

メチルアセトアセテートのラットにおける
反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

－最終報告書－

試験実施施設：株式会社パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所

目 次

頁

要 約		1
緒 言		2
試験材料及び方法		2
試験成績		8
考 察		10
文 献		12

Fig. 1	Mean body weight changes of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	13
Fig. 2	Mean body weight changes of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	14
Fig. 3	Mean food consumption of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	15
Fig. 4	Mean food consumption of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	16

Table 1	Body weights of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	17
Table 2	Body weights of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	18
Table 3	Food consumption of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	19
Table 4	Food consumption of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	20
Table 5	Hematological findings of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	21
Table 6	Biochemical findings of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	22
Table 7	Necropsy findings of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	23
Table 8	Necropsy findings of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	24
Table 9	Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	26
Table 10	Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	27
Table 11A	Histopathological findings of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	28
Table 11B	Histopathological findings of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	29
Table 12A	Histopathological findings of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	30
Table 12B	Histopathological findings of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	32
Table 13	Reproductive performance of rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	34
Table 14	Findings of delivery of F ₀ dams treated orally with methylacetoacetate and observations on their offspring in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	35

要 約

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、メチルアセトアセテートの0(溶媒対照)、100、300及び1000mg/kg/dayをCrj:CD(SD系)ラットの雌雄(各12匹/群)に交配前14日間、雄ではその後交配期間を含む35日間、雌では交配期間、妊娠期間及び分娩後3日まで通して経口投与し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並びに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討し、以下の結果を得た。

1. 反復投与毒性

一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液化学的検査及び病理学的検査のいずれにおいても、被験物質投与の影響は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては、性周期、黄体数、交尾率、着床痕数及び授(受)胎率に被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時及び哺育期検査では、妊娠期間、出産児数、出産率、死産率、出生児数、出生率、性比、分娩時及び生後4日の出生児体重並びに生後4日の生存率に被験物質投与の影響はみられず、外表異常の発現もなかった。

以上のことから、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも1000mg/kg、生殖発生毒性に関する無影響量も親動物及び出生児とも1000mg/kgと推察された。

結 言

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、メチルアセトアセテートの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並びに次世代児の発生・発育に及ぼす影響を検討したので報告する。

試験材料及び方法

1. 被験物質

より提供されたメチルアセトアセテート(Lot No. 純度99.4%)を試験に使用した(添付資料1)。本被験物質は、水に対する溶解性が38g/100mlの無色澄明の液体であり、本試験の投与期間終了後に上記の供給源にて分析を行った結果、投与期間中安定であったことが確認された(添付資料2)。媒体は、日本薬局方注射用水(株式会社大塚製薬工場, Lot No. 6D77)を使用した。なお、被験物質は低温室の被験物質保管庫に遮光下で、媒体は被験物質室の保管庫内に室温で保管した。

2. 使用動物及び飼育条件

8週齢のCrj:CD(SD系)ラット(日本チャールス・リバー株式会社)を雌雄各55匹購入し、13日間の検疫馴化を行った。この期間中に一般状態の観察及び体重測定を実施するとともに、雌雄各3匹について剖検を行い、異常がないことを確認したのち、順調な発育を示した動物を10週齢で試験に使用した。なお、投与開始時の体重は雄で373.2～428.2g、雌で227.7～255.3gであった。

動物は温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (許容範囲 $21 \sim 27^{\circ}\text{C}$)、湿度 $55 \pm 10\%$ (許容範囲 $35 \sim 75\%$)、照明12時間(午前7時～午後7時)及び換気回数13～15回/時に設定したバリアーシステムC区域の飼育室(82番)で、ステンレススチール製ケージ(W260×H200×D380mm)に、検疫馴化期間中は2～3匹(雌雄別)、交配前投与期間中は1匹(雌雄別)、交配期間中は2匹(雌雄各1匹)、妊娠及び哺育期間中は床敷(ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社製)を入れたポリカーボネイト製ケージ(W265×H185×D425mm)に1匹ずつ(哺育期間中は哺育児を含む)収容し、飼育した。なお、温度の実測値は最高 25°C 、最低 22°C で、湿度の実測値は最高60%、最低48%であった。飼料は、固型飼料(MF、オリエンタル酵

