各投与経路における血液、組織中DXの分布、蓄積の詳細が明らかになった。複数投与によるDXとDX-d₈を使用した実験は、MSを用いることで生体内の血液、組織中濃度が把握できた。その複数投与における影響は単独投与グループに比べ、血液、各組織中濃度で高値を示した。この結果は、環境汚染物質であるDXの毒性と発がん性等を評価するとき、複数投与での各投与経路の影響を考慮して評価する必要があると示唆される。

本章に関する内容について以下の論文発表を行っている。

1. Take, M.; Takanobu, K.; Takeuchi, T.; Haresaku, M.; Matsumoto, M.; Nagano, K.; Yamamoto, S.; Fukushima, S.
Distribution of blood and tissue concentrations in rats by inhalation exposure to 1,2-dichloroethane.
J. Environ. Sci. Health Pt. A, **2013**, 48, 1031-1036.
2. Take, M.; Matsumoto, M.; Takeuchi, T.; Haresaku, M.; Kondo, H.; Senoh, H.; Umeda, Y.; Takamura-Enya, T.; Fukushima, S.
Inhalation exposure to 1,2-dichloropropane: Distribution of blood and tissue concentrations of 1,2-dichloropropane in rats during and after exposure.
J. Environ. Sci. Health Pt. A, **2014**, 49, 1341-1348.
3. Take, M.; Ohnishi, M.; Yamamoto, S.; Matsumoto, M.; Nagano, K.; Fukushima, S.
Distribution of 1,4-dioxane by combined inhalation plus oral exposure routes in rats.
Intern. J. Environ. Anal. Chem., **2012**, 92, 1715-1728.

References

- [1] Chemical Abstracts Service (CAS), A Division of the American Chemical Society, American Chemical Society: Columbus, OH, 2014. Available at www.cas-japan.jp/about-cas/cas-history.html (accessed June, 2014).
- [2] National Institute of Technology and Evaluation (NITE), Basic Manual for Calculation of the Estimated Human Exposure Used in the Risk Assessment of Consumer Products, NITE: Tokyo, 2008. Available at http://www.safe.nite.go.jp/english/risk/pdf/guidance_ap1_e.pdf (accessed November, 2014).
- [3] Fiserova-Bergerova, V.; Diaz, M.L. Determination and prediction of tissue-gas partition coefficients. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* **1986**, *58*, 75-87.
- [4] Gargas, M.L.; Burgess, R.J.; Voisard, D.E.; Cason, G.H.; Andersen, M.E. Partition coefficients of low-molecular-weight volatile chemicals in various liquids and tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1989**, *98*, 87-99.
- [5] Sweeney, L.M.; Thrall, K.D.; Poet, T.S.; Corley, R.A.; Weber, T.J.; Locey, B.J.; Clarkson, J.C.; Saghir, S.; Gargas, M.L. Physiologically based pharmacokinetic modeling of 1,4-dioxane in rats, mice, and humans. *Toxicol. Sci.*, **2008**, *101*, 32-50.
- [6] International Agency for Research on Cancer (IARC). Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, **1999**, *73*, 131-182.
- [7] International Agency for Research on Cancer (IARC). Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part two). *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, **1999**, *71*, 501-529.
- [8] International Agency for Research on Cancer (IARC). Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part three). *IARC Monogr. Eval. Carcinog.*

Risks Hum., **1999**, *71*, 1393-1400.

- [9] International Agency for Research on Cancer (IARC). Carcinogenicity of perfluorooctanoic acid, tetrafluoroethylene, dichloromethane, 1,2-dichloropropane, and 1,3-propane sultone. *Lancet Oncology*. Available at [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70316-x](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70316-x) (accessed August, 2014).
- [10] International Agency for Research on Center (IARC). Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part two). *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, **1999**, *71*, 589-602.
- [11] National Institute of Health Sciences (NIHS). NIHS Acute Exposure Guideline Level. Chloroform, NIHS: Tokyo, 1993. Available at http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/aegl/agj/ag_Chloroform.pdf (accessed November, 2014). (In Japanese).
- [12] Chemiclas Evaluation and Research Institute (CERI). CERI Hazard Assessment Report. 1,2-Dichloroethane, CERI: Tokyo, 2004. Available at http://www.cerij.or.jp/evaluation_document/yugai/107_06_2.pdf (accessed November, 2014). (In Japanese).
- [13] Chemiclas Evaluation and Research Institute (CERI). CERI Hazard Assessment Report. 1,2-Dichloropropane, CERI: Tokyo, 2004. Available at http://www.cerij.or.jp/evaluation_document/yugai/78_87_5.pdf (accessed November, 2014). (In Japanese).
- [14] Chemiclas Evaluation and Research Institute (CERI). CERI Hazard Assessment Report. 1,4-Dioxne, CERI: Tokyo, 2004. Available at http://www.cerij.or.jp/evaluation_document/yugai/123_91_1.pdf (accessed November, 2014). (In Japanese).
- [15] Chemiclas Evaluation and Research Institute (CERI). CERI Hazard Assessment Report. Chloroform, CERI: Tokyo, 2004. Available at http://www.cerij.or.jp/evaluation_document/yugai/67_66_3.pdf (accessed November, 2014). (In Japanese).
- [16] American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), *Threshold Limit Values & biological Exposure Indices*; ACGIH: Cincinnati, OH, 2014.
- [17] Japan Society for Occupational Health (JSOH), *Recommendation of Occupatinal*

