

酢酸イソプロピルのマウスを用いた
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0611

CAS No. 108-21-4

2009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

酢酸イソプロピルのマウスを用いた吸入によるがん原性試験

試験目的

酢酸イソプロピルをマウスに 104 週間全身暴露し、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 長野 嘉介
神奈川県秦野市平沢 2445

酢酸イソプロピルのマウスを用いた
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0611

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 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由	5
II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整	6
II-1-7 被験物質濃度の測定	6
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	7
II-2-3 飼育条件	7
(1) 飼育環境	7
(2) 飼料	8
(3) 飲水	8

Ⅱ-3	観察・検査項目及び方法	8
Ⅱ-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	8
Ⅱ-3-2	体重測定	8
Ⅱ-3-3	摂餌量測定	8
Ⅱ-3-4	血液学的検査	9
Ⅱ-3-5	血液生化学的検査	9
Ⅱ-3-6	尿検査	9
Ⅱ-3-7	病理学的検査	9
(1)	剖検	9
(2)	臓器重量	9
(3)	病理組織学的検査	10
Ⅱ-4	数値処理と統計方法	10
Ⅱ-4-1	数値の取り扱いと表示	10
Ⅱ-4-2	統計処理	10
Ⅲ	試験成績	12
Ⅲ-1	生死状況	12
Ⅲ-2	一般状態	12
Ⅲ-3	体重	12
Ⅲ-4	摂餌量	13
Ⅲ-5	血液学的検査	13
Ⅲ-6	血液生化学的検査	13
Ⅲ-7	尿検査	13
Ⅲ-8	病理学的検査	14
Ⅲ-8-1	剖検	14
Ⅲ-8-2	臓器重量	14
Ⅲ-8-3	病理組織学的検査	14
Ⅲ-8-4	死因	16
Ⅳ	考察及びまとめ	17
Ⅳ-1	生存率、一般状態、体重、摂餌量	17
Ⅳ-2	腫瘍性病変	17
Ⅳ-3	その他の影響	18
Ⅳ-4	無毒性量 (NOAEL) / 最小毒性量 (LOAEL)	18

IV-5	他文献との比較等	19
V	結論	20
VI	文献	21
VII	予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態 及び試験計画書に従わなかつたこと	23

要約

酢酸イソプロピルのがん原性を検索する目的で B6D2F1/Crlj マウスを用いた吸入による 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、各群雌雄とも 50 匹とし、合計 400 匹を用いた。被験物質の投与は、酢酸イソプロピルを 1 日 6 時間、1 週 5 日間、104 週間、動物に全身暴露することにより行った。投与濃度は、雌雄とも 0 (対照群)、1000、2000 及び 4000 ppm とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

酢酸イソプロピルの暴露の結果、動物の生存率及び一般状態に酢酸イソプロピルの影響はみられなかった。体重は雌雄の 4000 ppm 群で増加の抑制 (最終体重、雄：対照群の 89%、雌：対照群の 91%) がみられた。摂餌量は雌雄とも、4000 ppm 群は投与期間を通じて、2000 ppm 群は投与期間前半、やや低値であった。

病理組織学的検査の結果、雌雄とも酢酸イソプロピルに関連した腫瘍の発生増加は認められなかった。非腫瘍性病変としては、雌雄とも鼻腔に嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生及び粘膜下の腺組織の呼吸上皮化生の増加がみられ、特に、嗅上皮の萎縮は雌雄とも最低濃度群の 1000 ppm 群までみられた。

また、本試験における酢酸イソプロピルのマウスに対する 2 年間吸入暴露による最小毒性量 (LOAEL) は、鼻腔への影響をエンドポイントとして 1000 ppm であると考えられた。

以上のように、B6D2F1/Crlj マウスを用いて、酢酸イソプロピルの 2 年間 (104 週間) にわたる吸入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、酢酸イソプロピルのマウスに対するがん原性はなかった。

