

アセト酢酸メチルのマウスを用いた
経口投与によるがん原性試験（混水試験）報告書

試験番号：0449

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マウス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マウスに 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マウスを用いた
経口投与によるがん原性試験（混水試験）報告書

試験番号：0449

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	14
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	15

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	16
Ⅲ-10-4 死因	17
Ⅳ 考察及びまとめ	18
Ⅳ-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量、摂水量	18
Ⅳ-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変	18
Ⅳ-3 非腫瘍性病変	18
Ⅳ-4 量-反応関係	18
Ⅳ-5 投与濃度設定の評価	18
Ⅳ-6 他文献との比較等	19
Ⅴ 結論	20
Ⅵ 文献	21

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、被験物質投与による生存率の低下は認められなかった。投与群の体重及び摂餌量は、雌雄とも、対照群と同様に推移した。摂水量の僅かな低値が雌雄の 20000 ppm 群に認められた。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。また、雌雄とも、非腫瘍性病変の発生増加も認められなかった。

以上のように、Crj:BDF₁ マウス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、マウス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 (マウス 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	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	6	12	9	6		
	脾臓	血管腫	0	4	1	1		
	肝臓	血管腫	2	2	4	2		
		肝細胞腺腫	9	5	14	9		
	ハーダー腺	腺腫	1	5	4	2		
悪性 腫瘍	肺	細気管支-肺胞上皮癌	3	8	4	4		
	リンパ節	悪性リンパ腫	6	3	9	5		
	脾臓	血管肉腫	1	4	0	2		
		悪性リンパ腫	5	4	1	2		
	肝臓	組織球性肉腫	5	4	2	1		
		肝細胞癌	4	2	7	5		

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 (マウス 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	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	1	1	6	3		
	肝臓	肝細胞腺腫	5	9	2	4		
	下垂体	腺腫	6	6	11	5		
	卵巣	嚢胞腺腫	1	1	3	1		
	ハーダー腺	腺腫	4	2	5	2		
悪性 腫瘍	肺	細気管支-肺胞上皮癌	0	1	2	4	↑	↑
	リンパ節	悪性リンパ腫	7	7	11	8		
	脾臓	悪性リンパ腫	6	8	6	10		
	肝臓	肝細胞癌	0	1	1	0		
		組織球性肉腫	4	1	1	1		
	子宮	組織球性肉腫	11	14	16	17		

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

↑: $p \leq 0.05$ で有意増加 (Peto, Cochran-Armitage 検定)

I 試験材料

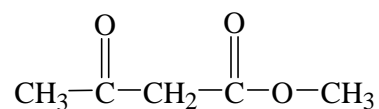
I-1 被験物質の性状等

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3月21日～2003年6月30日)
FGL01 (2003年6月30日～2004年3月25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 Crj:BDF₁ マウス（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：22.0～25.2g、雌：18.3～21.3g）を選別し、試験に用いた。

なお、Crj:BDF₁ マウス（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化学品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。

13週間試験にはCrj:BDF1マウス(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匹のマウスを用いた。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群では雌雄とも体重増加の抑制は認められな

かったが、雄で腎臓重量の体重比の増加、雌雄に血漿中の総蛋白、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と考えられる変化は認められなかった。従って、13 週間試験の無毒性量(NOAEL)は、雄の腎臓重量（体重比）と血液生化学検査の指標値への影響、雌の血液生化学検査の指標値への影響をエンドポイントとして、20000 ppm（一日当たり被験物質摂取量として雄 2.270~4.314 g/kg body weight per day、雌 3.211~3.900 g/kg body weight per day に相当）と判断した。

当被験物質は、13 週間試験で得られた無毒性量が OECD 化学品テストガイドライン「げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験」（文献 7）で規定する限界試験の用量 1000 mg/kg よりも高い値を示すという低毒性物質である。しかしながら、一般に、慢性毒性試験の無毒性量は、亜慢性毒性試験の無毒性量よりも低い値を示すと考えられることから、がん原性試験では 20000 ppm の当被験物質 2 年間投与によって毒性兆候が発現すると推察される。従って、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定義されるがん原性試験の最大耐用量(MTD)は、13 週間試験で求めた無毒性量に近い値であると考えられる。

以上のように、13 週間試験の無毒性量が雌雄とも 20000 ppmであることを考慮して、がん原性試験の最高用量は 20000 ppm に設定し、中間用量と低用量を公比 $\sqrt{10}$ で 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 98.5~106%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、マウス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 : 101%、20000 ppm : 98.5%、8 日間で 2000 ppm : 101%、20000 ppm : 95.5%、12 日間で 2000 ppm : 102%、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 8）。