- Exposure Limits, JSOH: Tokyo, 2014. Available at http://joh.sanei.or.jp/pdf/J56/J56_5_10.pdf (accessed November, 2014). (In Japanese).
- [18] Chloroform-d1. MSDS Number C2921. Available at <http://siri.org/msds/mf/baker/files/c2921.htm> (accessed July, 2014).
- [19] 1,4-Dioxane-d8. Scharlau. Available at http://www.scharlabmagyarorszag.hu/katalogus/DI1295_TDS.pdf (accessed July, 2014).
- [20] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Chloroform. ATSDR. **1997**. Available at www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp6.html (accessed July, 2013).
- [21] Ministry of the Environment Government of Japan. Pollutant Release and Transfer Register. Tokyo: Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Ministry of the Environment Government of Japan. 2011. Available at www.env.go.jp/en/chemi/prtr/substances/index.html (accessed July, 2013).
- [22] Andelman, J.B. Human exposures to volatile halogenated organic chemicals in indoor and outdoor air. *Environ. Health Perspect.*, **1985**, *62*, 313-318.
- [23] Ministry of the Environment Government of Japan. Chemicals in the Environment, Fiscal year 2002. Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Ministry of the Environment Government of Japan: Tokyo, 2003 (In Japanese).
- [24] Schoeny, R.; Haber, L.; Dourson, M. Data considerations for regulation of water contaminants. *Toxicology*, **2006**, *221*, 217-224.
- [25] World Health Organization (WHO). Trihalomethanes in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. WHO/SDE/WSH/05.08/64. WHO: Geneva, 2005.
- [26] Boorman, G.A.; Dellarco, V.; Dunnick, J.K.; Chapin, R.E.; Hunter, S.; Hauchman, F.;

- Gardner, H.; Cox, M.; Sills, R.C. Drinking water disinfection byproducts: review and approach to toxicity evaluation. *Environ. Health Perspect.*, **1999**, *107*, 207-217.
- [27] Riederer, A.M.; Bartell, S.M.; Ryan, P.B. Predictors of personal air concentrations of chloroform among US adults in NHANES 1999-2000. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, **2009**, *19*, 248-259.
- [28] Yamamoto, S.; Kasai, T.; Matsumoto, M.; Nishizawa, T.; Arito, H.; Nagano, K.; Matsushima, T. Carcinogenicity and chronic toxicity in rats and mice exposed to chloroform by inhalation. *J. Occup. Health*, **2002**, *44*, 283-293.
- [29] National Cancer Institute (NCI). Report on carcinogenesis bioassay of chloroform. NTIS PB-264-018; National Cancer Institute: Bethesda, MD, 1976.
- [30] Jorgenson, T.A.; Meierhenry, E.F.; Rushbrook, C.J.; Bull, R.J.; Robinson, M. Carcinogenicity of chloroform in drinking water to male Osborne-Mendel rats and female B6C3F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1985**, *5*, 760-769.
- [31] Nagano, K.; Kano, H.; Arito, H.; Yamamoto, S.; Matsushima, T. Enhancement of renal carcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to chloroform in male rats. *J. Toxicol. Environ. Health Pt. A*, **2006**, *69*, 1827-1842.
- [32] World Health Organization (WHO). 1,2-Dichloroethane. Environmental Health Criteria No 176. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva: WHO, 1995.
- [33] Ministry of the Environment Government of Japan. Pollutant Release and Transfer Register. Tokyo: Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Ministry of the Environment Government of Japan. **2010**. Available at www.env.go.jp/en/chemi/prtr/substances/index.html (accessed July, 2012).
- [34] Maltoni, C.; Valgimigli, L.; Scarnato, C. Long-term carcinogenic bioassays on ethylene dichloride administered by inhalation to rats and mice. In: Ames, B.; Infante, P.; Reitz, R., eds, *Ethylene Dichloride: A Potential Health Risk?* (Banbury Report No. 5), Cold Spring

Harbor, NY, CSH Press, 1980; 3-33.

- [35] Cheever, K.L.; Cholakis, J.M.; El-Hawari, A.M.; Kovatch, R.M.; Weisburger, E.K. Ethylene dichloride: The influence of disulfiram or ethanol on oncogenicity, metabolism, and DNA covalent binding in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1990**, *14*, 243-261.
- [36] Nagano, K.; Umeda, Y.; Senoh, H.; Gotoh, K.; Arito, H.; Yamamoto, S.; Matsushima, T. Carcinogenicity and chronic toxicity in rats and mice exposed by inhalation to 1,2-dichloroethane for two years. *J. Occup. Health*, **2006**, *48*, 424-436.
- [37] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1,2-Dichloropropane. ATSDR: Atlanta, GA, 1999. Available at www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp134-C2.pdf (accessed January, 2014).
- [38] Ministry of the Environment Government of Japan. Pollutant Release and Transfer Register. Tokyo: Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Ministry of the Environment Government of Japan. 2011. Available at www.env.go.jp/en/chemi/prtr/substances/index.html (accessed January, 2014).
- [39] Kumagai, S.; Kurumatani, N.; Arimoto, A.; Ichihara, G. Cholangiocarcinoma among offset colour proof-printing workers exposed to 1,2-dichloropropane and/or dichloromethane. *Occup. Environ. Med.*, **2013**, *70*, 508-510.
- [40] National Toxicology Program (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of 1,2-dichloropropane (propylene dichloride) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (gavage studies). NTP Technical Report Series No. 263. NTP: Bethesda, 1986.
- [41] Matsumoto, M.; Umeda, Y.; Take, M.; Nishizawa, T.; Fukushima, S. Subchronic toxicity and carcinogenicity studies of 1,2-dichloropropane inhalation to mice. *Inhal. Toxicol.*, **2013**, *25*, 435-443.
- [42] Umeda, Y.; Matsumoto, M.; Aiso, S.; Nishizawa, T.; Nagano, K.; Arito, H.; Fukushima, S. Inhalation carcinogenicity and toxicity of 1,2-dichloropropane in rats. *Inha. Toxicol.*,

2010, 22, 1116-1126.

