

アセト酢酸メチルのラット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： 0426

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ラット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ラットに 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ラット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： 0426

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	10
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	12
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	13
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	14
	III-10-3 病理組織学的検査	14
IV	考察及びまとめ	15
V	文献	18

要 約

アセト酢酸メチルのがん原性を検索する目的で、F344/DuCrj (Fischer) ラット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、40000 ppm 群では、雌で1匹の死亡が認められたが、他の投与群では死亡はみられなかった。雌雄とも全投与期間で摂水量と摂餌量の減少がみられ、特に摂水量の減少は顕著であった。雌雄とも体重増加の抑制が認められたが、雌は雄よりも軽度であった。腎臓への影響として、雌雄とも乳頭壊死、尿素窒素の増加、尿蛋白の陽性度の増加、腎臓で実重量(雌)及び体重比(雄雌)の高値が認められた。また、血液系への影響として、雄では赤血球数の減少、MCVとMCHの増加、APTTとプロトロンビン時間の短縮がみられた。20000 ppm 群では、雌雄とも摂水量と摂餌量の減少がみられ、雄で体重増加の抑制が認められた。また、雌雄とも腎臓への影響が認められ、雄では血液系への影響もみられた。10000 ppm 群では、雄で摂水量と摂餌量の減少、軽度の体重増加の抑制がみられ、雌では摂水量の減少と摂餌量の軽度の減少が散見された。また、雌雄とも腎臓への影響が認められた。5000 ppm 群では、雄で摂水量と摂餌量の減少、軽度の体重増加の抑制がみられ、雌では摂水量の減少が認められた。また、雌雄とも腎臓への影響が認められた。2500 ppm 群では、雌雄とも摂水量の減少がみられた以外、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って、雌雄ともに摂水量と摂餌量が減少し、体重増加の抑制が雄では5000 ppm、雌では10000 ppm まで認められた。腎臓への影響(雌雄：尿素窒素の増加、雄：乳頭壊死の発生と腎臓重量(体重比)の増加、雌：尿蛋白の陽性度の増加)は雌雄とも5000 ppm まで、雄の血液系への影響(赤血球数とヘモグロビン濃度の減少)は20000 ppm まで認められた。従って、無毒性量は、雌雄の腎臓への影響をエンドポイントとして、2500 ppm (雄0.109~0.232 g/kg/day、雌0.162~0.253 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20000 ppm を最大耐量とし、以下、6325 ppm、2000 ppm (公比 $\sqrt{10}$) の濃度を設定した。

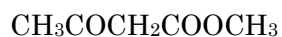
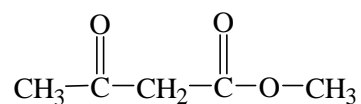
I 試験材料

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 ー 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、日本チャールス・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 F344/DuCrj (Fischer) ラット (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感受性が知られていること等の理由から F344/DuCrj (Fischer) ラットを使用することが決定している。

ラット雌雄各 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：120～134g、雌：94～105g) 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6日から2001年7月9日または10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F344/DuCrj (Fischer) ラット (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、雌雄ともに摂水量と摂餌量が投与期間初期に顕著な減少を示し、体重増加の抑制（最終計測時の体重は対照群に対し、雄：80%、雌：91%）が認められたが、死亡はみられなかった。40000 ppm 以上の濃度では、13週間の試験を実施することにより、顕著な摂水量、摂餌量の減少や体重増加の抑制を引き起こし、動物に重篤な影響を与えると考えたが、40000 ppm 群の病理組織学的検査において被験物質投与による影響はみられなかったことから、ラットにおける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、93.5～100%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ラット用給水瓶に充填し、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 : 96.9%、40000 ppm : 106%、10 日目には、2500 ppm : 98.1%、40000 ppm : 103%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 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより群間の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 208 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 \pm 標準偏差) : $22.8 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$)、設定湿度 $55 \pm 15\%$ (実測値 (平均 \pm 標準偏差) : $56.1 \pm 0.7\%$)、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、W170×D294×H176mm)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（30KG 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、瀕死及び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及びクエン酸ナトリウム入り採血管（下記*印検査項目）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、網赤血球比、*プロトロンビン時間、*活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）、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ン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、クレアチニン、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、ビリルビン、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、骨髄、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、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膣、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、整数値の 1 の位まで計測し、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。

