

アセト酢酸メチルのラットを用いた
経口投与によるがん原性試験（混水試験）報告書

試験番号：0448

CAS No.105-45-3

2005年9月28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がん原性試験（混水試験）

試験目的

アセト酢酸メチルをラットに 104 週間経口（混水）投与し、がん原性を検索した。

試験法

本試験は、平成 9 年 3 月 11 日付け、基発第 144 号「がん原性試験による調査の基準」及び OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験 1981 年 5 月 12 日採択）に準じて実施した。

GLP 対応

本試験は、昭和 63 年 9 月 1 日付け、労働省告示第 76 号「試験施設等が具備すべき基準（安衛法 GLP）」（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対策課
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
副所長 山本 静護
神奈川県秦野市平沢 2445

アセト酢酸メチルのラットを用いた
経口投与によるがん原性試験（混水試験）報告書

試験番号：0448

本 文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	3
I-1 被験物質の性状等	3
I-1-1 名称等	3
I-1-2 構造式、示性式及び分子量	3
I-1-3 物理化学的性状等	3
I-2 被験物質の使用ロット等	3
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性	4
I-3-1 特性・同一性	4
I-3-2 安定性	4
I-4 試験動物	4
II 試験方法	5
II-1 投与	5
II-1-1 投与経路	5
II-1-2 被験物質の投与方法	5
II-1-3 投与期間	5
II-1-4 投与濃度	5
II-1-5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由	5
II-1-6 被験物質混合飲水の調製方法	6
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	6
II-1-8 被験物質混合飲水中の被験物質の安定性	7
II-1-9 被験物質の摂取量	7

Ⅱ-2	動物管理	7
Ⅱ-2-1	各群の使用動物数	7
Ⅱ-2-2	群分け及び個体識別方法	7
Ⅱ-2-3	飼育条件	8
(1)	飼育環境	8
(2)	飼料	8
(3)	飲水	9
Ⅱ-3	観察・検査項目及び方法	9
Ⅱ-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	9
Ⅱ-3-2	体重測定	9
Ⅱ-3-3	摂餌量測定	9
Ⅱ-3-4	摂水量測定	9
Ⅱ-3-5	血液学的検査	10
Ⅱ-3-6	血液生化学的検査	10
Ⅱ-3-7	尿検査	10
Ⅱ-3-8	病理学的検査	10
(1)	剖検	10
(2)	臓器重量	10
(3)	病理組織学的検査	11
Ⅱ-4	数値処理と統計方法	11
Ⅱ-4-1	数値の取り扱いと表示	11
Ⅱ-4-2	統計処理	11
Ⅲ	試験成績	13
Ⅲ-1	生死状況	13
Ⅲ-2	一般状態	13
Ⅲ-3	体重	13
Ⅲ-4	摂餌量	14
Ⅲ-5	摂水量	14
Ⅲ-6	被験物質摂取量	15
Ⅲ-7	血液学的検査	15
Ⅲ-8	血液生化学的検査	15
Ⅲ-9	尿検査	16

III-10 病理学的検査	16
III-10-1 剖検	16
III-10-2 臓器重量	16
III-10-3 病理組織学的検査	17
III-10-4 死因	18
IV 考察及びまとめ	19
IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量、摂水量	19
IV-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変	19
IV-3 非腫瘍性病変	19
IV-4 量-反応関係	19
IV-5 他文献との比較等	20
V 結論	21
VI 文献	22

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)ラットを用いた混水経口投与による 2 年間 (104 週間) の試験を実施した。

本試験は、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、雌雄各群とも 50 匹とし、合計 400 匹を用いた。被験物質の投与は、アセト酢酸メチルを混合した飲水を動物に自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雌雄とも 2000、6325 及び 20000 ppm (公比 $\sqrt{10}$) とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重、摂餌量及び摂水量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

試験の結果、雄の投与群の生存率は、対照群とほぼ同様であった。雌は 20000 ppm 群で試験中期より生存率の低下がみられ、死因は腎臓病変によるものが多かった。一般状態の観察では、腎臓病変に起因する赤色尿が、試験後半に雌の 6325 ppm 以上の群に観察された。体重は、雌雄とも、6325 ppm 以上の群で投与濃度に対応した増加抑制を示した。摂餌量は、雄の 6325 ppm 以上の群と雌の全投与群で投与期間を通して投与濃度に対応した低値が認められた。摂水量は、雌雄とも全投与群で投与期間を通して投与濃度に対応した低値がみられた。雌雄とも、投与群に腫瘍あるいは腫瘍に関連した所見の発生増加は認められなかった。腫瘍以外の影響として、腎臓の乳頭壊死の発生増加が、雄 20000 ppm 群と雌全投与群で認められ、乳頭の鉍質沈着と腎盂の尿路上皮過形成の発生増加が雌の 6325 ppm 以上の群で認められた。なお、雌では腎臓への影響を示す変化として、腎臓重量 (体重比) の増加が全投与群で、血漿中の尿素窒素の増加が 20000 ppm 群で、尿中の潜血の陽性例の増加と赤色尿が 6325 ppm 以上の群で認められた。