- [43] Lewis, R. J. Hawley's Condensed Chemical Dictionary, 12th Edition; Van Nostrand Reinhold Company: New York, 1993; 426.
- [44] M. J. O'Neil. The Merck Index, 14th Edition; Merck & Co., Inc.: Whitehouse Station, NJ, 2006; 559.
- [45] National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Criteria for a Recommended Standard Occupational Exposure to Dioxane. NIOSH: Cincinnati, OH, 1977.
- [46] World Health Organization (WHO). 1,4-Dioxane in Drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. WHO/SDE/WSH/05.08/120. WHO: Geneva, 2005. Available at http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/14dioxane0505.pdf (accessed November, 2010).
- [47] European Chemicals Bureau (ECB). European Union Risk Assessment Report, Vol. 21. ECB: Ispra, 2002. Available at http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/dioxanereport038.pdf (accessed November, 2010).
- [48] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for 1,4-Dioxane. ATSDR: Atlanta, GA, 2007. Available at <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp187-c6.pdf> (accessed November, 2010).
- [49] US Environmental Protection Agency (US EPA). Toxicological Review of 1,4-Dioxane. US EPA: Washington, DC, 2010. Available at <http://www.epa.gov/ncea/iris/toxreviews/0326tr.pdf> (accessed November, 2010).
- [50] Ministry of the Environment Government of Japan. Pollutant Release and Transfer Register. Tokyo: Ministry of the Environment Government of Japan. 2008. Available at <http://www.env.go.jp/en/chemi/prtr/prtr.html> (accessed November, 2010).

- [51] Kasai, T.; Kano, H.; Umeda, Y.; Sasaki, T.; Ikawa, N.; Nishizawa, T.; Nagano, K.; Arito, H.; Nagashima, H.; Fukushima, S. Two-year inhalation study of carcinogenicity and chronic toxicity of 1,4-dioxane in male rats. *Inhal. Toxicol.*, **2009**, *21*, 889-897.
- [52] Argus, M. F.; Arcos, J. C.; Hoch-Ligeti, C. Studies on the carcinogenic activity of protein-denaturing agents: Hepatocarcinogenicity of dioxane. *J. Nat. Cancer Inst.*, **1965**, *35*, 949-958.
- [53] Hoch-Ligeti, C.; Argus, M. F.; Arcos, J. C. Induction of carcinomas in the nasal cavity of rats by dioxane. *Brit. J. Cancer.*, **1970**, *24*, 164-167.
- [54] Argus, M. F.; Sohal, R. S.; Bryant, G. M.; Hoch-Ligeti, C.; Arcos, J. C. Dose-response and ultrastructural alterations in dioxane carcinogenesis. *Europ. J. Cancer.*, **1973**, *9*, 237-243.
- [55] Kociba, R. J.; McCollister, S. B.; Park, C.; Torkelson, T. R.; Gehring, P. J. 1,4- Dioxane. I. Results of a 2-year ingestion study in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1974**, *30*, 275-286.
- [56] National Cancer Institute (NCI). Bioassay of 1,4-dioxane for possible carcinogenicity. technical report series No. 80. NCI: Bethesda, MD, 1978.
- [57] Kano, H.; Umeda, Y.; Kasai, T.; Sasaki, T.; Matsumoto, M.; Yamazaki, K.; Nagano, K.; Arito, H.; Fukushima, S. Carcinogenicity studies of 1,4-dioxane administered in drinking-water to rats and mice for 2 years. *Food Chem. Toxicol.*, **2009**, *47*, 2776-2784.
- [58] National Research Council (NRC). Guide for the care and use of laboratory animals; National Academy Press: Washington, DC, 1996.
- [59] Chemiclas Evaluation and Research Institute (CERI). CERI News No.51. CERI: Tokyo, 2005. Available at http://www.cerij.or.jp/cerinews/cn_pdf/cerinews_051.pdf (accessed October, 2008). (In Japanese).
- [60] Kaneko, T.; Wang, P.-Y.; Tsukada, H.; Sato, A. *m*-Xylene toxicokinetics in phenobarbital-treated rats: comparison among inhalation exposure, oral administration,

- and intraperitoneal administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1995**, *131*, 13-20.
- [61] Wang, P.-Y.; Kaneko, T.; Sato A.; Charboneau, M.; Plaa, G.L. Dose- and route-dependent alteration of metabolism and toxicity of chloroform in fed and fasting rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1995**, *135*, 119-126.
- [62] Hori, H.; Ishidao, T.; Oyabu, T.; Yamato, H.; Morimoto, Y.; Tanaka, I. Effect of simultaneous exposure to methanol and toluene vapor on their metabolites in rats. *J. Occup. Health*, **1999**, *41*, 149-153.
- [63] World Health Organization (WHO). Environmental Health Criteria 163 Chloroform. International Programme on Chemical Safety (IPCS). WHO: Geneva, 1995.
- [64] Ministry of the Environment Government of Japan. Guideline for the initial risk assessment of chemicals. Tokyo: Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Ministry of the Environment Government of Japan: Tokyo, 2013. Available at <http://www.env.go.jp/chemi/report/h24-02/pdf/chpt1/1-2-1.pdf> (accessed July, 2013). (In Japanese).
- [65] Wang, P.-Y.; Kaneko, T.; Tsukada H.; Sato A. Dose and route dependency of metabolism and toxicity of chloroform in ethanol-treated rats. *Arch. Toxicol.*, **1994**, *69*, 18-23.
- [66] Withey, J.R.; Collins, B.T.; Collins, P.G. Effect of vehicle on the pharmacokinetics and uptake of four halogenated hydrocarbons from the gastrointestinal tract of the rat. *J. Appl. Toxicol.*, **1983**, *3*, 249-253.
- [67] Take, M.; Yamamoto, S.; Ohnishi, M.; Matsumoto, M.; Nagano, K.; Hirota, T.; Fukushima, S. Chloroform distribution and accumulation by combined inhalation plus oral exposure routes in rats. *J. Environ. Sci. Health Pt. A*, **2010**, *45*, 1616-1624.
- [68] Take, M.; Ohnishi, M.; Nagano, K.; Yamamoto, S.; Fukushima, S. Design and performance of a system for blood collection of rats under whole-body inhalation