雄では、全ての群に死亡はみられなかった。

雌では、40000 ppm 群で投与 1 週目（1 週 7 日目）に瀕死（切迫屠殺）動物が 1 匹みられた。

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、40000 ppm 群で立毛（1 週目に 5 匹）、糞小粒（1 週目に 9 匹、2 週目に 3 匹、13 週目に 1 匹）及び糞少量（1 週目に 10 匹、2 週目に 1 匹）がみられた。20000 ppm 以下の群では、所見はみられなかった。

雌では、40000 ppm 群の瀕死動物（1 匹）に、糞小粒、糞少量、立毛、円背位、外陰汚染、自発運動量減少、体温低下、異常呼吸（呼吸緩徐）がみられ、切迫屠殺した。生存動物（9 匹）では、40000 ppm 群で立毛（1 週目に 4 匹）、外陰汚染（9 週目に 1 匹、10、12、及び 13 週目に各 2 匹）、糞小粒（1 週目に 4 匹、2 週目に 1 匹）及び糞少量（1 週目に 9 匹）がみられた。20000 ppm 群では、外陰汚染（11～13 週目に各 1 匹）がみられた。10000 ppm 以下の群では、所見はみられなかった。

III-3 体重

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

雄では、40000 ppm 群は、投与 1 週目の体重は投与開始時より低下し、それ以降は増加したものの、全投与期間にわたり体重の低値が認められた。20000 ppm 群では、投与 1 週目及び 4 週目以降に、低値が認められた。10000 ppm 群では、7 週目以降に、5000 ppm 群では、8 週目以降に低値が認められた。2500 ppm 群では、対照群との間に差は認められなかった。なお、最終計測日の体重は対照群と比較して、40000 ppm 群：81%、20000 ppm 群：88%、10000 ppm 群：92%、5000 ppm 群：92%、2500 ppm 群：95%であった。

雌では、40000 ppm 群は、投与 1 週目の体重は投与開始時より低下し、それ以降は増加したものの、2、6、7、8、10、11 週目に体重の低値が認められた。20000 ppm 群は、6 週目でのみ低値が認められた。10000 ppm 以下の群では、対照群との間に差は認められなかった。なお、最終計測日の体重は対照群と比較して、40000 ppm 群：94%、20000 ppm 群：94%、10000 ppm 群：100%、5000 ppm 群：100%、2500 ppm 群：101%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。

雌雄とも、全投与群でほぼ全投与期間にわたり、摂水量の低値がみられた。なお、全投与期間における各群の摂水量は、対照群に対し、雄では、40000 ppm 群：36～64%、20000 ppm 群：62～74%、10000 ppm 群：62～78%、5000 ppm 群：66～79%、2500 ppm 群：74～85%、雌では、40000 ppm 群：30～68%、20000 ppm 群：30～70%、10000 ppm 群：36～68%、5000 ppm 群：40～70%、2500 ppm 群：50～75%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。

雄では、5000 ppm 以上の群でほぼ全投与期間にわたり、摂餌量の低値がみられた。なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対し、40000 ppm 群：41～86%、20000 ppm 群：81～91%、10000 ppm 群：85～94%、5000 ppm 群：85～94%、2500 ppm 群：91～97%の範囲にあった。