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：108 室、雌：109 室（2002 年 3 月 7 日～2002 年 6 月 13 日）、雄：202 室、雌：204 室（2002 年 6 月 13 日～2004 年 3 月 11 日）、雄：109 室、雌：111 室（2004 年 3 月 11 日～2004 年 3 月 25 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 : $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$

<108 室 ; $23.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、109 室 ; $23.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、202 室 ; $23.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、
204 室 ; $22.9 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、109 室 ; $22.8 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ 、111 室 ; $23.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ >

湿 度 : $55 \pm 15\%$

<108 室 ; $54 \pm 1\%$ 、109 室 ; $55 \pm 1\%$ 、202 室 ; $54 \pm 2\%$ 、
204 室 ; $53 \pm 2\%$ 、109 室 ; $57 \pm 1\%$ 、111 室 ; $53 \pm 1\%$ >

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

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 (112(W)×212(D)×120(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、各投与群には脱イオン水を用いて所定の濃度に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。

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、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（ウロラプスティックス、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、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、骨髄（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、胆嚢、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（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、小数点以下第 1 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 9）、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、対照群より高値を示した。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：25 匹（50%）、2000 ppm 群：37 匹（74%）、6325 ppm 群：37 匹（74%）、20000 ppm 群：37 匹（74%）であった。

—雌—

全投与群の生存率は、対照群より低値を示した。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：36 匹（72%）、2000 ppm 群：23 匹（46%）、6325 ppm 群：31 匹（62%）、20000 ppm 群：26 匹（52%）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。

—雌雄—

投与群に特徴的な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 3, 4 及び APPENDIX C 1, 2 に示した。

—雄—

全投与群とも、投与期間を通して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：97%、6325 ppm 群：92%、20000 ppm 群：97%であった。

—雌—

全投与群とも、投与期間を通して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：99%、6325 ppm 群：105%、20000 ppm 群：95%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—

全投与群とも、投与期間を通して対照群と同様の摂餌量推移を示した。

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：4.2g（100%）、2000 ppm 群：4.3g（102%）、6325 ppm 群：4.3g（101%）、20000 ppm 群：4.2g（99%）であった。

—雌—

全投与群とも、投与期間を通して対照群と同様の摂餌量推移を示した。

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：3.8g（100%）、2000 ppm 群：3.8g（101%）、6325 ppm 群：3.8g（101%）、20000 ppm 群：3.6g（97%）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—

20000 ppm 群では、投与 26 週以降に摂水量の低値が認められた。6325 ppm 以下の投与群では、対照群と同様の推移を示した。

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：4.1g（100%）、2000 ppm 群：4.1g（101%）、6325 ppm 群：4.2g（103%）、20000 ppm 群：3.8g（95%）であった。

—雌—

20000 ppm 群では、投与初期から投与終了時にわたり摂水量の低値が散見された。6325 ppm 以下の投与群では、対照群と同様の推移を示した。

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：4.2g（100%）、2000 ppm 群：4.3g（103%）、6325 ppm 群：4.3g（102%）、20000 ppm 群：4.0g（94%）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：0.151～0.375（平均：0.216）、6325 ppm 群：0.492～1.244（平均：0.715）、

20000 ppm 群：1.372～3.704（平均：2.076）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 3.3 倍、20000 ppm 群で平均 9.5 倍であり、設定用量比（公比 $\sqrt{10}$ ）にほぼ対応した被験物質摂取量を示した。

—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：0.224～0.445（平均：0.316）、6325 ppm 群：0.709～1.346（平均：0.990）、20000 ppm 群：2.259～3.997（平均：2.954）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 3.1 倍、20000 ppm 群で平均 9.4 倍であり、設定用量比（公比 $\sqrt{10}$ ）にほぼ対応した被験物質摂取量を示した。

Ⅲ-7 血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX G 1, 2 に示した。

—雌雄—

特に変化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 と APPENDIX H 1, 2 に示した。

—雄—

特に変化は認められなかった。

—雌—

ALP の上昇が 20000 ppm 群に認められた。その他、CK 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。

Ⅲ-9 尿検査

尿検査の結果を TABLE 8 と APPENDIX I 1, 2 に示した。

—雄—

特に変化は認められなかった。

—雌—

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。

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。

—雄—

投与群に特徴的な所見は認められなかった。

—雌—

肺の結節が投与群で増加した。その発生匹数は、対照群で 1 匹、2000 ppm 群で 1 匹、6325 ppm 群で 3 匹、20000 ppm 群で 7 匹であった。