- exposure. *J. Toxicol. Sci.*, **2009**, *34*, 221-226.
- [69] Rozman, K.K.; Klaassen, C.D. Absorption, distribution, and excretion of toxicants. Casarett & Doull's Toxicology, 6th Ed.; McGraw-Hill Companies, Inc.: New York, 2001; 91-111.
- [70] Sasso, A.F.; Schlosser, P.M.; Kedderis, G.L.; Genter, M.B.; Snawder, J.E.; Li, Z.; Rieth, S.; Lipscomb, J.C. Application of an updated physiologically based pharmacokinetic model for chloroform to evaluate CYP2E1-mediated renal toxicity in rats and mice. *Toxicol. Sci.*, **2013**, *131*, 360-374.
- [71] United States Environmental Protection Agency (US EPA). Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. EPA 630/R-00/002, 2000.
- [72] Morgan, D.L.; Cooper, S.W.; Carlock, D.L.; Sykora, J.J.; Sutton, B.; Mattie, D.R.; McDougal, J.N. Dermal absorption of neat and aqueous volatile organic chemicals in the Fischer 344 rat. *Environ. Res.*, **1991**, *55*, 51-63.
- [73] Islam, M.S.; Zhao, L.; Zhou, J.; Dong, L.; McDougal, J.N.; Flynn, G.L. Systemic uptake and clearance of chloroform by hairless rats following dermal exposure: II. Absorption of the neat solvent. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **1999**, *60*, 438-443.
- [74] Cohen, E. N.; Hood, N. Application of low-temperature autoradiography to studies of the uptake and metabolism of volatile anesthetics in the mouse. I. chloroform. *Anesthesiology*, **1969**, *30*, 306-314.
- [75] Taylor, D.C.; Brown, D.M.; Keeble, R.; Langley, P.F. Metabolism of chloroform- II. A sex difference in the metabolism of [¹⁴C]chloroform in mice. *Xenobiotica*, **1974**, *4*, 165-174.
- [76] Corley, R.A.; Mendrala, A.L.; Smith, F.A.; Staats, D.A.; Gargas, M.L.; Conolly, R.B.; Andersen, M.E.; Reitz, R.H. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for chloroform. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1990**, *103*, 512-527.

- [77] Enosawa, S.; Nakazawa, Y. Changes in cytochrome P450 molecular species in rat liver in chloroform intoxication. *Biochem. Pharmacol.*, **1986**, *35*, 1555-1560.
- [78] Testai, E.; Vittozzi, L. Biochemical alterations elicited in rat liver microsomes by oxidation and reduction products of chloroform metabolism. *Chem. -Biol. Interact.*, **1986**, *59*, 157-171.
- [79] Brady, J.F.; Li, D.; Ishizaki, H.; Lee, M.; Ning, S.M.; Xiao, F.; Yang, C.S. Induction of cytochromes P450IIE1 and P450IIB1 by secondary ketones and the role of P450IIE1 in chloroform metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1989**, *100*, 342-349.
- [80] Take, M.; Ohnishi, M.; Nagano, K.; Yamamoto, S.; Fukushima, S. Estimation of inhalation from oral gavage administration by blood chloroform and toluene concentration in rat. Proceedings of 16th Symposium on Environmental Chemistry, Kitakyushu, Fukuoka, Japan, June 20-22, 2007; Japan Society for Environmental Chemistry: Tsukuba, Ibaraki, Japan, 2007; 698-699 (in Japanese).
- [81] Spreafico, F.; Zuccato, E.; Marcucci, F.; Sironi, M.; Paglialunga, S.; Madonna, M.; Mussini, E. Pharmacokinetics of ethylene dichloride in rats treated by different routes and its long-term inhalatory toxicity. In: Ames, B.; Infante, P.; Reitz, R., eds, *Ethylene Dichloride: A Potential Health Risk?* (Banbuy Report No. 5), Cold Spring Harbor, NY, CSH Press, 1980; 107-133
- [82] Reitz, R.H.; Fox, T.R.; Ramsey, J.C.; Quast, J.F.; Langvardt, P.W.; Watanebe, P.G. Pharmacokinetics and macromolecular interactions of ethylene dichloride in rats after inhalation or gavage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1982**, *62*, 190-204.
- [83] Mitoma, C.; Steeger, T.; Jackson, S.E.; Wheeler, K.P.; Rogers, J.H.; Milman, H.A. Metabolic disposition study of chlorinated hydrocarbons in rats and mice. *Drug Chem. Toxicol.*, **1985**, *8*, 183-194.
- [84] Igwe, O.J.; Que Hee, S.S.; Wagner, W.D. Urinary thioether biological monitoring in the