雌では、20000 ppm 以上の群で全投与期間にわたり、摂餌量の低値がみられた。なお、全投与期間における各群の摂餌量は、対照群に対し、40000 ppm 群：56～92%、20000 ppm 群：86～91%、10000 ppm 群：91～98%、5000 ppm 群：92～98%、2500 ppm 群：96～101%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：1.438～3.294、20000 ppm 群：0.746～1.747、10000 ppm 群：0.378～0.867、5000 ppm 群：0.200～0.429、2500 ppm 群：0.109～0.232、雌では、40000 ppm 群：1.721～3.616、20000 ppm 群：0.885～1.748、10000 ppm 群：0.495～0.926、5000 ppm 群：0.281～0.463、2500 ppm 群：0.162～0.253 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 TABLE 7, 8、APPENDIX F 1, 2 に示した。

雄では、40000 ppm 群で MCV と MCH の増加、並びに赤血球数の減少と APTT の短縮、プロトロンビン時間の短縮傾向が認められた。赤血球数の減少は、20000 ppm 群まで、APTT

とプロトロンビン時間の短縮は 10000 ppm 群まで認められた。その他、20000 ppm 群で、ヘモグロビン濃度の減少、5000 ppm 群で、MCV の減少がみられた。

雌では、2500 ppm 群でプロトロンビン時間の短縮がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

III-8 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 9, 10、APPENDIX G 1, 2 に示した。

雄では、40000 ppm 群で尿素窒素の増加、並びに、総蛋白、アルブミン及び総コレステロールの減少、GOT と GPT の低下が認められた。総蛋白とアルブミンの減少、GPT の低下は 20000 ppm 群まで、尿素窒素の増加は、5000 ppm 群まで認められた。

雌では、40000 ppm 群で尿素窒素の増加、ALP の上昇、並びに総蛋白とアルブミンの減少が認められた。総蛋白の減少は、10000 ppm 群まで、アルブミンの減少と尿素窒素の増加あるいは増加傾向は、5000 ppm 群まで認められた。

III-9 尿検査

尿検査の結果を TABLE 11, 12、APPENDIX H 1, 2 に示した。

雄では、40000 ppm 群で蛋白の陽性度の増加とケトン体の陽性度の増加傾向、並びに、pH の低下が認められた。蛋白の陽性度の増加と pH の低下あるいは低下傾向は、10000 ppm 群まで、ケトン体の陽性度の増加は、5000 ppm 群まで認められた。

雌では、40000 ppm 群で蛋白の陽性度の増加とケトン体の陽性度の増加が認められた。これらの変化は、5000 ppm 群まで認められた。

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 1~4 に示した。

雄では、投与群で肝臓のヘルニアが観察されたが、被験物質投与による影響とは考えなかった。

雌では、定期解剖動物の対照群と投与群で肝臓のヘルニアが、投与群で卵巣の嚢胞が観察された。また、雌の瀕死動物でも肝臓のヘルニアが観察されたが、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 13, 14、APPENDIX J 1, 2（実重量）、APPENDIX K 1, 2（体重比）に示した。

雄では、40000 ppm 群は解剖時体重が顕著に低く、胸腺、心臓、肺、脾臓、肝臓及び脳に実重量の低値が認められ、体重比は、副腎、精巣、肺、腎臓、脾臓及び脳で高値が認められた。胸腺の実重量の低値は 20000 ppm 群まで、肺、脾臓及び脳の実重量の低値は 10000 ppm 群まで、精巣、腎臓及び脳の体重比の高値は 5000 ppm 群まで認められた。また、副腎の体重比の高値が、20000 ppm 群と 5000 ppm 群でみられた。

雌では、40000 ppm 群で腎臓の実重量の高値と副腎の実重量の低値が認められ、体重比は、腎臓で高値、副腎と肝臓で低値が認められた。腎臓の実重量と体重比の高値、副腎の実重量の低値は 10000 ppm 群まで認められた。また、肝臓の体重比の低値が、10000 ppm 群と 5000 ppm 群、副腎の体重比の低値が、10000 ppm 群、心臓の体重比の低値が、5000 ppm 群でみられた。