母工業株式会社製)を、飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加した井水(約 2 ppm)を自動給水装置または給水瓶によりそれぞれ自由に摂取させた。飼料及び床敷については、財団法人 日本食品分析センターにて、飲水については俣鶴城南九科研センターにて分析し、いずれも許容基準に適合していることを確認した。なお、飼育器材及び飼料は高圧蒸気滅菌したものを使用し、ラックは4週間に1回、ステンレススチール製ケージは2週間に1回、ポリカーボネイト製ケージは週1回以上、受皿は週3回(ただし、交配期間中は毎日)交換するとともに、飼育室は毎日清掃し、消毒薬を浸したモップで清拭した。

3. 試験群構成、投与量設定の根拠及び群分け

試験群構成を下表に示した。

試験群	投与量 (mg/kg)	性別	動物数	動物番号
対照群	0	♂	12	1～12
		♀	12	51～62
低用量群	100	♂	12	13～24
		♀	12	63～74
中間用量群	300	♂	12	25～36
		♀	12	75～86
高用量群	1000	♂	12	37～48
		♀	12	87～98

投与量は、先に実施した予備試験の結果より設定した。すなわち、本被験物質の100, 300及び1000mg/kgを2週間反復経口投与した結果、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液化学的検査、剖検及び器官重量に被験物質投与による変化はみられなかった。したがって、本試験の投与量には、OECDガイドラインに従って限界用量とされる1000 mg/kgを高用量に設定し、以下公比約3で除した300及び100mg/kgをそれぞれ中間用量及び低用量に設定した。

群分けは、投与開始前日に当日の体重を基に層別連続無作為化法により行い、群分け

後の動物には動物番号を刻印した耳標を取り付けて個体識別した。また、各ケージには試験番号、動物番号、投与量及び性別を表示したラベルを付けた。なお、残余の動物は試験から除外した。

4. 投与経路、投与方法及び投与期間

投与経路は、OECD試験法ガイドラインで指定されており、また、予想されるヒトへの曝露経路の一つである経口投与とした。雄は交配前14日間及びその後交配期間を含む35日間の合計49日間、雌は交配前14日間、交配期間(最長14日間)、妊娠期間及び哺育3日までの期間、連日1日1回、胃管を用いて投与した。投与容量は10ml/kgとし、動物ごとの投与液量は、雄並びに交配前及び交配期間中の雌については最新の体重を基に、交尾成立後の雌については妊娠0日の体重を基にそれぞれ算出した。対照群には注射用水を同様に投与した。

5. 被験物質と媒体の混合物調製法

メチルアセトアセテートを注射用水に溶解し、1、3及び10W/V%溶液を調製した。調製は週1回の頻度で行い、被験液は投与時まで室温保存した。本調製法による被験液の安定性試験は当研究所にて実施し、0.1及び20W/V%水溶液は室温散光下(褐色バイアル中)で少なくとも8日間安定であることを確認した(添付資料3)。更に、調製した被験液については投与開始週に当研究所にて分析を行い、設定濃度の許容範囲内($\pm 5\%$ 以内)であることを確認した(添付資料4)。

6. 観察及び検査方法

1) 一般状態観察並びに体重及び摂餌量測定

雌雄とも、全例について一般状態の観察及び生死の確認を1日2回以上行った。

体重については、雄は投与期間を通じて週2回測定した。雌は、交配前の投与期間及び交配期間中は週2回、妊娠期間中は妊娠0、4、7、10、14、17及び21日、哺育期間中は哺育0(分娩日)及び4日に測定した。

摂餌量については、雄は交配期間を除く投与期間中、週2回測定した。雌は、交配前の投与期間は週2回、妊娠期間中は妊娠1、4、7、10、14、17及び21日、哺育期間中は哺育1及び4日に測定した。

2) 血液学的検査

雄全例について、投与期間終了後に、18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウム30mg/kgを腹腔内投与して麻酔し、開腹後、腹部大静脈から採血を行った。採取した血液の一部はEDTA-2K処理(EDTA-2K加血液)して多項目自動血球計数装置(Sysmex CC-780型、東亜医用電子株式会社)を用いて、白血球数(電気抵抗検出方式)、赤血球数(電気抵抗検出方式)、ヘモグロビン量(オキシヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(血球パルス波高値検出方式)及び血小板数(電気抵抗検出方式)を測定し、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の測定結果を基にWintrobeの赤血球恒数〔平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)及び平均赤血球血色素濃度(MCHC)]を算出した。また、血液の一部を塗抹標本とし、May-Grünwald-Giemsa染色(白血球百分比用)及びニューメチレンブルー超生体染色(網状赤血球率検査用)を施して、保管した。