- interaction between 1,2-dichloroethane and disulfiram in sprague-dawley rats. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **1988**, *49*, 10-16.
- [85] Payan J.P.; Beydon, D.; Fabry, J.P.; Brondeau, M.T.; Ban, M.; de Ceaurriz, J. Urinary thiodiglycolic acid and thioether excretion in male rats dosed with 1,2-dichloroethane. *J. Appl. Toxicol.*, **1993**, *13*, 417-422.
- [86] Timchalk, C.; Dryzga, M. D.; Smith, F. A.; Bartels, M. J. Disposition and metabolism of [¹⁴C]1,2-dichloropropane following oral and inhalation exposure in Fischer 344 rats. *Toxicology*, **1991**, *68*, 291-306.
- [87] Guengerich, F.P.; Crawford, Jr, W.M.; Domoradzki, J.Y.; Macdonald, T.L.; Watanabe, P.G. In vitro activation of 1,2-dichloroethane by microsomal and cytosolic enzymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1980**, *55*, 303-317.
- [88] Lin, E.L.C.; Mattox, J.K.; Pereira, M.A. Glutathione plus cytosol- and microsome-mediated binding of 1,2-dichloroethane to polynucleotides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1985**, *78*, 428-435.
- [89] Igwe, O.J.; Que Hee, S.S.; Wagner, W.D. Interaction between 1,2-dichloroethane and tetraethylthiuram disulfide (disulfiram) II. Hepatotoxic manifestations with possible mechanism of action. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1986**, *86*, 286-297.
- [90] Guengerich, F.P.; Kim, D-H.; Iwasaki, M. Role of human cytochrome P-450 II E1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.*, **1991**, *4*, 168-179.
- [91] Meulenbergh, C.J.W.; Vijverberg, H.P.M. Empirical relations predicting human and rat tissue:air partition coefficients of volatile organic compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2000**, *165*, 206-216.
- [92] Ohnishi, M.; Umeda, Y.; Katagiri, T.; Kasai, T.; Ikawa, N.; Nishizawa, T.; Fukushima, S. Inhalation carcinogenicity of 1,1,1-trichloroethane in rats and mice. *Inha. Toxicol.*, **2013**,

25, 298-306.

- [93] Aiso, S.; Take, M.; Kasai, T.; Senoh H.; Umeda, Y.; Matsumoto, M.; Fukushima, S.
Inhalation carcinogenicity of dichloromethane in rats and mice. *Inha. Toxicol.*, **2014**, *26*,
435-451.
- [94] International Agency for Research on Cancer (IARC). Some halogenated hydrocarbons
and pesticide exposures. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum.*, **1986**, *41*,
131-147.
- [95] Rodriguez, C.E.; Mahle, D.A.; Gearhart, J.M.; Mattie, D.R.; Lipscomb, J.C.; Cook, R.S.;
Barton, H.A. Predicting age-appropriate pharmacokinetics of six volatile organic
compounds in the rat utilizing physiologically based pharmacokinetic modeling. *Toxicol.*
Sci., **2007**, *98*, 43-56.
- [96] Hutson, D.H.; Moss, J.A.; Pickering, B.A. The excretion and retention of components of
the soil fumigant D-D and their metabolites in the rat. *Fd.Cosmet. Toxicol.*, **1971**, *9*,
677-680.
- [97] Jones, A.R.; Gibson, J. 1,2-Dichloropropane: metabolism and fate in the rat. *Xenobiotica*,
1980, *10*, 835-846.
- [98] Bartels, M.J.; Timchalk, C. 1,2-Dichloropropane: Investigation of the mechanism of
mercapturic acid formation in the rat. *Xenobiotica*, **1990**, *20*, 1035-1042.
- [99] Take, M.; Takanobu, K.; Takeuchi, T.; Haresaku, M.; Matsumoto, M.; Nagano, K.;
Yamamoto, S.; Fukushima, S. Distribution of blood and tissue concentrations in rats by
inhalation exposure to 1,2-dichloroethane. *J. Environ. Sci. Health, Pt. A*, **2013**, *48*,
1031-1036.
- [100] Young, J. D.; Braun, W. H.; Gehring, P. J. The Dose-Dependent Fate of 1,4-Dioxane In
Rats. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **1978**, *2*, 263-282 .
- [101] Kasai, T.; Saito, M.; Senoh, H.; Umeda, Y.; Aiso, S.; Ohbayashi, H.; Nishizawa, T.;

- Nagano, K.; Fukushima, S. Thirteen-week inhalation toxicity of 1,4-dioxane in rats. *Inhal. Toxicol.*, **2008**, *20*, 961-971 .
- [102] Reitz, R. H.; McCroskey, P. S.; Park, C. N.; Andersen, M. E.; Gargas, M. L. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for risk assessment with 1,4-dioxane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1990**, *105*, 37-54 .
- [103] Leung, H. W.; Paustenbach, D. J. Cancer risk assessment for dioxane based upon a physiologically-based pharmacokinetic approach. *Toxicol. Lett.*, **1990**, *51*, 147-162 .
- [104] Krewski, D.; Withey, J. R.; Ku, L.-F.; Andersen, M. E. Applications of physiologic pharmacokinetic modeling in carcinogenic risk assessment. *Environ. Health Perspect.*, **1994**, *102*, 37-50.
- [105] Takano, R.; Murayama, N.; Horiuchi, K.; Kitajima, M.; Shono, F.; Yamazaki, H. Blood concentrations of 1,4-dioxane in humans after oral administration extrapolated from *in vivo* rat pharmacokinetics, *in vivo* human metabolism, and physiologically based pharmacokinetic modeling. *J. Health Sci.*, **2010**, *56*, 557-565 .
- [106] Ohbayashi, H.; Umeda, Y.; Senoh, H.; Kasai, T.; Kano, H.; Nagano, K.; Arito, H.; Fukushima, S. Enhanced hepatocarcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to *N,N*-dimethylformamide in male rats. *J. Toxicol. Sci.*, **2009**, *34*, 53-63.
- [107] Braun, W. H.; Young, J. D. Identification of β -Hydroxyethoxyacetic acid as the major urinary metabolite of 1,4-dioxane in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1977**, *39*, 33-38.
- [108] Woo, Y.-T.; Arcos, J. C.; Argus, M. F.; Griffin, G. W.; Nishiyama, K. Structural identification of p-dioxane-2-one as the major urinary metabolite of p-dioxane. *Arch. Pharmacol.*, **1977**, *299*, 283-287.
- [109] Woo, Y.-T.; Argus, M. F.; Arcos, J. C. Effect of mixed-function oxidase modifiers on metabolism and toxicity of the oncogen dioxane. *Cancer Res.* **1978**, *38*, 1621-1625.
- [110] Nannelli, A.; Rubertis, A. D.; Longo, V.; Gervasi, P. G. Effects of dioxane on

cytochrome P450 enzymes in liver, kidney, lung and nasal mucosa of rat. Arch. Toxicol., **2005**, 79,74-82 .