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 9, 10 と APPENDIX K 1, 2、APPENDIX L 1, 2 に示した。

—雄—

心臓、腎臓及び肝臓の体重比の高値が 6325 ppm 群で認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

—雌—

腎臓の体重比の高値が 20000 ppm 群で認められた。

Ⅲ-10-3 病理組織学的検査

主な腫瘍性病変の発生数を TABLE 11 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 12 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

2) 非腫瘍性病変

投与群に特徴的な所見は認められなかった。

—雌—

1) 腫瘍性病変

<肺>

細気管支-肺胞上皮癌の発生は、Peto 検定（有病率法、死亡率法+有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。しかし、細気管支-肺胞上皮癌の投与群の発生数（2000 ppm 群：1 匹、2%、6325 ppm 群：2 匹、4%及び 20000 ppm 群：4 匹、8%）は、ヒストリカルコントロールデータの範囲内（最小 0%～最大 8%、平均発生率 2.9%）であった。

2) 非腫瘍性病変

投与群に特徴的な所見は認められなかった。

Ⅲ-10-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 13 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—

白血病により死亡／瀕死となった動物が投与群で増加した。白血病により死亡／瀕死となった動物数は、対照群では 2 匹、2000 ppm 群では 7 匹、6325 ppm 群では 7 匹、20000 ppm 群では 8 匹であった。

IV 考察及びまとめ

アセト酢酸メチルのマウスを用いた 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。

IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量、摂水量

生存率の低下が雌の全投与群にみられ、投与群では白血病による死亡が対照群に比べ僅かに増加した。しかし、雌投与群における白血病の発生率は、対照群と比べて差がなかったことから、雌の生存率低下は被験物質の投与によるものとは考えられなかった。雄では投与群に生存率の低下は認められなかった。体重及び摂餌量は、雌雄とも対照群と同様に推移した。摂水量の僅かな低値が、雄では 20000 ppm 群の 26 週から投与終了時にかけて、雌では 20000 ppm 群の投与初期から投与終了時にかけて認められた。

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。

IV-3 非腫瘍性病変

雌雄とも、投与群に非腫瘍性病変の発生増加は認められなかった。

IV-4 量-反応関係

雌雄とも最高投与濃度である 20000 ppm 群（平均被験物質摂取量は、雄：2.076 g/kg body weight per day、雌：2.954 g/kg body weight per day）でも被験物質によると考えられる変化は認められなかった。

IV-5 投与濃度設定の評価

13 週間試験の結果より、がん原性試験の最大耐量は 20000 ppm であると推定し、本試験の最高濃度を 20000 ppm に設定した（II-1-5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由参照）。本試験の最高用量 20000 ppm 群の平均被験物質摂取量は、雄 2.076 g/kg body weight per day、雌 2.954 g/kg body weight per day であり、OECD 化学品テストガイドライン「408 げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験」（文献 7）での限界試験の用量 1000 mg/kg を超えた。中間用量 6325 ppm 群の平均被験物質摂取量は、雄 0.715 g/kg body weight per day、雌 0.990 g/kg body weight per day であり、限界試験の用量に近い値を示した。アセト酢酸メチルの 13 週間経口投与試験で 40000 ppm 投与群の雄に腎臓重量（体重比）と血液生化学検査の指標値への影響、雌に血液生化学検査の指標値への影響がみられ、無毒性量(NOAEL)値が 20000 ppm であったという毒性結果に基づいて、マウスの最大耐量を 20000 ppm と推定したが、本試験の結果から、最高用量 20000 ppm が最大耐

量以下であった可能性は否定できない。しかしながら、アセト酢酸メチルは、無毒性量が限界試験の最高用量を超えるほどの低毒性物質であり、本試験の最高濃度 20000 ppm は、亜慢性毒性試験の限界用量を超えるが、中間用量の 6325 ppm の平均被験物質摂取量は限界試験の用量 1000 mg/kg に近い値であることから、がん原性を検索するための試験に用いた用量設定は、充分かつ妥当であると考えられる。

IV-6 他文献との比較等

① がん原性試験

アセト酢酸メチルのマウスを用いたがん原性試験の報告はない。

② 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)。

③ 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

Crj:BDF₁ マウス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、マウスに対するがん原性を示す証拠は認められなかった。また、雌雄投与群に腫瘍以外の毒性影響も認められなかった。

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. 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. OECD. 1998. OECD Guideline for Testing of Chemicals 408: “Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents”, Paris : Organisation for Economic Co-operation and Development.
8. 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.
9. 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.
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. 3rd ed. Vol. 2C, 2281-2282, New York. John Wiley Sons.