3) 血液化学的検査

血液学的検査と同時に採取した雄の血液を室温で約60分間放置後、3000回転/分で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて自動分析装置(736-10型、株式会社 日立製作所)により、総蛋白質(T.protein、ビウレット法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白質及びアルブミンより算出)、総ビリルビン(T.bilirubin、アルカリアゾビリルビン法)、GOT(Karmen法)、GPT(Wróblewski-La Due法)、 γ -グルタミルトランスアミナーゼ(γ -GTP、 γ -グルタミル-DBHA基質法)、アルカリ性フォスファターゼ(ALP、p-ニトロフェニルリン酸基質法)、総コレステロール(T.cholesterol、COD-DAOS法)、トリグリセライド(GPO-DAOS法・グリセリン消去法)、リン脂質(酵素法・DAOS発色法)、グルコース(グルコキナーゼ・G-6-PDH法)、尿素窒素(BUN、ウレアーゼ-G 6PDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、無機リン(IP、モリブデン酸直接法)及びカルシウム(Ca、OCPC法)を測定した。また、電解質分析装置(PVA- α III、株式会社 アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(Na、電極法)、カリウム(K、電極法)及びクロール(Cl、電量滴定法)を測定した。

4) 剖検、器官重量の測定及び病理組織学的検査

雄では投与期間終了後の採血を行ったのちに、雌では哺育4日にエーテル麻酔下で外側腸骨動脈を切断して放血死させ、解剖して諸器官及び組織の肉眼的観察を行い、雌について黄体数及び着床痕数を調べた。剖検後、脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体及び卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに、剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。重量測定器官に加え、肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定した。なお、10%中性緩衝ホルマリン溶液による固定に先だって、精巣及び精巣上体はブアン液で前固定した。対照群及び300mg/kg群の脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体及び卵巣並びに未交尾例の卵巣については、常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し、光学顕微鏡下で観察した。また、肉眼的に脾臓の肥大がみられた100mg/kg群の1例については、骨髓性白血病が疑われたため、大腿骨(骨髓)、肝臓及び腸間膜リンパ節についても採取し、同様の検査を実施し、更に肝臓、脾臓及び大腿骨についてはエステラーゼ染色を行った。死亡例の腎臓及び肺については、PTAH染色を行った。肉眼的異常部位については、すべて病理組織学的検査を行った(ただし、胸腔及び腹腔内器官の逆位については実施しなかった)。

5) 性周期検査及び生殖能力検査

雌について、投与開始日(投与1日)から15日間、毎日午前の一定時間に膣垢を採取し、性周期検査を行った。性周期検査では、発情回数を算出するとともに、発情期から次の発情期までの間の日数を発情周期日数とし、平均発情周期を算出した。

交配は投与15日の午後4時頃から、雌雄(12週齢)1対1で一晩同居させる方法で行い、翌朝膣垢中の精子又は膣栓が確認されたものを交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。また、交配は同一群内で行い、交配期間は最長2週間とした。交配期間終了後、交尾所要日数、交尾率 $[(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100]$ 及び授(受)胎率 $[(\text{妊娠動物数} / \text{交尾動物数}) \times 100]$ を算出した。

6) 分娩及び哺育期(哺育4日まで)検査並びに新生児検査

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩徴候を含め分娩状態及び授乳、営巣などの哺育状態を観察するとともに、妊娠期間、出産率〔(生児出産雌数/妊娠雌数)×100〕を算出した。なお、分娩の確認は、午前中に限定し、12時を過ぎて分娩した個体は、翌日の分娩とした。出産児については、分娩時に出産児数、出生児数、死産児数、出生児の性別及び外表異常を検査した。出生児については、出生日及び哺育4日に体重を個体ごとに測定するとともに出生率〔(出生児数/着床痕数)×100〕及び4日生存率〔(生後4日の生児数/出生児数)×100〕を算出した。生後4日に出生児の全例をエーテル麻酔下で放血致死させ、器官・組織の肉眼的観察を行った。また、出産児(死産児及び死亡児を含む)については、剖検後一腹単位で純エタノールに固定保存した。

7. 試験途中死亡例の処置

試験途中死亡例は速やかに剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査を行った。なお、器官重量については参考データとした。