以上のように、F344/DuCrj(Fischer)ラットを用いたアセト酢酸メチルの 2 年間 (104 週間) にわたる混水投与によるがん原性試験を行った結果、以下の結論を得た。

雌雄とも、腫瘍の発生増加は認められず、ラットに対するがん原性を示す証拠は認められなかった。

アセト酢酸メチルのがん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雄)

		投与濃度 (ppm)	0	2000	6325	20000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
		検査動物数	50	50	50	50		
良性 腫瘍	甲状腺	C-細胞腺腫	12	6	14	4 *		
	皮下組織	線維腫	3	4	3	5		
	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	3	4	0	2		
	膵臓	膵島腺腫	6	6	4	8		
	下垂体	腺腫	16	12	10	8		
	副腎	褐色細胞腫	4	5	7	3		
	精巣	間細胞腫	34	41	39	36		
悪性 腫瘍	甲状腺	C-細胞癌	2	1	0	1		
	脾臓	単核球性白血病	1	4	5	2		

アセト酢酸メチルのがん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雌)

		投与濃度 (ppm)	0	2000	6325	20000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
		検査動物数	50	50	50	50		
良性 腫瘍	子宮	内膜間質性ポリープ	10	7	5	12	↑	
	乳腺	腺腫	2	1	1	0		
		線維腺腫	9	7	1 **	3		
	下垂体	腺腫	14	19	11	12		
	甲状腺	C-細胞腺腫	10	9	7	5		
悪性 腫瘍	脾臓	単核球性白血病	3	5	7	6	↑	
	乳腺	腺癌	1	1	0	1		
		癌肉腫	0	0	0	1		

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

*: $p \leq 0.05$ で有意 **: $p \leq 0.01$ で有意 (Fisher 検定)

↑: $p \leq 0.05$ で有意増加 (Peto 検定)

I 試験材料

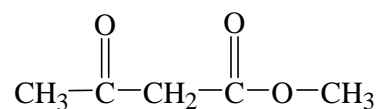
I-1 被験物質の性状等

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、示性式及び分子量 (文献1)

構 造 式：



示 性 式： $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COOCH}_3$
分 子 量： 116.12

I-1-3 物理化学的性状等 (文献1)

性 状： 芳香のある無色透明の液体
比 重： 1.078 (20/4℃)
融 点： -80℃
沸 点： 171.7℃
溶 解 性： 水 100ml に 38g 可溶
保 管 条 件： 室温暗所

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号： GL01 (2002年4月11日～2003年6月30日)
FGL01 (2003年6月30日～2004年4月15日)
製 造 元： 東京化成工業(株)
グ レ ー ド： 東京化成一級
純 度： 99.5～99.8% (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

被験物質の同一性は、ロットごとにマススペクトルを質量分析計（Hewlett Packard 5989B）を用いて測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（Shimadzu FTIR-8200PC）を用いて測定し、それぞれの文献値と比較することにより確認した。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値（文献 2）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 3）と同じ波数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。

それらの結果は APPENDIX A 1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質の安定性は、ロットごとに使用開始前及び使用終了後にガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5890A）を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、各ロットとも使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の被験物質は安定であることを確認した。

それらの結果は APPENDIX A 2 に示した。

I-4 試験動物

動物は、日本チャールス・リバー(株)（厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795）の F344/DuCrj(Fischer) ラット (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 227 匹を 4 週齢で導入し、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 200 匹（投与開始時体重範囲、雄：114～134g、雌：92～105g）を選別し、試験に用いた。

なお、F344/DuCrj(Fischer) ラット (SPF) を選択した理由は、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による。

II 試験方法

II-1 投与

II-1-1 投与経路

投与経路は経口投与とした。

II-1-2 被験物質の投与方法

投与は、被験物質を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。なお、給水瓶の交換は週に2回実施した。

II-1-3 投与期間

投与期間は104週間とし、さらに、それぞれの動物の定期解剖直前まで連続投与した。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、2000、6325及び20000 ppmの3段階（公比 $\sqrt{10}$ ）に設定した。なお、対照群として脱イオン水（市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過し、紫外線照射、脱イオンしてさらにフィルターろ過したもの）のみの群を設けた。

