

アセト酢酸メチルのマウスを用いた経口投与による
13週間毒性試験（混水試験）報告書

試験番号： 0427

CAS No. 105-45-3

2003年3月31日

中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター

標 題

アセト酢酸メチルのマウスを用いた経口投与による 13 週間毒性試験（混水試験）

試験目的

アセト酢酸メチルの経口投与によるがん原性試験の投与濃度決定のため、アセト酢酸メチルをマウスに 13 週間経口（混水）投与して、その生体影響を検索した。

試験法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン 408（亜慢性経口毒性－げっ歯類：90 日間試験 1981 年 5 月 12 日採択）に準拠して実施した。

GLP 対応

試験は、昭和 63 年 9 月 1 日付け、労働省告示第 76 号の「試験施設が具備すべき基準」（一部改正、平成 12 年 3 月 29 日付け、労働省告示第 13 号）に準拠し、OECD GLP（1997 年 11 月 26 日採択）に準じて実施した。

試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課
東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

試験施設及び運営管理者

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
所長 松島 泰次郎
神奈川県秦野市平沢 2445 番地

アセト酢酸メチルのマウスを用いた経口投与による
13週間毒性試験（混水試験）報告書

試験番号： 0427

本文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料.....	2
I-1 被験物質の性状等.....	2
I-1-1 名称等	2
I-1-2 構造式、示性式、分子量	2
I-1-3 物理化学的性状等	2
I-2 被験物質の使用ロット等	2
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性	3
I-3-1 特性・同一性	3
I-3-2 安定性	3
I-4 試験動物	3
II 試験方法.....	4
II-1 投与	4
II-1-1 投与経路.....	4
II-1-2 被験物質の投与方法	4
II-1-3 投与期間.....	4
II-1-4 投与濃度.....	4
II-1-5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由	4
II-1-6 被験物質混合飲水の調製方法	5
II-1-7 調製時における被験物質混合飲水中の被験物質の濃度	5
II-1-8 被験物質混合飲水中の被験物質の安定性	5
II-1-9 被験物質の摂取量	5
II-2 動物管理	6
II-2-1 各群の使用動物数	6
II-2-2 群分け及び個体識別方法	6
II-2-3 飼育条件.....	6

II - 3 観察・検査項目及び方法	7
II - 3 - 1 動物の一般状態の観察	7
II - 3 - 2 体重測定	7
II - 3 - 3 摂水量測定	7
II - 3 - 4 摂餌量測定	7
II - 3 - 5 血液学的検査	8
II - 3 - 6 血液生化学的検査	8
II - 3 - 7 尿検査	8
II - 3 - 8 病理学的検査	8
(1) 剖検	8
(2) 臓器重量	8
(3) 病理組織学的検査	9
II - 4 数値処理と統計学的方法	9
II - 4 - 1 数値の取扱いと表示	9
II - 4 - 2 母数の取扱い	9
II - 4 - 3 統計方法	10
III 試験成績	11
III - 1 生死状況	11
III - 2 一般状態	11
III - 3 体重	11
III - 4 摂水量	11
III - 5 摂餌量	12
III - 6 被験物質摂取量	12
III - 7 血液学的検査	12
III - 8 血液生化学的検査	12
III - 9 尿検査	13
III - 10 病理学的検査	13
III - 10 - 1 剖検	13
III - 10 - 2 臓器重量	13
III - 10 - 3 病理組織学的検査	13
IV 考察及びまとめ	14
V 文献	16

要 約

アセト酢酸メチルのがん原性を検索する目的で、Crj:BDF₁マウスを用いて経口投与による2年間（104週間）のがん原性試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するために13週間試験を実施した。投与はアセト酢酸メチルを各投与濃度に調製した飲水の自由摂取で行った。1群当たりの動物数は、雌雄とも各10匹とし、被験物質投与群5群と対照群1群の計6群構成で行った。投与濃度は、雌雄とも2500 ppm、5000 ppm、10000 ppm、20000 ppm及び40000 ppm（公比2）とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重・摂水量・摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