[111] United States Army Public Health Command (US APHC). Studies on Metabolism of 1,4-Dioxane, Toxicology Report No. 87-XE-08WR-09. US APHC: Aberdeen Proving Ground, MD, 2010. Available at <http://handle.dtic.mil/100.2/ADA528633> (accessed December, 2010).

総括

著者は本研究論文で吸入暴露装置の開発と揮発性有機化合物の体内動態研究について述べた。

揮発性有機化合物(VOC)は高い揮発性があり、主にヒトでは呼気により吸入経路から体内に吸収される。従って、健康影響評価は吸入暴露実験の結果に基づいて行う必要がある。従来、小動物を用いた VOC の急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性と発がん性等の吸入暴露試験が実施され、リスク評価に活用されている。

VOC のヒトへの健康影響を評価するためには、吸入暴露実験での血液中 VOC 濃度の研究も重要な研究課題である。吸入暴露実験は VOC を気化させ、吸入暴露装置に収容した動物に VOC 蒸気を吸わせることにより、吸入暴露を行う。その吸入暴露実験は、吸入暴露期間(動物に VOC を一定時間、吸入暴露する時間)と吸入暴露終了後(小動物に VOC の吸入暴露を終了した後、清浄空気を吸わせる時間)の 2 つの期間に分けて実験を実施している。

従来の吸入暴露実験を用いた吸入暴露装置では、構造面、安全面等から吸入暴露期間での採血は困難であった。また、吸入暴露期間、動物を装置内から取り出して採血したとしても、揮発性の高い VOC は呼気排泄、動物が清浄空気を呼吸する要因等で血液中 VOC 濃度が低下し、吸入暴露濃度に対応した正確な血液中濃度が反映されなかった。従って、従来の吸入暴露実験の血液中 VOC 濃度の研究は、吸入暴露終了後の結果についての報告が一般的である。

本研究で開発した吸入暴露装置の新規性は、従来の装置では困難であった吸入暴露期間中、動物に VOC を暴露しながら血液サンプルを採取できることである。この装置の開発により、吸入暴露実験における吸入暴露期間の VOC の血液中濃度を測定でき、体内に取り込まれた VOC の動態が明らかとなる。吸入暴露終了後の血液中濃度とともに評価すれば、従来の吸入暴露装置では不可能であった VOC の体内暴露量が明確になり、詳細な体内動態を把握することが可能となる。更に、本装置を用いた吸入暴露実験で VOC の組織中濃度

を測定することで、体内での VOC の分布、蓄積がこれまで以上に明確になる。その血液、組織中濃度の結果は、吸入暴露での生理学的薬物動態(PBPK)モデル、毒性メカニズムを解明するためのデータとして大いに活用できる。

本装置の開発により、VOC の吸入暴露によるヒトへのリスクアセスメントのための基本的なデータ、作業現場や一般生活環境等の VOC 濃度の規制等の有用なデータとして活用が可能となる。更に、開発した装置で得られたデータは、ヒトに対する VOC の発がん性のメカニズム解析にも活用できる情報である。

開発した吸入暴露装置の性能について、代表的な VOC であるクロロホルム(CHCl_3)を用いて検証し、吸入暴露環境の再現性を得た。次に、吸入暴露期間中に、動物から血液サンプルを採取し測定した結果、血液中に CHCl_3 が検出された。このことにより、吸入暴露によって CHCl_3 が動物体内に吸収されたことが確認できた。本装置の開発により、吸入暴露期間、動物から血液を採取することができ、VOC の体内動態の研究が可能となった。

近年、日本の環境省は化学物質の環境リスク初期評価ガイドラインにおいて、経口投与用量と吸入暴露濃度の相互変換の必要性について提言している。その研究の 1 つとして、他の投与経路から吸入暴露等価濃度を推定することは投与量の効果を理解するために重要な研究課題である。しかしながら、血液中濃度に関する吸入暴露研究のデータが少ないため、経口投与用量と吸入暴露濃度の相互変換の研究は困難であった。

本研究では CHCl_3 について吸入暴露濃度を 4 濃度設定して、吸入暴露期間と吸入暴露終了後の血液中濃度の経時変化と時間曲線下面積(AUC)の研究を実施した。その結果、吸入暴露濃度と AUC の関係に良好な相関関係が得られ、その関係から他の投与経路を吸入暴露等価濃度へ推定することが可能となった。

著者の所属機関である中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター(以下、当センター)において、 CHCl_3 をラットに 2 年間の複数投与(吸入暴露+経口投与)試験を実施した。その結果、腎臓の毒性と腫瘍発生が顕著に認められた。しかしながら、複数投与で CHCl_3 を投与した場合、各投与経路での CHCl_3 が体内で混合するため、各投与経路の体

内動態を把握することは不可能であった。

CHCl_3 の複数投与での体内動態研究を実施するため、 CHCl_3 の安定同位体 (CDCl_3) を用いることに着目した。本研究では吸入暴露で CHCl_3 、経口投与で CDCl_3 を用いて動物に投与し、血液、組織サンプルを質量分析計を用いて異なるフラグメントピークを設定し、各投与経路における血液、組織中濃度を測定した。更に、単独吸入暴露、単独経口投与試験についても実施した。その結果、複数投与での各投与経路の組織は、各単独投与経路に比べ顕著に高い濃度を示した。以上の結果、複数投与での各投与経路の血液、組織中 CHCl_3 の分布と蓄積が明らかになった。特に、他の組織に比べ脂肪への高い蓄積が認められた。