II-1-5 投与方法、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、がん原性試験による調査の基準（安衛法）（文献4）及びOECD化学剤テストガイドライン451（発癌性試験）（文献5）に従い、2年間（104週間）とした。

各群の投与濃度は13週間試験（文献6）の結果をもとに設定した。

試験にはF344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)を用いた。被験物質投与群5群と対照群1群の計6群の構成で、雌雄各群とも10匹とし、合計120匹のラットを用いた。被験物質の投与は、アセト酢酸メチルを混合調製した飲水を動物に13週間自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雌雄とも2500、5000、10000、20000及び40000 ppm（公比2）の5段階を設定した。観察、検査として、一般状態の観察、体重・摂餌量・摂水量の測定、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。

13 週間試験の結果、最高用量の 40000 ppm 群では、雄に大幅な体重増加の抑制（最終計測時には対照群に対し 81%）が認められた。雌では体重増加の抑制は僅か（最終計測時には対照群に対し 94%）であったが投与初期に 1 匹瀕死動物が認められた。また、雌雄とも投与初期に一般状態で糞小粒、糞少量等の所見が観察され、腎臓への影響、すなわち、腎臓重量の増加、血漿中の尿素窒素の増加、乳頭壊死の発生（雄 2 匹、雌 5 匹）が認められた。20000 ppm 群では、雌雄とも死亡は認められなかった。雄の体重増加の抑制は最終計測時には対照群に対して 88%であった。雌の体重増加の抑制は最終計測時には対照群に対し最高用量の 40000 ppm 群と同じ 94%であった。また、雌雄とも腎臓への影響、すなわち、腎臓重量の増加、血漿中の尿素窒素の増加、乳頭壊死の発生（雌 2 匹）が認められた。10000 ppm 以下の投与群では死亡動物は認められず、体重増加の抑制と腎臓への影響も軽減あるいは消失し、最低用量の 2500 ppm 群では雄の体重増加の抑制が極僅か（最終計測時には対照群に対し 95%）に認められたのみであった。

以上の結果から、がん原性試験の最高用量は、腫瘍以外の原因で正常な寿命を変えることなく、かつ最小限の毒性徴候を現すと思われる 20000 ppm、最低用量はどんな毒性も示さないと考えられる 2500 ppm よりやや低い 2000 ppm（最高用量の 1/10）とした。従って、がん原性試験の用量は公比 $\sqrt{10}$ で 20000 ppm、6325 ppm、2000 ppm とした。

II-1-6 被験物質混合飲水の調製方法

被験物質に脱イオン水を加え、マグネチックスターラー（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に合わせ、週に 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、初回調製時及び 3 ヶ月毎に、各投与濃度毎に調製容器内の被験物質混合飲水を 3 点サンプリングし、クロマトグラムをガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5890A）を用いて測定し、確認した。

その結果、各群の平均調製濃度は、設定濃度に対して 98.0~107%の範囲にあった。従って、被験物質混合飲水中の被験物質は、設定濃度に対してほぼ正確に調製されたことを確認した。

その結果を APPENDIX A 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安定性は、本試験の投与開始前に、2000 ppm と 20000 ppm の被験物質混合飲水を調製し、ラット用給水瓶に充填して動物飼育室内で室温保管（4、8 及び 12 日間）したものについて確認した。被験物質混合飲水調製時の被験物質濃度と各保管期間後の被験物質濃度をガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5890A）を用いて測定し、それぞれの測定結果を比較することにより確認した。

その結果、調製時の濃度を 100%とした場合に、4 日間では、2000 ppm : 98.5%、20000 ppm : 100%、8 日間で 2000 ppm : 99.5%、20000 ppm : 97.5%、12 日間で 2000 ppm : 101%、20000 ppm : 96.5%であり、給水期間中における被験物質混合飲水中の被験物質は安定であった。

その結果を APPENDIX A 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 当たりの 1 日摂取量 (g/kg body weight per 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 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群雌雄各 50 匹の動物を用いた。

群名称	動物数 (動物番号)	
	雄	雌
対照群	50 匹 (1001~1050)	50 匹 (2001~2050)
2000 ppm 群	50 匹 (1101~1150)	50 匹 (2101~2150)
6325 ppm 群	50 匹 (1201~1250)	50 匹 (2201~2250)
20000 ppm 群	50 匹 (1301~1350)	50 匹 (2301~2350)

II-2-2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めなかった動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さく