試験の結果、雌雄とも全ての群で死亡はみられなかった。40000 ppm群では、雌で摂水量の減少が散見されたが、体重と摂餌量は、対照群とほぼ同様の推移を示した。雌雄とも血漿中の総蛋白とアルブミンの減少がみられたが、軽度な変化であった。その他、雌で尿素窒素とカルシウムの減少、雄の腎臓重量で体重比の高値がみられたが、剖検観察や病理組織学的検査において、腎臓での変化は認められなかった。

20000 ppm以下の群では、雌の10000 ppm群で総蛋白の減少がみられたが、被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

以上のように、アセト酢酸メチルの投与により、被験物質投与による明らかな毒性徴候は認められなかった。無毒性量は、雄の腎臓重量（体重比）と血液生化学的検査の指標値への影響をエンドポイントとして、20000 ppm（雄：2.270～4.314、雌：3.211～3.970 g/kg/day）であると考えられた。

以上の結果を考慮し、アセト酢酸メチルのがん原性試験投与濃度は、雌雄とも最高用量を20000 ppmとし、ラットとの種差も検討するために中間用量と低用量もラットのがん原性試験と同様の濃度（6325ppm、2000ppm）に設定した。

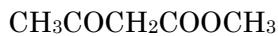
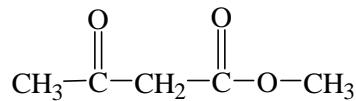
I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : アセト酢酸メチル (Methyl acetoacetate)
 IUPAC 名 : 3-オキソ酪酸メチル (Methyl 3-oxobutyrate)
 CAS No. : 105-45-3

I-1-2 構造式、示性式、分子量 (文献 1, 2)



分 子 量 : 116.12

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1, 2)

性 状 : 芳香のある無色透明の液体
 比 重 : 1.078 (20/4°C)
 融 点 : -80°C
 沸 点 : 171.7°C
 溶 解 性 : 水に可溶 (38g/100mL)
 保 存 条 件 : 室温で暗所に保存

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : GK01
 製 造 元 : 東京化成工業株式会社
 グ レ 一 ド : 東京化成一級
 純 度 : 99.7% (東京化成工業 (株) 試験成績書データ)

I - 3 被験物質の特性・同一性、安定性

I - 3-1 特性・同一性

被験物質の同一性の確認は、使用したアセト酢酸メチルについて、マススペクトルを質量分析計（Hewlett Packard 5989B）により測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（Shimadzu FTIR-8200PC）により測定し、アセト酢酸メチルの文献値と比較することにより行った。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値（文献3）と同じ分子イオン及びフラグメントピークを示し、また、赤外吸収スペクトルも文献値（文献4）と同じ波長にピークが認められ、被験物質はアセト酢酸メチルであることを確認した。

それらの結果については、APPENDIX M 1 に示した。

I - 3-2 安定性

被験物質の安定性の確認は、使用したアセト酢酸メチルについて、投与開始前及び投与終了後に、ガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 6890）により、ガスクロマトグラムを測定し、それぞれのデータを比較することにより行った。

その結果、使用開始前後の測定結果に差はみられず、投与期間中のアセト酢酸メチルは安定であることを確認した。

それらの結果については、APPENDIX M 2 に示した。

I - 4 試験動物

動物はアセト酢酸メチルのがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、日本チャーリス・リバー（株）（厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795 番地）より購入したCrj:BDF₁マウス（SPF）の雌雄を使用した。なお、がん原性試験で使用する動物は、遺伝的に安定していること、腫瘍の自然発生率が低いこと、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られていること等の理由からCrj:BDF₁マウスを使用することが決定している。

マウス雌雄各75匹を4週齢で導入し、各1週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で異常を認めない動物から、体重値の中央値に近い雌雄各60匹（投与開始時体重範囲、雄：21.5～24.0g、雌：17.7～20.0g）を選別し、試験に供した。