酢酸イソプロピ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	1000	2000	4000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		49	50	50	50		
良性 腫瘍	肺 肝臓	細気管支-肺胞上皮腺腫	2	3	2	1		
		肝細胞腺腫	15	15	6 *	9		
悪性 腫瘍	肺 リンパ節	細気管支-肺胞上皮癌	5	3	1	1		
		悪性リンパ腫	7	9	4	5		
	肝臓	肝細胞癌	6	4	3	4		
		組織球性肉腫	0	1	3	2		

酢酸イソプロピ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	1000	2000	4000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性 腫瘍	肝臓	肝細胞腺腫	8	4	4	7		
		下垂体 腺腫	9	10	6	4		
	卵巣	血管腫	3	1	1	1		
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	1	3	2	1		
	ハーダー腺	腺腫	4	1	4	1		
悪性 腫瘍	肺 リンパ節	細気管支-肺胞上皮癌	2	3	2	0		
		悪性リンパ腫	16	16	9	9		
	肝臓	血管肉腫	1	5	1	0		
		組織球性肉腫	3	2	2	1		
	子宮 乳腺	組織球性肉腫 腺癌	10 1	9 0	11 3	9 0		

* : $p \leq 0.05$ で有意** : $p \leq 0.01$ で有意

(Fisher 検定)

↑ : $p \leq 0.05$ で有意増加↑↑ : $p \leq 0.01$ で有意増加

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

↓ : $p \leq 0.05$ で有意減少↓↓ : $p \leq 0.01$ で有意減少

(Cochran-Armitage 検定)

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

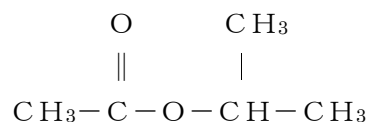
I-1-1 名称等

名 称： 酢酸イソプロピル(Isopropyl acetate)

CAS No. : 108-21-4

I-1-2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式：



分 子 量： 102.13

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状： 無色透明の液体

沸 点： 88.6°C

蒸 気 圧： 60.37mmHg (25°C)

比 重： 0.8718 (20°C/4°C)

溶 解 性： アセトン、エタノールに可溶

保 管 条 件： 室温で暗所に保管

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号： KLE3931 (2005/12/26~2006/01/12)

EWH6219 (2006/01/13~2006/07/18)

DPP3664 (2006/07/19~2007/03/01)

DPF2284 (2007/03/02~2007/10/02)

TSK3141 (2007/10/03~2007/12/21)

製 造 元： 和光純薬工業(株)

グ レ ー ド： 和光特級

純 度： 99.9～100.0%（和光純薬工業(株) 検査成績書データ）

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（(株)日立製作所 M-80B）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（(株)島津製作所 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、被験物質は酢酸イソプロピルであることを確認した。

また、試験に使用した酢酸イソプロピル中には、不純物として 2-プロパノールが確認され、その含有量は 0.031～0.044%であった。

それらの結果は APPENDIX 1-1 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（アジレントテクノロジーズ 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 1-2 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 B6D2F1/Crlj 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（群構成時体重範囲、雄：21.8～24.9g、雌：18.1～21.8g）を選別し、試験に用いた。

なお、B6D2F1/Crlj マウス（SPF）を選出した理由は、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

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

II-1-2 被験物質の投与方法

投与は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行った。

II-1-3 投与期間

投与期間は、1日6時間、原則として1週5日の暴露で104週間とし、計492回の暴露を行った。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、1000、2000及び4000 ppm（体積比 v/v）の3段階（公比2）に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

II-1-5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与経路は被験物質を生産、使用する作業環境における労働者への主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

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化学品的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。