Ⅲ-10-3 病理組織学的検査

全動物の病理組織学的検査の結果を TABLE 15, 16、APPENDIX L 1, 2 に、雌については、定期解剖動物の病理組織学的所見を APPENDIX L 3 に、瀕死動物の病理組織学的所見を APPENDIX L 4 に示した。

<雄>

腎臓の乳頭壊死が 40000 ppm 群で 2 匹（軽度）、5000 ppm 群で 1 匹（軽度）認められた。

<雌>

瀕死動物（1 匹）：特記すべき変化は認められなかった。

定期解剖動物（9 匹）：腎臓の乳頭壊死が 40000 ppm 群で 5 匹（軽度）、20000 ppm 群で 2 匹（軽度）に認められた。その他、腎臓の皮髄境界部の鉍質沈着が 5000 ppm 群で減少したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

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 F344/DuCrj (Fischer) ラット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

40000 ppm 群では、雌の 40000 ppm 群で、1 週目 7 日に瀕死動物 (切迫屠殺) が 1 匹みられた。この動物は体重が著しく低下し、一般状態観察で多くの所見がみられたため、瀕死動物として搬出した。また、この動物の摂水量と摂餌量は、40000 ppm 群の平均値と比較して極端に少なかったが、剖検観察や病理組織学的検査では、被験物質投与によると考えられる所見は認められなかった。従って、この動物は摂水量と摂餌量の著しい減少に伴って衰弱したと考えられた。定期解剖時まで生存した動物では、雌雄とも全投与期間で摂水量と摂餌量の減少がみられ、特に、摂水量の減少は顕著であった。雌雄とも体重増加の抑制 (対照群に対し、雄 : 81%、雌 : 94%) が認められたが、雌は雄よりも軽度であった。摂水量や摂餌量の減少に起因すると考えられる変化として、一般状態で、雌雄とも立毛、糞小粒、糞少量等の所見が投与初期に多くの動物でみられた。また、雌雄とも血漿中の総蛋白とアルブミンの減少、雄で総コレステロールも減少したが、軽度の変化であった。血液系への影響として、雄で赤血球数の減少、MCV と MCH の増加がみられ、軽度の貧血傾向が示された。また、APTT とプロトロンビン時間の短縮がみられたが、軽度の変化であった。腎臓への影響として、雌では乳頭壊死 (5 匹、対照群 0 匹) が有意な増加を示し、雄では統計学的に有意差は示されなかったが、2 匹 (対照群 0 匹) に発生がみられた。また、雌雄とも尿素窒素の増加、尿検査で蛋白の陽性度の増加が認められ、腎臓重量で実重量 (雌) と体重比 (雄雌) の高値がみられた。その他、雌で ALP の上昇がみられた。

20000 ppm 群では、雌雄とも摂水量と摂餌量の減少がみられ、雄で体重増加の抑制 (対照群に対し、88%) が認められた。また、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。血液系への影響として、雄で赤血球数とヘモグロビン濃度の減少、APTT とプロトロンビン時間の短縮がみられたが、軽度の変化であった。腎臓への影響として、雌で乳頭壊死 (2 匹) がみられた。また、雌雄とも尿素窒素の増加、尿蛋白の陽性度の増加が認められ、腎臓重量で実重量 (雌) と体重比 (雄雌) の高値がみられた。

10000 ppm 群では、雄で摂水量と摂餌量の減少、軽度の体重増加の抑制 (対照群に対し、92%) がみられ、雌では摂水量の減少と摂餌量の軽度の減少が散見された。また、雌で血漿中の総蛋白とアルブミンの軽度の減少がみられた。腎臓への影響として、雌雄とも尿素窒素