II 試験方法

II-1 投与

II-1-1 投与経路

経口投与

II-1-2 被験物質の投与方法

被験物質を飲水に添加し、設定濃度に調製した被験物質混合飲水を褐色ガラス製給水瓶に充填し、動物に自由摂取させた。

II-1-3 投与期間

2001年4月13日から2001年7月16日または17日までの13週間（95～96日間）、定期解剖直前まで連続投与した。なお、被験物質混合飲水の交換頻度は週に2回とした。

II-1-4 投与濃度

2500 ppm、5000 ppm、10000 ppm、20000 ppm 及び 40000 ppm の 5 段階（公比 2）の投与濃度を設定した。なお、対照群として飲水のみの群を設けた。

II-1-5 投与の方法、投与期間及び投与濃度の設定理由

被験物質は常温で液体であり、かつ、水に可溶であるため、混水による経口投与とした。投与期間はがん原性試験の投与濃度を決定するために13週間とした（文献5）。

各群の投与濃度は2週間の予備試験（文献6）の結果をもとに決定した。すなわち、2週間の予備試験では、6週齢のCrj:BDF₁マウス（SPF）の雌雄（各群5匹）に、2500 ppm、5000 ppm、10000 ppm、20000 ppm 及び 40000 ppm（公比 2）の濃度の被験物質混合飲水を2週間自由摂取させた。その結果、40000 ppm 群では、雌雄とも摂水量の僅かな減少傾向がみられ、雄では肝臓への影響がみられたもの、軽度の変化であった。20000 ppm 以下の群では、被験物質投与による影響はほとんどみられなかった。この結果から、マウスにおける13週間試験の最高用量は雌雄ともに40000 ppmと判断し、以下20000 ppm、10000 ppm、5000 ppm 及び 2500 ppm の 5 段階（公比 2）の濃度を設定した。

II-1-6 被験物質混合飲水の調製方法

フィルターろ過し、紫外線照射した市水を、脱イオン（以下、脱イオン水）し、更にフィルターろ過した飲水に被験物質を加え、マグネチックスターラ（池田理化（株）製 1S 3GL 型）を用いて各設定濃度になるように被験物質を溶解した。なお、試験における濃度の表示は ppm（重量対重量比）とした。また、調製頻度は給水瓶の交換頻度に合わせて毎週 2 回とした。

II-1-7 調製時における被験物質混合飲水中の被験物質の濃度

被験物質混合飲水中における被験物質の濃度は、各濃度毎に調製容器内から 3 点サンプリングし、ガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5890A）を用いて分析し、確認した。

その結果、各群の平均濃度は設定濃度に対し、93.0～101%の範囲にあり、ほぼ設定濃度通りに調製された。

それらの結果を APPENDIX M 3 に示した。

II-1-8 被験物質混合飲水中の被験物質の安定性

被験物質混合飲水中の被験物質の投与状態での安定性は、本試験の予備試験（文献 6）において、2500 ppm と 40000 ppm の被験物質混合飲水をマウス用給水瓶に充填し、動物飼育室内で室温保管（4 日間、10 日間）したものについて、ガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5890A）を用いて分析し、確認した。

その結果、調製時の濃度を 100%とした場合に、4 日目には、2500 ppm : 100%、40000 ppm : 102%、10 日目には、2500 ppm : 107%、40000 ppm : 101%であった。給水期間中における、飲水中の被験物質の安定性は良好に維持されていた。

それらの結果を APPENDIX M 4 に示した。

II-1-9 被験物質の摂取量

体重、摂水量及び設定濃度より被験物質の体重 kg 当りの 1 日摂取量 (g/kg body weight/day) を算出した。

II-2 動物管理

II-2-1 各群の使用動物数

投与群 5 群及び対照群 1 群の計 6 群を設け、雌雄各群 10 匹の動物を用いた。

雄		雌	
群 名 称	使用動物数 (動物番号)	群 名 称	使用動物数 (動物番号)
対 照 群	10 匹 (1001~1010)	対 照 群	10 匹 (2001~2010)
2500 ppm 群	10 匹 (1101~1110)	2500 ppm 群	10 匹 (2101~2110)
5000 ppm 群	10 匹 (1201~1210)	5000 ppm 群	10 匹 (2201~2210)
10000 ppm 群	10 匹 (1301~1310)	10000 ppm 群	10 匹 (2301~2310)
20000 ppm 群	10 匹 (1401~1410)	20000 ppm 群	10 匹 (2401~2410)
40000 ppm 群	10 匹 (1501~1510)	40000 ppm 群	10 匹 (2501~2510)