する群分け方法（適正層別方式）により実施した（文献7）。

動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室[雄：111室、雌：112室（2002年3月28日～2002年7月4日）、雄：203室、雌：205室（2002年7月4日～2004年3月4日）、雄：108室、雌：112室（2004年3月4日～2004年4月15日）]に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

II-2-3 飼育条件

(1) 飼育環境

動物は、飼育期間を通して以下の環境で飼育した。各飼育室の温度、湿度は実測値（平均値±標準偏差）を<>内に記した。各飼育室内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温度：23±2℃

<111室；22.9±0.2℃、112室；22.8±0.2℃、203室；23.0±0.3℃、
205室；22.8±0.3℃、108室；23.0±0.3℃、112室；22.7±0.4℃>

湿度：55±15%

<111室；57±2%、112室；53±2%、203室；51±2%、
205室；54±2%、108室；55±1%、112室；56±2%>

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

ケージへの動物の収容方法：単飼

ケージの材質・形状・寸法等：

ステンレス製2連網ケージ（170(W)×294(D)×176(H) mm/匹）

(2) 飼料

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（30KGy-γ線照射滅菌飼料）固型飼料を使用し、固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

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)から自社分析データを使用ロットごとに入手し、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52-1）の分析データを使用ロットごとに入手し、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、保管した。

(3) 飲水

飲水は、検疫期間については市水(神奈川県秦野市水道局供給)をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。馴化期間については、脱イオン水を給水瓶により自由摂取させた。投与期間については、各投与群には所定の濃度に脱イオン水を用いて調製した被験物質混合飲水を、対照群には脱イオン水のみを給水瓶により解剖直前まで自由摂取させた。

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(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)に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し、結果を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、保管した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死及び瀕死の確認を毎日1回、また、一般状態の詳細な観察は週1回行った。

II-3-2 体重測定

体重測定は、投与開始後14週間は週1回、それ以降は4週に1回(104週にも測定)行った。また、動物の死亡発見時、切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重(搬出時体重)を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

摂餌量は、投与開始後14週間は週1回、それ以降は4週に1回(104週にも測定)給餌量及び残餌量を測定し、その値から1匹1日当たりの摂餌量を算出した。

なお、18週目に雌の摂餌量データが事故により欠落したため、雌雄とも20週目に摂餌量の測定を追加した。

II-3-4 摂水量測定

摂水量は、投与開始後14週間は週1回、それ以降は4週に1回(104週にも測定)給水量及び残水量を測定し、その値から1匹1日当たりの摂水量を算出した。

II-3-5 血液学的検査

定期解剖時に生存していた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た血液を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX R に示した。

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

II-3-6 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた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た血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX R に示した。

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、AST(GOT)、ALT(GPT)、LDH、ALP、 γ -GTP、CK(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

II-3-7 尿検査

投与 104 週の検査時まで生存した動物から新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティスティックス、バイエル社製）を用いて、下記の項目について検査を行った。

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

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

定期解剖時まで生存した動物について、下記に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

測定臓器：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

全動物について下記に示した器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

検査器官・組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓（大腿骨）、リンパ節（腋窩、腹壁等）、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、精囊、前立腺、卵巣、子宮、陰、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

II-4 数値処理と統計方法

II-4-1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

体重は g を単位とし、整数値の 1 の位まで測定し、表示した。

摂餌量は g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

摂水量は g を単位とし、給水量及び残水量を小数点以下第 1 位まで測定し、給水量値から残水量値を減じて摂水量とした。この値を測定期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂水量を算出し、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。

被験物質の体重 kg 当たりの 1 日摂取量は、摂水量に被験物質の設定濃度を乗じ、体重で除した値を、g/kg body weight per 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。

臓器実重量は g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、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、血液生化学的検査は APPENDIX R に示した単位と精度により表示した。

なお、各数値データ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 統計処理

各群の有効動物数は、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とした。病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、

実施できた動物数を検査（測定）数とした。

体重、摂餌量、摂水量、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定値は、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett 型の多重比較を行った。

病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード 0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準として 1～4 にグレード分けし、 χ^2 検定を行った。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。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの担腫瘍動物数について、Peto 検定（文献 8）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また Peto 検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス(注)を用いて、死亡率法（コンテックス 3, 4 を付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテックス 0, 1, 2 を付与された腫瘍についての検定）、死亡率法＋有病率法（コンテックス 0～4 の総計で検定）を行った。

各検定は 5%の有意水準で両側検定（Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定は片側検定）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。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