投与濃度は2週間試験（試験番号0552）及び13週間試験（試験番号0559）の結果（文献6、7）をもとに決定した。2週間試験は0（対照群）、500、1000、2000、4000及び8000 ppmの濃度で行った。その結果、8000 ppm群で動物の死亡がみられたが、4000 ppm以下の群では死亡はみられなかった。13週間試験は0（対照群）、250、500、1000、2000及び4000 ppmの濃度で行った。その結果、各群とも動物の死亡はみられず、体重にも酢酸イソプロピルの影響と思われる変化はみられなかったが、4000 ppm群では、病理組織学的検査で雌雄とも鼻腔に変化がみられた。また、臓器重量、血液学的検査及び血液生化学的検

査にも変化がみられた。しかし、病理組織学的検査でみられた鼻腔の変化はいずれも軽度であり、その他の検査にも重篤な変化はみられなかった。また、1000 ppm 以下の群には、雌雄とも酢酸イソプロピルの暴露の明らかな影響は認められなかった。これらの結果より、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも 4000 ppm を最高濃度とし、以下、2000、1000 ppm（公比 2）と決定した。

II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質の発生方法は FIGURE 1 に示した。被験物質供給装置（柴田科学(株) 特注）の発生容器内の被験物質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蒸発させた。この被験物質の蒸気を清浄空気（搬送空気）と混合し、さらに循環式恒温槽で一定温度に冷却、再加熱し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度はガスクロマトグラフで監視し、その濃度データをもとに設定濃度になるように被験物質の吸入チャンバーへの供給量を調節した。

II-1-7 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、自動サンプリング装置付ガスクロマトグラフ（(株) 島津製作所 GC-14B）により、暴露開始前から暴露終了後まで 15 分ごとに測定した。

濃度測定結果を TABLE A に示した。各投与群の被験物質濃度は、その平均値と設定濃度の差（（平均値－設定濃度）／設定濃度×100）が 0.1%以内、変動係数（標準偏差／平均値×100）が 0.9%以内であり、高い精度でチャンバー内濃度が管理されていることが示された。

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）
1000 ppm 群	50 匹（1101～1150）	50 匹（2101～2150）
2000 ppm 群	50 匹（1201～1250）	50 匹（2201～2250）
4000 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（503 室）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

検疫期間中は検疫室（517・518 室）で、馴化期間及び投与期間中は、吸入試験室（503 室）の吸入チャンバー内で動物を飼育した。

検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件及び使用したケージを以下に示した。検疫室、吸入試験室の温度、湿度は実測値（平均値±標準偏差）を < > 内に、また、吸入チャンバー内環境の測定結果は APPENDIX 2 に示した。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境には、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 : 検疫室 ; $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ < 517 室 ; $22.7 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、518 室 ; $23.0 \pm 0.0^{\circ}\text{C}$ >

吸入試験室 ; $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ < 503 室 ; $21.9 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ >

吸入チャンバー内 ; $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$

湿 度 : 検疫室 ; $55 \pm 15\%$ < 517 室 ; $54 \pm 1\%$ 、518 室 ; $54 \pm 1\%$ >

吸入チャンバー内 ; $50 \pm 20\%$

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 : 検疫室 ; 15~17 回/時

吸入試験室 ; 7~9 回/時

吸入チャンバー内 ; 飼育中 12 ± 1 回/時、暴露中 6 ± 0.5 回/時

圧 力 : 吸入チャンバー内 ; $0 \sim -15 \times 10\text{Pa}$

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 :

検疫期間 ; ステンレス製 2 連網ケージ (112(W)×212(D)×120(H) mm/匹)

馴化期間 ; ステンレス製 6 連網ケージ (95(W)×116(D)×120(H) mm/匹)

投与期間 ; ステンレス製 5 連網ケージ (100(W)×116(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 固型飼料 (30kGy- γ 線照射滅菌飼料) を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、全飼育期間を通して、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。

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 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 3 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、網赤血球比、白血球数、白血球分類

II-3-5 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 3 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、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、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-3-6 尿検査

投与 102 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、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）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-3-7 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。