II-2-2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、発育順調で、異常を認めない動物を体重の重い順より各群に 1 匹づつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して小さい群より順に体重の重い動物を割り当てるこにより群間の偏りを小さくする群分け方法(適正層別方式) により実施した (文献 7)。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間においては色素塗布により、投与期間においては耳パンチにより識別した。また、全飼育期間を通してケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物は検疫期間を含む全飼育期間、バリア区域 (AC-2 空調エリア) 内の独立した室 (雌雄とも 209 室) に収容し、飼育室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物との区別を行った。

II-2-3 飼育条件

動物は、全飼育期間を通して、設定温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (実測値 (平均士標準偏差) : $22.6 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$) 、設定湿度 $55 \pm 15\%$ (実測値 (平均士標準偏差) : $52.5 \pm 1.1\%$) 、明暗サイクル : 12 時間点灯 (8 : 00~20 : 00) / 12 時間消灯 (20 : 00~8 : 00) 、換気回数 15~17 回/時に設定した環境下で飼育した。全飼育期間を通して、動物の状態に影響を与えるような環境変化は認められなかった。

動物は単飼ケージ (ステンレス製二連網ケージ、W112×D212×H120mm) に収容した。

飼料は、全飼育期間を通してオリエンタル酵母工業（株）千葉工場（千葉県千葉市美浜区新港 8-2）の CRF-1 固型飼料（30KGy- γ 線照射滅菌飼料）を使用し、固型飼料給餌器により自由摂取させた。

飲水は、検疫期間中は市水（秦野市水道局供給）をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置で自由摂取させた。馴化期間中は、脱イオン水を更にフィルターろ過した飲水を給水瓶により自由摂取させた。投与期間中は、所定の濃度に調製した被験物質混合飲水を給水瓶により自由摂取させた。また、対照群については馴化期間と同様に脱イオン水のみを与えた。

なお、試験に使用した飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業（株）から分析データを入手し、保管した。飼料中の夾雑物については（財）日本食品分析センター（東京都渋谷区元代々木町 52 番 1 号）の分析データを入手し、また、飲水については（財）食品薬品安全センター秦野研究所（神奈川県秦野市落合 729-5）に分析を委託し、それぞれ試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の一般状態の観察

全動物について、生死及び瀕死の確認を毎日 1 回行い、一般状態の詳細な観察を毎週 1 回（投与開始直前及び各週 7 日目）実施した。

II-3-2 体重測定

全動物について、毎週 1 回（投与開始直前及び各週 7 日目）体重を測定した。なお、定期解剖動物の搬出時にも測定を行った。

II-3-3 摂水量測定

全動物について、毎週 1 回、給水量（各週 3 日目）及び残水量（各週 7 日目）を測定し、その値から摂水量を算出した。

II-3-4 摂餌量測定

全動物について、毎週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から摂餌量を算出した。

II-3-5 血液学的検査

定期解剖時に採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血し、検査を行った。

なお、検査対象動物は解剖日前日より（18 時間以上）絶食させた。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、血小板数、白血球数、白血球分類

検査方法は APPENDIX N 1 に示した。

II-3-6 血液生化学的検査

定期解剖時に採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリナリチウム入り採血管に採血し、遠心分離して得られた血漿を用いて検査を行った。

なお、検査対象動物は解剖日前日より（18 時間以上）絶食させた。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、CPK、尿素窒素、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

検査方法は APPENDIX N 1 に示した。

II-3-7 尿検査

投与最終週に採尿可能な全動物について新鮮尿を採取し、検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン

検査方法は APPENDIX N 1 に示した。

II-3-8 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

(2) 臓器重量

全動物について以下に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、湿重量の体重比（臓器重量体重比）、すなわち定期解剖時の体重に対する百分率を算出した。

胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 病理組織学的検査

全動物の臓器を 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、以下に示した臓器を、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡にて病理組織学的に検査した。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓、リンパ節、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、胆嚢、胰臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、腎、乳腺、脳、脊髄、末梢神経、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨

II-4 数値処理と統計学的方法

II-4-1 数値の取扱いと表示

数値データは計測機器の精度に合わせて表示した。

体重については g を単位とし、小数点以下第 1 位まで計測し、表示した。

摂水量及び摂餌量については g を単位とし、給水量（給餌量）、残水量（残餌量）を小数点以下第 1 位まで計測し、給水量（給餌量）から残水量（残餌量）を減じて摂水量（摂餌量）とした。この値を計測期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂水量（平均摂餌量）を算出し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

アセト酢酸メチルの体重 kg 当たりの 1 日摂取量は、摂水量にアセト酢酸メチルの設定濃度を乗じ、体重で除した値を g/kg body weight/day を単位として小数点以下第 4 位を四捨五入し、小数点以下第 3 位までを表示した。

臓器重量については g を単位とし、小数点以下第 3 位まで計測し、表示した。臓器重量体重比については臓器実重量値を解剖時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第 4 位を四捨五入し、小数点以下第 3 位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査については APPENDIX O 1 に示した単位と精度により表示した。

なお、各数値データにおいての平均値及び標準偏差は上記に示した桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

II-4-2 母数の取り扱い

体重、摂水量及び摂餌量については、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、欠測となったデータに付いては母数より除いた。

血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量は、定期解剖時まで生存した動物を対象に

し、欠測となったデータについては母数より除いた。

尿検査は、投与最終週まで生存した動物を対象に行い、検査ができた動物数を母数とした。

剖検データは、各群の有効動物数（供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数）を母数とした。

病理組織学的検査データは、臓器別に検査不能臓器数を除いたものを母数とした。

II-4-3 統計方法

本試験で得られた測定値は原則として、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett (型) の多重比較を行った。

病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、対照群と各投与群間で χ^2 検定を行った。検定は所見のみられなかった動物をグレード 0 として分類し各グレード毎の動物の度数分布により行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間との χ^2 検定を行った。

各検定は 5% の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5% 及び 1% の有意水準の表示を行った。

III 試験成績

III-1 生死状況

生死状況を TABLE 1, 2 に示した。

雌雄とも全ての群に、死亡はみられなかった。

III-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1, 2 に示した。

雄では、5000 ppm 群で、内部腫瘍が 10 週目以降、1 匹にみられた。その他の群では、所見は認められなかった。

雌では、5000 ppm 群で、立毛と糞少量が 13 週目に 1 匹みられた。その他の群では、所見は認められなかった。

III-3 体重

体重の推移を TABLE 1, 2、FIGURE 1, 2、APPENDIX B 1, 2 に示した。

雌雄とも、全ての投与群と対照群の間に差はみられなかった。なお、最終計測日の体重は、対照群と比較して、雄では、40000 ppm 群 : 98%、20000 ppm 群 : 100%、10000 ppm 群 : 100%、5000 ppm 群 : 99%、2500 ppm 群 : 99%、雌では、40000 ppm 群 : 99%、20000 ppm 群 : 99%、10000 ppm 群 : 95%、5000 ppm 群 : 97%、2500 ppm 群 : 100%であった。

III-4 摂水量

摂水量を TABLE 3, 4、FIGURE 3, 4、APPENDIX C 1, 2 に示した。

雄では、全ての投与群と対照群との間に大きな差はみられなかった。なお、全投与期間における各群の摂水量は、対照群に対し、40000 ppm 群 : 100~117%、20000 ppm 群 : 103~114%、10000 ppm 群 : 93~109%、5000 ppm 群 : 103~114%、2500 ppm 群 : 108~116% の範囲にあった。