0：定期解剖動物にみつかった腫瘍

1：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍

2：多分 1 だと思いが、確かでない腫瘍

3：多分 4 だと思いが、確かでない腫瘍

4：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE 1, 2、FIGURE 1, 2 及び APPENDIX B 1, 2 に示した。

—雄—

全投与群の生存率は、試験終了時には対照群とほぼ同様であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：38 匹（76%）、2000 ppm 群：41 匹（82%）、6325 ppm 群：40 匹（80%）、20000 ppm 群：39 匹（78%）であった。

—雌—

20000 ppm 群では、投与開始後 27 週目より死亡がみられ、生存率の低下が認められた。2000 ppm 群と 6325 ppm 群は、対照群とほぼ同様であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：38 匹（76%）、2000 ppm 群：43 匹（86%）、6325 ppm 群：40 匹（80%）、20000 ppm 群：25 匹（50%）であった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX B 1, 2 に示した。

—雄—

投与群の動物に特徴的な所見は認められなかった。

—雌—

赤色尿が 20000 ppm 群と 6325 ppm 群の動物に認められた。その発生時期は、20000 ppm 群では 68 週以降で合計 23 匹に、6325 ppm 群では 77 週以降合計 8 匹にみられた。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE 1, 2、FIGURE 3, 4 及び APPENDIX C 1, 2 に示した。

—雄—

20000 ppm 群では、投与期間を通して、対照群と比較して体重の低値がみられ、26 週以降、対照群体重の 90%を下回った。6325 ppm 群でも、投与 12 週以降に低値が認められたが、対照群体重の 90%以上であった。2000 ppm 群では、対照群と同様の体重推移を示した。

なお、最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して、2000 ppm 群：95%、6325 ppm 群：90%、20000 ppm 群：82%であった。

—雌—

20000 ppm 群では、全投与期間を通して、対照群と比較して体重の低値がみられ、42 週以降、対照群体重の 90%を下回った。6325 ppm 群でも、投与 1 週目と 34 週以降に低値が認められたが、対照群体重の 90%以上であった。2000 ppm 群では、対照群と同様の体重推移を示した。

なお、最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して、2000 ppm 群：96%、6325 ppm 群：89%、20000 ppm 群：76%であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE 3, 4、FIGURE 5, 6 及び APPENDIX D 1, 2 に示した。

—雄—

6325 ppm 群と 20000 ppm 群では、ほぼ投与期間を通して摂餌量の低値が認められた。2000 ppm 群では、対照群と同様の摂餌量の推移を示した。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量（対照群に対する相対比）は、対照群：14.8g（100%）、2000 ppm 群：14.8g（100%）、6325 ppm 群：14.2g（96%）、20000 ppm 群：13.2g（89%）であった。

—雌—

6325 ppm 群と 20000 ppm 群では、投与期間を通して摂餌量の低値が認められた。2000 ppm 群では、摂餌量の低値が散見された。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量（対照群に対する相対比）は、対照群：10.5g（100%）、2000 ppm 群：10.2g（97%）、6325 ppm 群：9.8g（93%）、20000 ppm 群：9.2g（87%）であった。

Ⅲ-5 摂水量

摂水量を TABLE 5, 6、FIGURE 7, 8 及び APPENDIX E 1, 2 に示した。

—雄—

全投与群で投与期間を通して摂水量の低値が認められた。

全投与期間における各群の平均一日摂水量（対照群に対する相対比）は、対照群：18.1g（100%）、2000 ppm 群：15.7g（87%）、6325 ppm 群：13.4g（74%）、20000 ppm 群：11.5g（64%）であった。

—雌—

全投与群で投与期間を通して摂水量の低値が認められた。

全投与期間における各群の平均一日摂水量（対照群に対する相対比）は、対照群：17.0g（100%）、2000 ppm 群：12.1g（71%）、6325 ppm 群：10.5g（62%）、20000 ppm 群：9.5g（56%）であった。

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 F 1, 2 に示した。
—雄—

全投与期間における 1 日当たりの被験物質摂取量 (g/kg body weight per day) は、2000 ppm 群 : 0.068~0.190 (平均 : 0.098) 、6325 ppm 群 : 0.188~0.561 (平均 : 0.279) 、20000 ppm 群 : 0.554~1.933 (平均 : 0.819) の範囲にあった。

全投与期間にわたって平均した各投与群の被験物質摂取量の比率は、2000 ppm 群の被験物質摂取量に対して、6325 ppm 群で平均 2.8 倍、20000 ppm 群で平均 8.2 倍であり、摂水量の低値に伴なって設定用量比 (公比 $\sqrt{10}$) よりも僅かに低い値を示した。