なお、鼻腔については切歯の後端（レベル1）、切歯乳頭（レベル2）、第一臼歯の前端（レベル3）の3ヶ所（文献9）で切り出し（横断）、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。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は ppm を単位として、小数点以下第3位まで測定し、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。

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。

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 3 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、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にしてグレード 1~4 に分け、 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、各群ごとの総担腫瘍臓器数について、Peto 検定（文献 10）、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、Peto 検定、Fisher 検定は片側検定、その他の検定は両側検定を行い、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。

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 B 1, 2 及び FIGURE 2, 3 に示した。

—雄—

投与群の生存率に被験物質の影響はみられなかった。

各群の 104 週における生存動物数 (生存率) は、対照群 : 32 匹 (65%)、1000 ppm 群 : 36 匹 (72%)、2000 ppm 群 : 37 匹 (74%)、4000 ppm 群 : 35 匹 (70%) であった。

なお、対照群では投与 84 週の 5 日に 1 匹 (動物番号 1017) が事故死亡したため、同群の有効動物数は 49 匹となった。

—雌—

投与群の生存率に被験物質の影響はみられなかった。

各群の 104 週における生存動物数 (生存率) は、対照群 : 25 匹 (50%)、1000 ppm 群 : 26 匹 (52%)、2000 ppm 群 : 25 匹 (50%)、4000 ppm 群 : 37 匹 (74%) であった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C 1, 2 に示した。

—雌雄—

特記すべき所見はみられなかった。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE D 1~4 及び FIGURE 4, 5 に示した。

—雄—

4000 ppm 群で体重増加に抑制がみられた。

最終計測日 (104 週) の各投与群の体重は、対照群に対して 1000 ppm 群 : 100%、2000 ppm 群 : 101%、4000 ppm 群 : 89% であった。

—雌—

4000 ppm 群で体重増加に抑制がみられた。

最終計測日 (104 週) の各投与群の体重は、対照群に対して 1000 ppm 群 : 98%、2000 ppm 群 : 99%、4000 ppm 群 : 91% であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1~4 及び FIGURE 6, 7 に示した。

—雌雄—

4000 ppm 群では投与期間を通じて、2000 ppm 群は投与期間前半、摂餌量がやや低値であった。

Ⅲ-5 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F 1, 2 に示した。

—雄—

MCV と MCH の高値が 4000 ppm 群でみられた。

—雌—

MCV と MCH の高値及び網赤血球比の低値が 4000 ppm 群でみられた。

その他、MCH の高値が 1000 ppm 群にみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ-6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示した。

—雄—

無機リンの高値が 2000 ppm 以上の群でみられた。なお、2000 ppm 群と 4000 ppm 群の無機リンの平均値は対照群と同等であったが、対照群には極めて高値を示す動物が 1 匹おり、統計学的には 2000 ppm 群と 4000 ppm 群の値は有意な高値であった。

—雌—

グルコースの高値が 2000 ppm 以上の群でみられた。

なお、LDH とナトリウムの高値が 1000 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ-7 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

—雄—

ケトン体陽性例の増加が 4000 ppm 群でみられた。

—雌—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、pH の低下が 1000 ppm 群で、蛋白陽性度の増加が 2000 ppm 群でみられたが、それぞれ投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ-8 病理学的検査

Ⅲ-8-1 剖検

剖検所見を TABLE I 1~6 に示した。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる所見の増加は認められなかった。

Ⅲ-8-2 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 J 1, 2 と TABLE K 1, 2 に示した。

—雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、心臓の実重量の低値、精巣と肝臓の体重比の高値が 4000 ppm 群にみられたが、これらの変化は 4000 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと考えた。また、脳の実重量の低値が 2000 ppm 以上の群にみられたが、投与濃度との対応がみられず、体重比にも有意な変化がみられないことから、被験物質の影響とは考えなかった。

—雌—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、心臓と脳の実重量の低値が 4000 ppm 群にみられたが、これらの変化は 4000 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと考えた。