雌では、10000 ppm 以上の群で、1 週目と 2 週目に摂水量の低値がみられたが、それ以後の週では大きな差はみられなかった。なお、全投与期間における各群の摂水量は、対照群に対し、40000 ppm 群 : 82~98%、20000 ppm 群 : 82~100%、10000 ppm 群 : 85~102%、5000 ppm 群 : 93~108%、2500 ppm 群 : 92~103% の範囲にあった。

III-5 摂餌量

摂餌量を TABLE 5, 6、FIGURE 5, 6、APPENDIX D 1, 2 に示した。

雌雄とも、全投与群で全投与期間にわたり、対照群との間に大きな差はみられなかった。なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対し、雄では、40000 ppm 群：93～120%、20000 ppm 群：98～122%、10000 ppm 群：95～100%、5000 ppm 群：95～100%、2500 ppm 群：98～103%、雌では、40000 ppm 群：92～97%、20000 ppm 群：94～103%、10000 ppm 群：94～103%、5000 ppm 群：100～106%、2500 ppm 群：100～106% の範囲にあった。

III-6 被験物質摂取量

体重、摂水量及び設定濃度より算出した被験物質摂取量を APPENDIX E 1, 2 に示した。

雌雄とも、ほぼ公比どおりの被験物質摂取量を示した。

全投与期間における各群の 1 日当たりの被験物質摂取量 (g/kg body weight/day) は、雄では、40000 ppm 群：4.775～7.457、20000 ppm 群：2.270～4.314、10000 ppm 群：1.081～1.701、5000 ppm 群：0.569～0.953、2500 ppm 群：0.284～0.534、雌では、40000 ppm 群：5.854～8.131、20000 ppm 群：3.211～3.970、10000 ppm 群：1.710～2.076、5000 ppm 群：0.813～1.127、2500 ppm 群：0.433～0.542 の範囲にあった。

III-7 血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX F 1, 2 に示した。

雌雄とも、全投与群で被験物質投与による影響は認められなかった。

III-8 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 7, 8、APPENDIX G 1, 2 に示した。

雄では、40000 ppm 群で、総蛋白とアルブミンの減少が認められた。

雌では、40000 ppm 群で、総蛋白、アルブミン、尿素窒素及びカルシウムの減少が認められた。また、10000 ppm 群でも総蛋白の減少がみられた。

III-9 尿検査

尿検査の結果を TABLE 9, 10、APPENDIX H 1, 2 に示した。

雄では、10000 ppm 群で、ケトン体の陽性度の減少が認められた。

雌では、40000 ppm 群で、ケトン体の陽性度の増加が認められた。また、20000 ppm 群で、pH の低下がみられた。

III-10 病理学的検査

III-10-1 剖検

解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX I 1, 2 に示した。

雌雄とも対照群や投与群で、脾臓の黒色斑と腎臓の水腎症が観察されたが、被験物質投与による影響とは考えなかった。

III-10-2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を TABLE 11、APPENDIX J 1, 2 (実重量)、APPENDIX K 1, 2 (体重比) に示した。

雄では、40000 ppm 群で、腎臓の体重比の高値が認められた。なお、2500 ppm と 5000 ppm 群で、水腎症 (2500 ppm : 1 匹、5000 ppm : 2 匹) の動物がいたため、腎臓の実重量と体重比が有意ではないものの、平均値は高値を示した。

雌では、全投与群で対照群と比較し、差は認められなかった。なお、対照群と 20000 ppm 群で、水腎症 (対照群 : 2 匹、20000 ppm : 1 匹) の動物がいたため、腎臓の実重量と体重比の平均値は高値を示した。

III-10-3 病理組織学的検査

定期解剖動物の病理組織学的検査の結果を APPENDIX L 1, 2 に示した。

雌雄とも、特記すべき所見はいずれの投与群でも認められなかった。

IV 考察及びまとめ

アセト酢酸メチルのがん原性を検索する目的でCrj:BDF₁マウスを用いて経口投与による2年間（104週間）のがん原性試験を実施するに当たり、その投与濃度を検索するために13週間試験を実施した。投与はアセト酢酸メチルを各投与濃度に調製した飲水の自由摂取で行った。被験物質投与群5群と対照群1群の計6群構成で、雌雄とも各群10匹の動物を用いた。投与濃度は、雌雄とも2500 ppm、5000 ppm、10000 ppm、20000 ppm及び40000 ppmとした。