—雌—

全投与期間における 1 日当たりの被験物質摂取量 (g/kg body weight per day) は、2000 ppm 群 : 0.098~0.219 (平均 : 0.131) 、6325 ppm 群 : 0.270~0.638 (平均 : 0.364) 、20000 ppm 群 : 0.761~1.975 (平均 : 1.128) の範囲にあった。

全投与期間にわたって平均した各投与群の被験物質摂取量の比率は、2000 ppm 群の被験物質摂取量に対して、6325 ppm 群で平均 2.8 倍、20000 ppm 群で平均 8.8 倍であり、摂水量の低値に伴なって設定用量比 (公比 $\sqrt{10}$) よりも僅かに低い値を示した。

Ⅲ-7 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 7, 8 と APPENDIX G 1, 2 に示した。

—雄—

ヘモグロビン濃度の増加と血小板数の減少が 20000 ppm 群に認められた。

—雌—

赤血球数とヘモグロビン濃度の減少が全投与群に、ヘマトクリット値の減少が 6325 ppm 以上の群に認められた。また、血小板数の増加が 20000 ppm 群に認められた。

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 と APPENDIX H 1, 2 に示した。

—雄—

A/G 比とカリウムの増加、並びに、総コレステロールとリン脂質の減少が 6325 ppm 以上の群に認められた。総蛋白とトリグリセライドの減少、並びに、LDH の低下が 20000 ppm 群に認められた。その他、ALP に変化がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

—雌—

ALT の低下と無機リンの増加が 6325 ppm 以上の群に認められた。A/G 比と尿素窒素の増加、総蛋白の減少、並びに、AST と LDH の低下が 20000 ppm 群に認められた。

Ⅲ-9 尿検査

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

—雄—

pH の低下とケトン体の陽性例の増加が 20000 ppm 群に認められた。蛋白に変化がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

—雌—

蛋白の陽性度の増加が全投与群で、潜血の陽性例の増加と pH の低下が 6325 ppm 以上の群に認められた。

Ⅲ-10 病理学的検査

Ⅲ-10-1 剖検

剖検所見を APPENDIX J 1~6 に示した。

—雌雄—

投与群に特徴的な所見は認められなかった。

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 と APPENDIX K 1, 2、APPENDIX L 1, 2 に示した。

—雄—

副腎、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓及び脳で実重量や体重比に統計学的な有意差がみられたが、解剖時体重の低値に起因する変化と考えられた。

—雌—

腎臓の体重比の高値が全投与群で認められた。なお、副腎、卵巣、心臓、肺、脾臓、肝臓及び脳で実重量や体重比に統計学的な有意差がみられたが、解剖時体重の低値に起因する変化と考えられた。

Ⅲ-10-3 病理組織学的検査

主な腫瘍性病変と非腫瘍性病変及びそれらの発生数を TABLE 15~18 に示した。また、非腫瘍性病変を APPENDIX M 1~6 に示した。腫瘍性病変の結果は、担腫瘍動物数と腫瘍数の結果を APPENDIX N 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を APPENDIX O 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を APPENDIX P 1, 2 に、転移性病変を APPENDIX Q 1~6 に示した。また、本試験でみられた腫瘍について、日本バイオアッセイ研究センターにおけるヒストリカルコントロールデータ (試験毎の発生率 (最小%~最大%) と平均発生率(%), 発生匹数/総匹数) を TABLE 19 に示した。

—雄—

1) 腫瘍性病変

投与群に腫瘍の発生増加はみられなかった。なお、20000 ppm 群で甲状腺の C-細胞腺腫の発生が減少した。

2) 非腫瘍性病変

<腎臓>

乳頭壊死の発生が 20000 ppm 群で増加 (軽度 10 匹、中等度 1 匹) した。乳頭壊死は腎乳頭の組織に核の消失がみられるもので、乳頭部先端の組織が欠損したものも存在した。乳頭壊死は、乳頭の先端から 1/3 以内の領域の壊死をもつものを軽度、乳頭の欠損がみられるものあるいは壊死の領域が乳頭の 1/3 を超えるものを中等度とした。

その他、慢性腎症と網膜萎縮が 6325 ppm 以上の群で減弱し、肝臓の好酸性小増殖巣と甲状腺の C-細胞増生が 20000 ppm 群で減少した。なお、6325 ppm 群の肝臓の肉芽形成発生に統計学的な有意差が示されたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