の増加、尿蛋白の陽性度の増加、腎臓重量で実重量（雌）と体重比（雄雌）の高値がみられた。

5000 ppm 群では、雄で摂水量と摂餌量の減少、軽度の体重増加の抑制（対照群に対し、92%）がみられ、雌では摂水量の減少が認められた。また、雌でアルブミンの軽度の減少がみられた。腎臓への影響として、雄で乳頭壊死（1匹）並びに、雌雄とも尿素窒素の増加、雌で尿蛋白の陽性度の増加、雄の腎臓重量で体重比の高値がみられた。

2500 ppm 群では、雌雄とも摂水量の減少がみられた以外、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って、雌雄ともに摂水量と摂餌量が減少し、体重増加の抑制が雄では 5000 ppm、雌では 10000 ppm まで認められた。また、腎臓への影響が雌雄とも認められ、雄では血液系への影響もみられた。本試験でこれらの毒性影響がみられた最低用量は、1) 腎臓への影響は、雄で乳頭壊死の発生（1匹）、尿素窒素の増加及び腎臓重量（体重比）の増加、雌で尿素窒素の増加と尿蛋白の陽性度の増加が認められた 5000 ppm、2) 血液系への影響は、雄で赤血球数とヘモグロビン濃度の減少が認められた 20000 ppm であった。

(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、雌雄の腎臓への影響をエンドポイントとして、2500 ppm（雄 0.109～0.232 g/kg/day、雌 0.162～0.253 g/kg/day）であると考えられた。

(3) 他の文献との比較

和泉らは、Sprague-Dawley (Crj:CD) ラットを用いた、アセト酢酸メチルの反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験（強制経口投与、投与期間は雄：連続 49 日間、雌：41～最長 54 日間、投与用量：100、300、1000 mg/kg/day、雌雄各群 12 匹）を報告した（文献 8）。彼らの結果では、雌雄とも一般状態、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量、剖検所見及び病理組織学的検査において、雌で産褥による死亡と雄で骨髄性白血病による死亡が各 1 匹みられた以外、被験物質投与による影響は認められず、無影響量 (NOEL) は雌雄とも 1000 mg/kg/day であった。

和泉らの報告と本試験を比較すると、彼らの結果では諸検査において被験物質投与による影響が認められなかったが、本試験結果では標的臓器として雌雄とも腎臓への影響が認められた。また、和泉らの報告の無影響量 (1000 mg/kg/day) と本試験の無毒性量 (109～232 mg/kg/day) との間には差が認められた。これらの相違をもたらした要因は、経口投与方法（強制経口投与対混水経口投与）、動物系統差 (Sprague-Dawley (Crj:CD) 対 F344/DuCrj (Fischer))、投与期間 (41～54 日対 13 週間) であると考えられた。

(4) 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、雄で著しい体重増加の抑制 (19%) が認められたが、雌では軽度 (6%) であった。しかし、雌では投与 1 週目に瀕死動物が認められた。また、雌雄とも投与初期に立毛、糞小粒、糞少量等の所見が観察され、腎臓への影響として、雌雄とも乳頭壊死 (雄 2 匹、雌 5 匹)、血漿中の尿素窒素の増加、腎臓重量の増加が認められた。

20000 ppm 群では、雌雄とも死亡は認められず、体重増加の抑制 (雄 12%、雌 6%) は比較的軽度であった。また、腎臓への影響として、雌雄とも乳頭壊死 (雌 2 匹)、尿素窒素の増加、腎臓重量の増加が認められた。

10000 ppm 以下の濃度では、体重増加の抑制と腎臓への影響は、軽減あるいは消失し、最低用量の 2500 ppm 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。

以上の結果から、がん原性試験の最大耐量は 20000 ppm と判断し、最低用量は、13 週間試験の無毒性量である 2500 ppm よりやや低い 2000 ppm (最高用量の 1/10) とした。従って、がん原性試験の投与濃度は、20000 ppm、6325 ppm、2000 ppm (公比 $\sqrt{10}$) の濃度を設定した。

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ラット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 0419) , 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
8. 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修 (1998)
アセト酢酸メチル
化学物質毒性試験報告、第 6 卷
pp. 177 - 203, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京