(1) 用量－反応関係

アセト酢酸メチルの13週間の飲水投与により、雌雄とも全ての群で死亡はみられなかつた。40000 ppm群では、雌で摂水量の減少が散見されたが、体重と摂餌量は、対照群とほぼ同様の推移を示した。雌雄とも血漿中の総蛋白とアルブミンの減少がみられたが、軽度な変化であった。また、雄の腎臓重量で体重比の高値、雌で尿素窒素とカルシウムの減少がみられたが、病理組織学的検査では、腎臓に対応する変化は認められなかつた。

20000 ppm以下の群では、雌の10000 ppm群で総蛋白の減少がみられたが、被験物質投与によると考えられる変化は認められなかつた。

なお、雄の5000 ppm群で、内部腫瘍が10週目以降1匹にみられたが、剖検及び病理組織学的検査の結果より、水腎症によるものであった。

また、本試験と同用量で実施した2週間試験（文献6）においては、40000 ppm群の雄で巢状壊死（1匹）と肝細胞の中心性の肥大（2匹）が認められたが、13週間試験では肝臓への影響は認められなかつた。

以上のように、アセト酢酸メチルの投与によって、被験物質投与による明らかな毒性徴候は認められなかつた。

(2) 無毒性量 (NOAEL)

上記の結果より、アセト酢酸メチルの13週間混水投与による無毒性量は、雄の腎臓重量（体重比）と血液生化学的検査の指標値への影響をエンドポイントとして、20000 ppm（雄：2.270～4.314、雌：3.211～3.970 g/kg/day）であると考えられた。

(3) がん原性試験の濃度設定

13週間試験の結果より、がん原性試験の投与濃度を以下のように設定した。

40000 ppm群では、雄に腎臓重量（体重比）の高値、雌雄とも血漿中の総蛋白とアルブミンの減少が僅かに認められた。20000 ppm以下の投与群では、被験物質投与による明らかな変化は認められなかつた。

以上のように、アセト酢酸メチルの毒性は非常に低く、13週間試験の最高用量40000 ppm

でも僅かな影響が認められたのみであった。

OECD 化学品テストガイドライン「408 亜慢性経口毒性－げっ歯類：90 日」（文献 5）での限界用量は 1000 mg/kg の規定がある。13 週間試験で約 1000 mg/kg/day の被験物質摂取量を得るための飼料中の被験物質濃度は、雄では約 10000 ppm、雌では約 5000 ppm であるが、この濃度では、被験物質投与による影響が認められないと考えられる。従って、がん原性試験の最高用量は、ラットとの毒性影響を比較するという観点から 20000 ppm とし、中間用量と低用量もラットのがん原性試験と同様の濃度（6325ppm、2000ppm）に設定した。

V 文献

1. 化学工業日報社 (2002)
14102 の化学商品
p.376, 化学工業日報社, 東京
2. Merck & Co.,Inc. (1996)
The Merck Index, 12th edition
p.1029, Merck & Co.,Inc., Whitehouse Station, NJ
3. McLafferty F.W. (1994)
Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edition, Entry Number 12752
John Wiley and Sons, Inc., New York
4. Williams W. Simons (1978)
The Sadtler Handbook of Infrared Spectra
p.766, Sadtler Research Laboratories, Inc., London
5. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (1981)
Guideline for Testing of Chemicals 408 for “Subchronic Oral Toxicity”
—Rodent: 90-day Study, OECD, Paris
6. 日本バイオアッセイ研究センター (2003)
アセト酢酸メチルのマウスを用いた経口投与による 2 週間毒性試験（混水試験）報告書（試験番号 0420）, 日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川
7. 阿部正信 (1986)
長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立
薬理と治療, 14, 7285 - 7302