—雌—

1) 腫瘍性病変

<脾臓>

単核球性白血病の発生は、Peto 検定 (死亡率法) で増加傾向を示した。しかしながら、投与群における単核球性白血病の発生 (2000 ppm 群 : 5 匹、10%、6325 ppm 群 : 7 匹、14% 及び 20000 ppm 群 : 6 匹、12%) は、ヒストリカルコントロールデータの範囲内 (最小 2% ~ 最大 26%、平均発生率 13.1%) であることから、この腫瘍の発生増加は被験物質投与によるものではないと判断した。

<子宮>

子宮内膜間質性ポリープの発生は、Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示した。しかし、子宮内膜間質性ポリープの 20000 ppm 群における発生（12 匹、24%）は、ヒストリカルコントロールデータの範囲内（最小 2%～最大 28%、平均発生率 14.5%）であることから、この腫瘍の発生増加は被験物質投与によるものではないと判断した。

その他、腫瘍性病変については乳腺の腺腫と線維腺腫を合わせた発生が 6325 ppm 以上の群で減少した。

2) 非腫瘍性病変

<腎臓>

乳頭壊死（軽度から中等度）が全投与群で増加し、投与濃度に対応して程度が増強した。また、乳頭壊死に伴なって発生したと考えられる乳頭の鉍質沈着（軽度から中等度）と腎盂の尿路上皮過形成（軽度から重度）が 6325 ppm 以上の群にみられ、いずれも投与濃度に対応して増加した。乳頭の鉍質沈着は、微小な病変が散在するものを軽度、塊状病変として認められるものを中等度とした。また、腎盂の尿路上皮過形成は、上皮の多層化を示すものを軽度、多層化とともに皺曲が認められるものを中等度、皺曲の範囲が腎盂全体の 1/2 を超えるものを重度とした。

その他、肝臓の肉芽形成が 6325 ppm 以上の群で減少し、網膜萎縮が 6325 ppm 以上の群で減弱した。鼻腔の鉍質沈着、副腎の紫斑症様変化及び鼻涙管の炎症が 20000 ppm 群で減少した。

III-10-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 20 に示した。

—雄—

投与群に特定の病変あるいは腫瘍による死亡の増加はみられなかった。

—雌—

腎臓病変による死亡が、20000 ppm 群のみに 8 匹みられた。

IV 考察及びまとめ

アセト酢酸メチルのラットを用いた2年間の混水経口投与（投与濃度：2000 ppm, 6325 ppm, 20000 ppm）によって、腫瘍の発生増加は認められなかったが、腎臓に非腫瘍性病変の発生が認められた。

IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量、摂水量

雄投与群の生存率は、対照群とほぼ同様であった。雌 20000 ppm 群の生存率は試験中期より生存率の低下がみられ、死因は腎臓病変（8 匹）によるものが多かった。一般状態の観察では、赤色尿が試験後半に雌の 6325 ppm 以上の群に認められた。赤色尿が認められた動物のうち腎臓病変を示した動物は、6325 ppm 群 8 匹中 7 匹、20000 ppm 群 23 匹中 21 匹であることから、赤色尿は腎臓病変に起因するものと推察された。体重は、雌雄とも 2000 ppm 群では対照群と同様の体重推移を示したが、6325 ppm 以上の群では投与濃度に対応した増加抑制を示した。摂餌量は、雄の 6325 ppm 以上の群と雌の全投与群で投与期間を通して投与濃度に対応した低値が認められた。摂水量は、雌雄とも全投与群で投与期間を通して投与濃度に対応した低値がみられた。

IV-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

雌雄とも、投与群に腫瘍及び腫瘍に関連した所見の発生増加は認められなかった。

IV-3 非腫瘍性病変

雌雄とも腎臓に影響がみられた。

腎臓の乳頭壊死の発生増加が、雄 20000 ppm 群及び雌全投与群でみられた。また、乳頭壊死に随伴すると考えられる乳頭の鉍質沈着と腎盂の尿路上皮過形成の発生増加が雌 6325 ppm 以上の群で認められた。なお、アセト酢酸メチルの腎臓への影響を示す変化として、雌では腎臓重量（体重比）の増加が全投与群で、血漿中の尿素窒素の増加が 20000 ppm 群で、尿中潜血の陽性例の増加と赤色尿が 6325 ppm 以上の群で認められた。

IV-4 量-反応関係

被験物質投与による影響が雌雄とも腎臓にみられた。雄の腎臓への影響（腎臓の乳頭壊死）のみられた濃度は、20000 ppm であった。雌の腎臓への影響として、乳頭壊死、乳頭の鉍質沈着及び腎盂の尿路上皮過形成の発生増加、ならびに血漿中の尿素窒素の増加と腎臓重量（体重比）の増加がみられた。その中で、腎臓重量の増加と乳頭壊死の発生増加は、最低濃度の 2000 ppm から認められた。