8. 統計学的処理

体重、摂餌量、血液学的検査値、血液化学的検査値、交尾所要日数、性周期検査値(発情回数、発情周期)、器官重量、妊娠期間、黄体数、着床痕数、総出産児数、出生児数及び出生児体重については、各群ごとに平均値と標準偏差を求め、対照群と被験物質投与群間でまず分散の均一性をBartlett法により検定した。分散が均一な場合は、Dunnettの多重比較検定を用いて対照群との比較を行い、分散が均一でない場合は、Steelの多重比較検定を用いて対照群との比較を行った。また交尾率、受(授)胎率、出産率及び出生児の性比については χ^2 検定により、死産率、出生率及び4日生存率についてはWilcoxonの順位和検定により、病理組織学的検査についてはMann-WhitneyのU検定により対照群と各投与群間の比較を行った。いずれの場合も有意水準を5%とした。なお、出生児に関する測定値については一腹単位で処理した。

試 験 成 績

1. 反復投与毒性

1) 一般状態

雄では、各群とも死亡の発生はなく、一般状態にも変化は認められなかった。

雌では、300mg/kg群の1例が哺育2日の投与前から活動性の低下、緩徐呼吸、体温低下及び腹臥位姿勢を呈し、哺育3日に死亡した。100及び1000mg/kg群では死亡の発生はなく、一般状態に変化は認められなかった。

2) 体重

体重推移をFig. 1, 2, Table 1, 2及びAppendix 1, 2に示した。

各群の雌雄とも、投与期間を通して対照群との間に差は認められなかった。

3) 摂餌量

摂餌量をFig. 3, 4, Table 3, 4及びAppendix 3, 4に示した。

各群の雌雄とも、投与期間を通して対照群との間に差は認められなかった。

4) 血液学的検査

雄の血液学的検査結果をTable 5及びAppendix 5に示した。

各群とも対照群との間に差は認められなかった。

5) 血液化学的検査

雄の血液化学的検査結果をTable 6及びAppendix 6に示した。

100mg/kg群で総コレステロールの減少が、300mg/kg群で γ -GTPの減少が認められた。

6) 剖検

雌雄の剖検所見をTable 7, 8及びAppendix 7, 8に示した。

投与期間終了後の雄の剖検では、100mg/kg群の1例で脾臓の肥大が認められた。そのほか100mg/kg群の1例で胸腔及び腹腔内器官の逆位が認められた。

哺育4日の雌の剖検では、各群とも異常は認められなかった。なお、哺育3日に死

亡した300mg/kg群の1例では、腎臓乳頭部の黒赤色化、膀胱の黒赤色尿、膣内の血液貯留、前胃及び腺胃部粘膜の黒赤色点が認められた。

7) 器官重量

雌雄の測定結果をTable 9, 10及びAppendix 9, 10に示した。

雄では、300mg/kg群で脾臓の絶対及び相対重量の増加が認められた。

雌では、各群とも変化は認められなかった。

8) 病理組織学的検査

雄の検査結果をTable 11A(グレード別出現例数)及び11B(総出現例数)並びにAppendix 11, 雌の検査結果をTable 12A(グレード別出現例数)及び12B(総出現例数)並びにAppendix 12に示した。

雄では、1000mg/kg群で左心室心内膜下のリンパ球浸潤が1例認められた。また、肉眼的に脾臓の肥大がみられた100mg/kg群の1例では、組織学的に以下のような所見が認められたことから、骨髄性白血病と判断された。すなわち、本例では大腿骨骨髄が細胞質に乏しく、比較的明るい円形～楕円形の核をもつ腫瘍細胞で占められ、同様の腫瘍細胞が肝臓の門脈周囲にみられ、小葉類洞内にもびまん性に増殖していた。更に、脾臓では、全領域に腫瘍細胞が浸潤増殖し、脾臓の正常構造を置換していた。腸間膜リンパ節に腫瘍性の変化は認められなかった。

雌では、各群ともいずれの器官にも変化は認められなかった。

なお、死亡した300mg/kg群の1例では、肝臓の巣状壊死、肺の血栓、腎臓の近位尿細管上皮細胞の壊死及び尿細管への出血がみられ、前胃部の潰瘍、腺胃部のびらん、胸腺の萎縮、副腎の球状帯及び束状帯の肥大も認められた。更に、肺の血栓についてはPTAH染色を行った結果、陽性を示した。