Ⅲ-8-3 病理組織学的検査

検査結果のうち非腫瘍性病変を TABLE L 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を TABLE M 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を TABLE N 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を TABLE O 1, 2 に、転移性病変を TABLE P 1, 2 に示した。

—雄—

1) 腫瘍性病変

被験物質の暴露による腫瘍の発生増加はみられなかった。

なお、2000 ppm 群の肝細胞腺腫、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生が、Fisher 検定

で減少を示したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

2) 非腫瘍性病変

<鼻腔>

嗅上皮と腺に病変の増加が観察された。

嗅上皮には、上皮の萎縮がみられる動物数の増加が全ての投与群で認められ、また、呼吸上皮化生のみられる動物数の増加が 2000 ppm 以上の群で認められ、4000 ppm 群では中等度の例も多くみられた。また、粘膜下の腺に呼吸上皮化生のみられる動物数とその程度の増加が 4000 ppm 群で認められた。なお、嗅上皮のエオジン好性変化については、発生匹数や程度が全ての投与群で減少した。

嗅上皮の萎縮は、嗅細胞数の減少により嗅上皮の厚さが低下した所見である。この所見は、軽度な例では鼻腔断面のレベル 2 の背側に認められ、中等度の例ではレベル 3 まで変化がみられた。また、嗅上皮の呼吸上皮化生は、嗅上皮が線毛を有する呼吸上皮に置き換わった変化であり、程度が軽度な例ではレベル 2 または 3 の背側にのみ認められ、中等度の例ではレベル 2 と 3 の両レベルに変化がみられた。腺組織の呼吸上皮化生は、粘膜下の腺組織が線毛を有する呼吸上皮で置き換えられた変化であり、2000 ppm 以上の群では、主に萎縮や呼吸上皮化生がみられた嗅上皮の粘膜下に多く認められた。

—雌—

1) 腫瘍性病変

被験物質の暴露による腫瘍の発生増加はみられなかった。

2) 非腫瘍性病変

<鼻腔>

嗅上皮と腺に病変の増加が観察された。

嗅上皮には、上皮の萎縮がみられる動物数の増加が全ての投与群で認められ、また、呼吸上皮化生のみられる動物数やその程度の増加が 2000 ppm 以上の群で認められた。また、粘膜下の腺組織に呼吸上皮化生のみられる動物数やその程度の増加が 2000 ppm 以上の群で認められた。

その他、副腎の紡錘形細胞増生の発生匹数が 1000 ppm 群と 2000 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。

Ⅲ-8-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE Q に示した。

—雌雄—

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。

IV 考察及びまとめ

酢酸イソプロピルのマウスを用いた 2 年間の全身暴露による吸入試験（投与濃度：0、1000、2000 及び 4000 ppm）を行ったが、腫瘍性病変の発生に酢酸イソプロピルの影響は認められなかった。

IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

生存率及び一般状態に酢酸イソプロピルの暴露による影響はみられなかった。

体重は雌雄の 4000 ppm 群で増加の抑制（最終体重、雄：対照群の 89%、雌：対照群の 91%）がみられた。

摂餌量は雌雄とも、4000 ppm 群は投与期間を通じて、2000 ppm 群は投与期間前半、やや低値であった。

IV-2 腫瘍性病変

最高濃度の 4000 ppm 群においても、雌雄とも酢酸イソプロピルに関連した明らかな腫瘍の発生増加は認められなかった。

IARC（文献 11）は、がん原性試験の最高投与濃度を、亜慢性試験の結果からある程度の毒性影響が起きることが推定される濃度であり、腫瘍発生の結果以外で動物の寿命の長さを短縮させず、対照群と比較して 10%以上の体重増加の抑制を引き起こす毒性兆候を惹起させないことが推定される濃度と定義した。米国国立がん研究所（NCI）小動物発がん性試験ガイドラインでは（文献 12）、小動物を用いるがん原性試験の最高投与濃度は、対照群と比較して 10%以下の体重抑制を引き起こす濃度で、かつ発がん性に関係する反応以外に、毒性的兆候、病理学的傷害による死亡率の上昇を引き起こさないと推定される最高濃度、即ち、最大耐量（Maximum Tolerated Dose (MTD)）を最高投与濃度として用いると定義した。また、体重増加の抑制に関する勧告は経験的なものであり、結果として超過した場合でもがん原性試験を無効にするものではないともいわれている（文献 13）。