当センターにおいて、1,2-ジクロロエタン (DCE)、1,2-ジクロロプロパン (DCP) をラットに 2 年間の吸入暴露試験を実施し、発がん性が認められた。その体内動態を把握するため、DCE、DCP の吸入暴露による血液、組織中濃度の研究を実施した。

また、当センターにおいて、1,4-ジオキサン (DX) をラットに 2 年間の吸入暴露試験、経口投与試験を実施し、発がん性が認められた。その体内動態を把握するため、DX の複数投与 (吸入暴露+経口投与) による各投与経路の血液、組織中濃度の研究を実施した。

DCE、DCP の吸入暴露による体内動態の結果、各物質とも脂肪への高い分布、蓄積が認められた。また、各採取時間での各物質の血液、組織中濃度の比率 (各組織/血液) と分配係数の分配比を比較した結果、採取時間ごとの体内分布が明らかになった。

DX の複数投与による体内動態研究は、 CHCl_3 の複数投与研究と同様、DX と DX の安定同位体 (DX- d_8) を使用して試験を実施した。その結果、複数投与による各投与経路の血液、組織は、各単独投与経路に比べ顕著に高い濃度を示した。複数投与による DX、DX- d_8 の非常に高い体内分布は、代謝能力の飽和が要因であると示唆された。DX の各組織への分布、蓄積は、 CHCl_3 、DCE、DCP とは異なっていた。DX は水、油双方に溶ける物性であるが、 CHCl_3 、DCE、DCP は脂溶性で水には難溶である。更に、各組織の DX の分配係数は CHCl_3 、DCE、DCP に比べ高値であることが要因で各組織にほぼ均等に分布、蓄積が認め

られたと考えられる。

第二章で述べた吸入暴露装置の開発により、吸入暴露期間の血液、組織中 VOC 濃度が明らかになった。第四、五章で述べた CHCl₃、DCE、DCP、DX の吸入暴露した血液、組織中濃度を各組織/血液の比率にした結果と分配係数から求めた各組織/血液の比率にした結果について、下記の Table に示した。

	Partition coefficient (Ratio)		Collection time									
			During exposure period					After end of exposure period				
			15	30	60	180	360	30	60	120	180	1080 (min)
CHCl ₃ 100ppm												
Blood	20.8	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		
Liver	21.1	1.01	0.73	0.53	0.68	0.60	0.68	0.40		0.27		
Abdominal fat	203	9.76	5.70	3.97	5.66	8.29	11.63	11.36		9.20		
Kidney	—	—	0.46	0.43	0.48	0.41	0.37	0.24		0.11		
DCE 160ppm												
Blood	30.4	1.00		1.00	1.00	1.00	1.00		1.00	1.00		
Liver	35.7	1.17		0.98	0.91	1.12	1.15		0.79	0.30		
Abdominal fat	344	11.32		7.76	8.26	12.14	15.37		9.86	5.83		
Kidney	—	—		0.87	0.80	0.75	0.71		0.51	0.13		
DCP 80ppm												
Blood	18.7	1.00			1.00	1.00	1.00		1.00	1.00		
Liver	28.4	1.52			3.84	2.83	2.41		0.97	0.62		
Abdominal fat	499	26.68			24.76	42.17	49.98		35.32	33.38		
Kidney	—	—			2.52	2.40	1.71		0.90	0.43		
DCP 500ppm												
Blood	18.7	1.00			1.00	1.00	1.00		1.00	1.00		
Liver	28.4	1.52			2.76	3.23	3.26		1.99	0.95		
Abdominal fat	499	26.68			10.45	33.61	46.26		52.01	47.86		
Kidney	—	—			1.92	2.07	2.10		1.80	0.72		
DX 250ppm												
Blood	1850	1.00			1.00	1.00	1.00		1.00	1.00		
Liver	1557	0.84			2.53	1.20	0.92		1.03	1.17		
Abdominal fat	851	0.46			1.15	0.89	0.57		0.61	0.58		
Kidney	—	—			3.10	1.38	0.92		1.02	1.38		

吸入暴露濃度は異なるが、 CHCl_3 、DCE は脂肪への蓄積が認められ、吸入暴露期間中、分配係数の脂肪/血液より、高値を示した採取時間もあつた。80、500ppm を暴露した DCP も脂肪への蓄積が認められたが、肝臓でも高値を示した。80ppm を暴露した DCP に関しては、 CHCl_3 、DCE に対して血液の分配係数が低く、脂肪の分配係数が高いため、体内での血液による他の組織への輸送の遅延があり、脂肪への蓄積が高いことから DCE、 CHCl_3 より DCP の代謝、排出によるラット体内のクリアランスは、DCE、 CHCl_3 より遅いことが示唆される。また、500ppm を暴露した DCP に関しては、高い吸入暴露濃度のため、更に DCP の代謝、排出によるラット体内のクリアランスの遅延を生じ、吸入暴露終了後 1080 分まで体内に DCP が認められたと考えられる。

DX に関しては、Table に示した血液、各組織での分配係数が CHCl_3 、DCE、DCP より非常に高いことから、 CHCl_3 、DCE、DCP で認められた脂肪への局所的な分布とは異なり、各組織の分布は、ほぼ均一であつた。また、肝臓、脂肪に比べ血液の分配係数が高いことから、血液から輸送された各組織の DX は、血液を介して他の組織へ輸送されるため、各採取時間での各組織/血液の比率と分配係数の各組織/血液の比率がほぼ一致する値であつたと推測できる。