2. 生殖発生毒性

1) 性周期検査及び生殖能力検査

性周期検査及び生殖能力検査の成績をTable 13及びAppendix 13に示した。

性周期検査では、各群とも発情回数及び発情周期に対照群との間の差は認められなかった。

生殖能力検査では、100mg/kg群の1組を除いて、すべてに交尾がみられ、いずれも受胎能が確認された。したがって、対照群、100、300及び1000mg/kg群で交尾率はそれぞれ100、91.67、100及び100%、受胎率はいずれも100%を示し、対照群と各群間に差は認められなかった。また、交尾所要日数においても、対照群と各群間の差は認められなかった。なお、未交尾例の剖検及び卵巣の病理組織学的検査において異常は認められなかった。

2) 分娩及び哺育期(哺育4日まで)検査並びに新生児検査

分娩及び哺育期検査の成績をTable 14及びAppendix 14に示した。

分娩時の検査では、100mg/kg群で雌の出生児数が多く性比に偏りがみられ、300mg/kg群で着床痕数、総出産児数及び出生児数の増加が認められた。しかし、各群とも妊娠期間、黄体数、出産率、出生率、出生児体重及び死産率に対照群との間の差はみられず、出生児の外表検査においても各群とも異常は認められなかった。

哺育期の検査では、各群とも出生児の生後4日の生存率及び体重に対照群との間の差は認められなかった。

考 察

OECD既存化学物質安全点検に係わる毒性調査の一環として、メチルアセトアセテートの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並びに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

1. 反復投与毒性試験

300mg/kg群の雌1例が哺育2日の投与前から活動性の低下、緩徐呼吸、体温低下及び腹臥位姿勢を呈し、哺育3日に死亡した。本例では症状が発現した哺育2日から哺育行動がみられず、病理組織学的検査において、前胃部の潰瘍、腺胃部のびらん、胸腺の萎縮、副腎の球状帯及び束状帯の肥大などストレス性の変化が認められたことから、産褥により死亡したものと考えられた。更に、本例では肝臓の巣状壊死、肺の血栓、腎臓の近位尿細管上皮細胞の壊死及び尿細管への出血も認められたが、これらの変化は、産褥性疾患による死亡動物において時折みられる²⁾ことから、産褥に関連したものと考えら

れた。雄の血液化学的検査では、100mg/kg群で総コレステロールの減少及び300mg/kg群で γ -GTPの減少がみられたが、いずれも1000mg/kg群では同様の変化はみられず、被験物質投与との関連はないものと考えられた。病理学的検査では、100mg/kg群の雄1例で脾臓の肥大がみられ、組織学的検査結果から、骨髓性白血病と診断されたが、同様の変化は300mg/kg以上の群ではみられず、稀ではあるが同系統同週齢のラットで自然発生病変として報告¹⁾されていることから、被験物質投与との関連はないものと考えられた。また、1000mg/kg群の1例で左心室心内膜下のリンパ球浸潤がみられたが、発現頻度が極めて低く、この変化についてもラットで自然発生病変としての報告³⁾があることから、被験物質投与との関連はないものと考えられた。そのほか、300mg/kg群の雄で脾臓の絶対及び相対重量の増加がみられたが、雌及び1000mg/kg群の雄に同様の変化はみられていないことから、偶発的なものと考えられた。

以上のことから、本試験条件下における反復投与毒性試験に関する無影響量は雌雄とも1000mg/kgと推察された。

2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては、各群とも発情回数、発情周期、黄体数、交尾率、着床痕数及び受胎率に被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時の観察では、100mg/kg群で雌の出生児が多く性比に偏りがみられ、300mg/kg群で着床痕数、総出産児数及び出生児数の増加が認められたが、いずれも1000mg/kg群では同様の変化はみられなかったことから、被験物質投与との関連はないものと考えられた。各群とも妊娠期間、出産率、出生率、出生児体重及び死産率に被験物質投与の影響はみられず、外表異常の発現もなかった。

哺育期の観察では、各群とも出生児の生後4日の生存率及び体重に被験物質投与の影響は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下における生殖発生毒性に関する無影響量は親動物及び出生児ともに1000mg/kgと推察された。

文 献

- 1) C.B. Richter, *Laboratory Investigation*, 26, 419(1972).
- 2) 奈良間 功, “毒性試験講座 5. 毒性病理学”, 前川 昭彦, 林 裕造編, 地人書館, 東京, 1992, p.66.
- 3) 奈良間 功, “毒性試験講座 5. 毒性病理学”, 前川 昭彦, 林 裕造編, 地人書館, 東京, 1992, p.59.