本がん原性試験の投与濃度は、II-1-5 に示したように、2 週間試験（試験番号 0552）及び 13 週間試験（試験番号 0559）の結果（文献 6、7）をもとに決定した。2 週間試験では 8000 ppm 群で動物の死亡がみられたが、4000 ppm 以下の群では死亡はみられなかった。13 週間試験は 250～4000 ppm（公比 2）の濃度で行った。その結果、各群とも動物の死亡はみられず、体重にも影響はみられなかったが、4000 ppm 群では、病理組織学的検査で雌雄とも鼻腔に変化がみられ、臓器重量、血液学的検査及び血液生化学的検査にも変化がみられた。しかし、病理組織学的検査でみられた鼻腔の変化はいずれも軽度であり、その他の検査にも重篤な変化はみられなかった。これらの結果より、がん原性試験の最高濃度は、雌雄とも 4000 ppm とした。

本がん原性試験においては、最高濃度群の 4000 ppm 群で雄の最終体重は対照群の 89%、雌は同 91%であり、鼻腔の病理組織学的変化がみられた。また、雌雄とも生存率に暴露による低下はみられなかった。従って、最高濃度を 4000 ppm とした本がん原性試験の投与濃度の設定は、IARC と NCI の MTD に関する基準を満たし、適切であると判断した。

IV-3 その他の影響

血液や尿の検査では 2000 ppm 以上の群でいくつかの項目に変化がみられたのみであった。

血液学的検査では、雌雄で MCV と MCH の高値が 4000 ppm 群に、雌で網赤血球比の低値が 4000 ppm 群でみられた。

血液生化学的検査では、雄で無機リンの高値が 2000 ppm 以上の群に、雌でグルコースの高値が 2000 ppm 以上の群でみられた。

尿検査では雄でケトン体陽性例の増加が 4000 ppm 群でみられた。

しかし、病理学的検査では剖検や臓器重量に酢酸イソプロピルの影響と思われる変化はみられず、病理組織学的検査でも血液や尿の検査でみられた変化に関連すると思われる組織学的変化はみられなかった。

病理組織学的検査では鼻腔に変化がみられ、雌雄ともに嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生及び粘膜下の腺組織の呼吸上皮化生の増加がみられた。嗅上皮の萎縮は傷害を示す変化、嗅上皮の呼吸上皮化生は傷害に対する修復を示す変化であり（文献 14）、酢酸イソプロピルは主に嗅上皮に傷害を与えると考えられた。また、腺組織の呼吸上皮化生は、萎縮や呼吸上皮化生のみみられた嗅上皮の粘膜下に認められた。

本試験の予備試験として当センターで実施した 13 週間試験（文献 7）では、鼻腔の嗅上皮の萎縮が雌雄の 2000 ppm 以上の群、嗅上皮の呼吸上皮化生が雄の 4000 ppm 群と雌の 2000 ppm 以上の群で認められている。本試験では、雌雄とも嗅上皮の萎縮が最低濃度の 1000 ppm 以上の群、嗅上皮の呼吸上皮化生が 2000 ppm 以上の群でみられており、長期間投与では 13 週間試験と同様の鼻腔の変化がより低い濃度まで起きることが示された。なお、13 週間試験（文献 7）では、呼吸上皮のエオジン好性変化が雌の 2000 ppm 以上の群にみられたが、本試験ではエオジン好性変化の増加は嗅上皮、呼吸上皮とも認められなかった。