IV-5 他文献との比較等

① がん原性試験

アセト酢酸メチルのラットを用いたがん原性試験の報告はない。

② その他の反復投与試験との比較

日本バイオアッセイ研究センターで実施したアセト酢酸メチルの飲水による13週間経口投与試験（文献 6）において、がん原性試験と同濃度の20000 ppm 群で雌雄ともに腎臓への影響、すなわち、腎臓重量の増加、血漿中の尿素窒素の増加、乳頭壊死の発生（雄2匹、雌5匹）が認められた。がん原性試験では、雄の20000 ppm 群と雌の2000 ppm 以上の群に腎臓の乳頭壊死が認められ、雌の20000 ppm 群では腎臓病変による死亡が増加した。雌においては、雄よりも低い投与濃度から腎臓への影響がみられ、アセト酢酸メチルに対する腎臓の感受性に性差が存在することが明らかにされた。20000 ppm 群のほとんどの動物に乳頭壊死が認められ、より低い投与濃度で腎臓病変がみられたことは、投与期間の延長により被験物質の腎臓への慢性影響が増強されたものと推察される。

その他、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の結果が報告されている（文献 9）。この試験では、アセト酢酸メチルを100、300及び1000 mg/kgの用量で、雄ラットには交配前14日間およびその後交配期間を含む35日間の合計49日間、雌ラットには交配前14日間、交配期間（最長14日間）、妊娠期間及び哺育3日間まで毎日強制経口投与した。その結果、1000 mg/kgでも被験物質投与による影響は認められなかった。しかし、本試験では、被験物質の影響（腎臓への影響）が認められ、影響のみられた投与濃度は、雄20000 ppm、雌2000 ppmであり、それぞれの被験物質摂取量は0.819 g/kg body weight per day、0.131 g/kg body weight per dayであった。本試験において、1 g/kg body weight per day以下の被験物質摂取量で毒性影響が認められたことは、投与期間の延長により、被験物質の慢性毒性はより低用量から発現することを示している。

③ 変異原性

日本バイオアッセイ研究センターの試験結果によれば、アセト酢酸メチルの変異原性は陽性であった。微生物を用いる復帰突然変異試験では、代謝活性化の有無に関わらず大腸菌（WP2 *uvrA/pKM101*）において、溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められた（文献 10）。また、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では、チャイニーズハムスター株細胞（CHL/IU）を用いた試験で代謝活性化を用いる場合に異数性が示され、染色体異常が誘発された（文献 11）。

④ 代謝

アセト酢酸メチルは、ほ乳類の生体内では加水分解と代謝性分解によって、アセト酢酸に変換される（文献 12）。

V 結論

F344/DuCrj ラットを用いてアセト酢酸メチルの 2 年間 (104 週間) にわたる混水投与によるがん原性試験を行った結果より以下の結論を得た。

雌雄とも、腫瘍の発生増加は認められず、ラットに対するがん原性を示す証拠は認められなかった。なお、被験物質投与による腎臓への影響が雄 20000 ppm 群、雌 2000 ppm 以上の群で認められた。

VI 文献

1. 化学工業日報社. 2004. 14504 の化学商品. 東京：化学工業日報社, 380.
2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.
3. Simons WW. 1978. The Sadtler Handbook of Infrared Spectra. Philadelphia, PA: Sadtler Research Laboratories, 766.
4. 労働省労働基準局長. 1997. がん原性試験による調査の基準について. 基発 第 144 号, 平成 9 年 3 月 11 日
5. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: “Carcinogenicity Studies”, Paris : Organisation for Economic Co-operation and Development.
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 13 週間毒性試験（混水試験）報告書. 神奈川：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.
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. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S et al. 1980. Guidelines for simple, sensitive significance test for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens : A Critical Appraisal. Lyon : IARC. IARC Monographs Suppl 2 : 311-426.
9. 厚生省生活衛生局企画課生活科学安全対策室 監修. 1998. アセト酢酸メチルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験. 化学物質毒性試験報告, Vol.6, 183-193, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京.
10. 労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質調査課. 2000. 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集. 補遺 2 版, 103-104, 東京：日本化学物質安全・情報センター.

11. 日本化学物質安全・情報センター. 2005. 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集. 補遺 3 版, 224-225, 東京.
12. Clayton GD, Clayton FE eds. 1982. Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. Vol. 2C, Toxicology. 3rd ed. New York. John Wiley Sons.