各 VOC の分布と発がん性の関係について下記に述べる。

1. CHCl_3

当センターで雄ラットを使用した 2 年間の複数投与(吸入暴露+経口投与)研究では、腎臓で CHCl_3 毒性と腫瘍が著しい発生が認められた。第四章で述べた各単独投与に対して複数投与の肝臓、腎臓、脂肪で著しい高濃度を示した。特に、腎臓の単独経口投与グループに対する複数投与グループの経口投与経路の AUC_{0-480} 値の比率が、2.23 倍であり、血液(1.32 倍)、肝臓(1.66 倍)、脂肪(1.76 倍)より高値であることが、ラット腎臓の腫瘍発生の顕著な増加と関連するかもしれない。また、脂肪への高い蓄積によるラット体内での代謝、排泄の遅延の影響が発がん性との関連があるかもしれない。

2. DCE

当センターで雄ラットを使用した2年間の吸入暴露試験でDCEの160ppmの暴露濃度で腹膜の中皮腫の顕著な増加が観察された。第五章で述べたDCEの体内動態において、脂肪で著しい高濃度が認められた。特に、吸入暴露期間180、360分において、脂肪中DCE濃度/血液中DCE濃度の比率は、DCEの分配係数での脂肪/血液の比率に対して高値を示した。この脂肪へのDCEの蓄積が、吸入暴露によるDCE蒸気に暴露したラットの腹膜の中皮腫に何か関連があるかもしれない要因の1つとして考えられる。

3. DCP

当センターで雄ラットを使用した2年間の吸入暴露試験でDCPの500ppmの暴露濃度で鼻腔の腫瘍の顕著な増加が観察された。第五章で述べたDCPの体内動態において、500ppmとも脂肪で著しい高い濃度が認められた。500ppmでは吸入暴露期間180、360分と吸入暴露終了後のすべての採取時間において、脂肪中DCP濃度/血液中DCP濃度の比率は、DCPの分配係数での脂肪/血液の比率に対して高値を示し、肝臓でも高値が観察された。また、吸入暴露終了後1080分においてもDCPがラット体内に認められた。しかしながら、この体内動態研究では、鼻腔のDCP濃度を調べていないので、雄ラットで認められた鼻腔の腫瘍とDCPの体内動態の関係は分からない。

4. DX

DXの体内動態を実施した暴露濃度、投与用量では、当センターで雄ラットを使用した2年間の吸入暴露、経口試験とも腹膜の中皮腫の増加が観察された。更に、高暴露濃度の吸入試験と高投与用量での経口試験とも、腹膜の中皮腫、鼻腔、肝臓の腫瘍増加が観察された(当センターで雄ラットを使用した2年間の吸入暴露、経口試験)。また、他の文献では、DXの経口投与による鼻腔、肝臓、腎臓、皮下組織、乳腺等の腫瘍の顕著な増加が報告されている。DXの血液、各組織は、 CHCl_3 、DCE、DCPに比べ、ほぼ均一に分布していた。従って、DXの発がん性と臓器の関連は、あらゆる組織に腫瘍の発生が疑われるかもしれない。

次に、VOC の体内動態とヒトへのリスク評価の関係について述べる。VOC のヒトへのリスク評価を行う 1 つの手段として、血液、組織中濃度、分配係数、AUC、半減期、クリアランス等のデータを使用して PBPK モデルを算出する。その結果より、VOC の体内暴露量を推定し、ヒトへの VOC のリスクを評価する。しかしながら、VOC の主な暴露ルートである呼気から体内に吸収される VOC に関する吸入暴露期間での体内動態の報告は極めて少ない。従って、我々は吸入暴露期間での体内動態を把握するために吸入暴露装置を開発し、吸入暴露期間、吸入暴露終了後の VOC の血液・組織中濃度から AUC 値を求めた。この結果は、VOC の PBPK モデルを算出できるデータであり、ヒトへのリスク評価に活用できる 1 つの手段である。

以上、新たな吸入暴露装置を開発したことにより、これまで研究されていなかった VOC の吸入暴露による体内動態の詳細な研究を実施することが可能になった。特に、吸入暴露期間での体内動態の研究は、従来の吸入暴露装置ではチャンバーの構造面、安全面等から体内動態を把握することは困難であった。VOC は揮発性が高いため、動物をチャンバーから取り出してサンプルを測定しても、吸入暴露濃度に対応した正確な体内動態が得られない。従って、吸入暴露装置を開発し、体内動態を研究した我々の結果は、非常に貴重なデータとして PBPK モデルに活用できる。更に、VOC の動物からヒトへ外挿できる 1 つのデータとして活用でき、ヒトへの健康影響評価が可能となるものと期待できる。

今後の展望として、開発した装置を用いて他の化学物質の体内動態の研究等に本研究の成果が寄与出来れば幸いである。

謝辞

本研究論文をまとめるにあたり、終始ご指導頂きました神奈川工科大学 工学部教授 高村 岳樹博士に深く感謝申し上げます。

また、ご指導頂きました神奈川工科大学 工学部教授 齋藤 貴博士、神奈川工科大学 応用バイオ科学部教授 清瀬 千佳子博士、神奈川工科大学 応用バイオ科学部教授 栗原 誠博士、静岡県立大学 大学院食品栄養環境科学研究所特任教授・食品環境研究センター長 若林 敬二博士に深く感謝申し上げます。

この研究について、下記の方々の多大なご協力を頂き、本研究をまとめる事が出来ました。ここに改めて感謝致します。

松島 泰次郎博士(前日本バイオアッセイ研究センター所長)

山本 静護博士(神奈川工科大学、元日本バイオアッセイ研究センター副所長)

長野 嘉介博士(前日本バイオアッセイ研究センター副所長)

また、日本バイオアッセイ研究センターの職員、協力会社の方々に感謝致します。

最後に、本研究をまとめるにあたり終始適切なご指導とご助言を賜りました日本バイオアッセイ研究センター所長 福島 昭治博士に心より感謝致します。