鼻腔以外の臓器には、酢酸イソプロピルの暴露による影響はみられなかった。

IV-4 無毒性量 (NOAEL) / 最小毒性量 (LOAEL)

以上のように本がん原性試験では投与群に体重増加の抑制がみられ、また、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、病理組織学的検査で酢酸イソプロピルの影響と思われる変化がみられた。

その中で、病理組織学的検査でみられた鼻腔の嗅上皮の萎縮は、雌雄とも最低濃度群の 1000

ppm 群までみられた。従って、本試験における酢酸イソプロピルのマウスに対する 2 年間吸入暴露による最小毒性量 (LOAEL) は、鼻腔への影響をエンドポイントとして 1000 ppm であると考えられた。

IV-5 他文献との比較等

- ① がん原性：酢酸イソプロピルのマウスを用いたがん原性試験または長期試験に関する文献はなかった。また、IARC では酢酸イソプロピルのがん原性について評価を行っていない。
- ② 変異原性：酢酸イソプロピルは、当センターでプレインキュベーションによる微生物を用いた変異原性試験を、ネズミチフス菌 (TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) 及び大腸菌 (WP2uvzA/pKM101) を用いて実施している (文献 15)。その結果、代謝活性化の有る場合と無い場合ともに、全 5 菌株で陰性の結果を示した。

V 結論

B6D2F1/Crlj マウスを用いて、酢酸イソプロピルの 2 年間 (104 週間) にわたる吸入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、酢酸イソプロピルのマウスに対するがん原性はなかった。

VI 文献

1. U.S. National Library of Medicine. 2009. Isopropyl acetate, Chemical/Physical Properties. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>. [accessed 3 February 2009].
2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY : John Wiley and Sons.
3. 和光純薬工業(株). 2004. 酢酸イソプロピル, 赤外吸収スペクトル.
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. 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. 2005. 酢酸イソプロピルのマウスを用いた吸入による 2 週間毒性試験報告書. 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. 日本バイオアッセイ研究センター. 2006. 酢酸イソプロピルのマウスを用いた吸入による 13 週間毒性試験報告書. 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.
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. Nagano K, Katagiri T, Aiso S, Senoh H, Sakura Y, Takeuchi T. 1997. Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice. *Exp Toxic Pathol.* 49: 97-104.
10. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S, et al. 1980. Guidelines for simple, sensitive significance tests 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.

11. Bannasch P, Griesemer RA, Anders F, Becker R, Cabral JR, Della Porta G, et al. 1986. Long-term assays for carcinogenicity in animals. In: Long-Term and Short-Term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. (Montesano R, Bartsch H, Vainio H, Wilbourn J, Yamasaki H. eds.). Lyon: IARC. IARC Scientific Publications No. 83: 13-83.
12. Sontag JM, Page NP, Saffiotti U. 1976. Guidelines for carcinogene bioassay in small rodents. NCI-CG-TR-1. DHEW Publication No.(NIH)76-801. Bethesda,MD: National Cancer Institute. 13-15.
13. Haseman JK. 1985. Issues in carcinogenicity testing: dose selection. Fundam Appl Toxicol. 5: 66-78.
14. 長野嘉介. 2000. 各論 1 章, 上部気道, 毒性病理組織学 (日本毒性病理学会編). 名古屋: 日本毒性病理学会. 99-116.
15. 中央労働災害防止協会. 2005. 「既存化学物質に係る変異原性の評価に関する調査研究 平成 16 年度 (補遺)」. 東京: 中央労働災害防止協会. 17-19.

VII 予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。

なお、被験物質の安定性の測定に使用したガスクロマトグラフ (5890A)、血液学的検査で使用した総合血液学検査装置 (ADVIA 120) 及び尿検査で使用した尿試験紙 (ウロラブスティックス) の製造会社の社名が変更されたため、本報告書はそれぞれ、新社名を記載した。