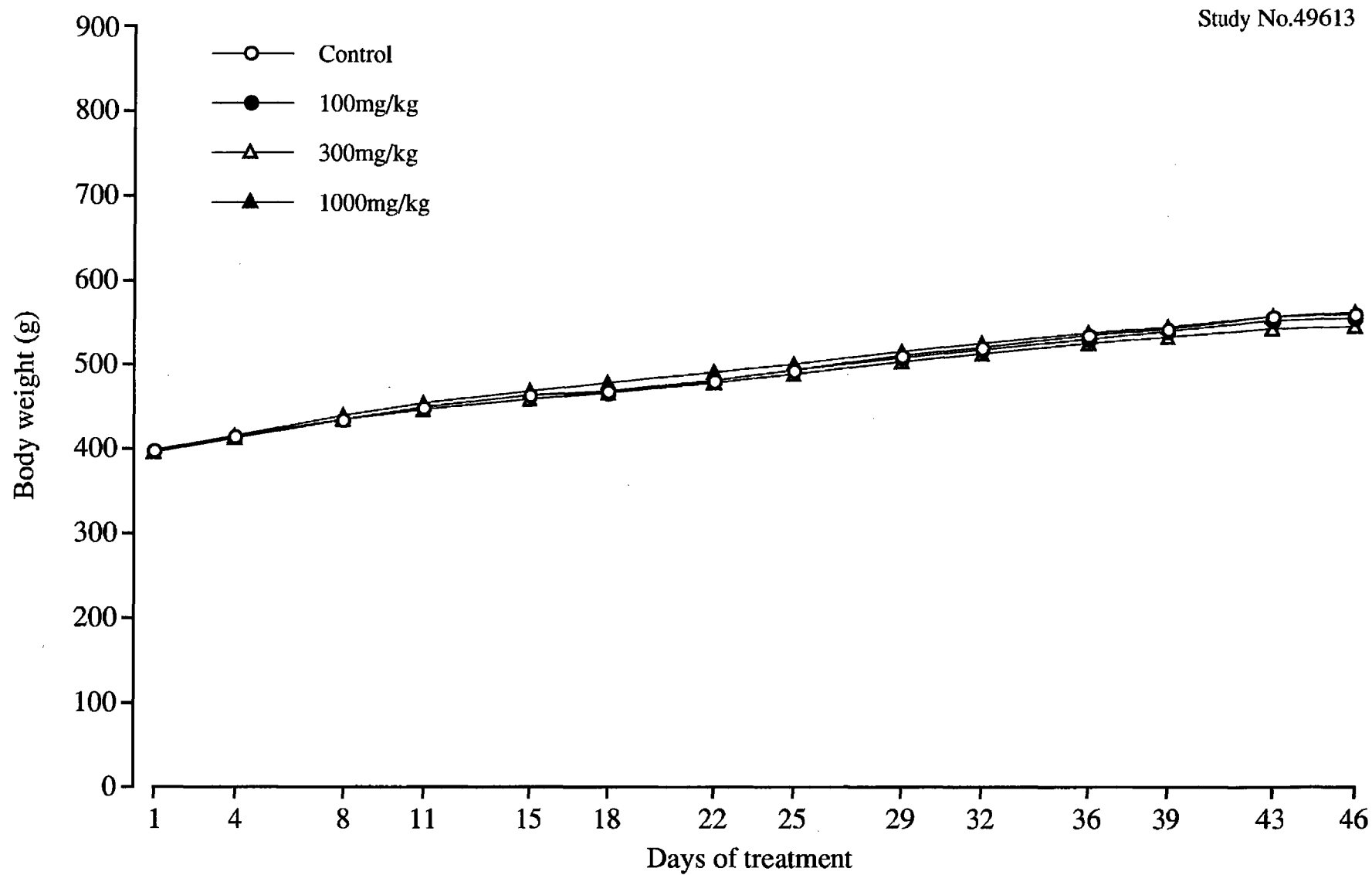


Fig. 1 Mean body weight changes of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

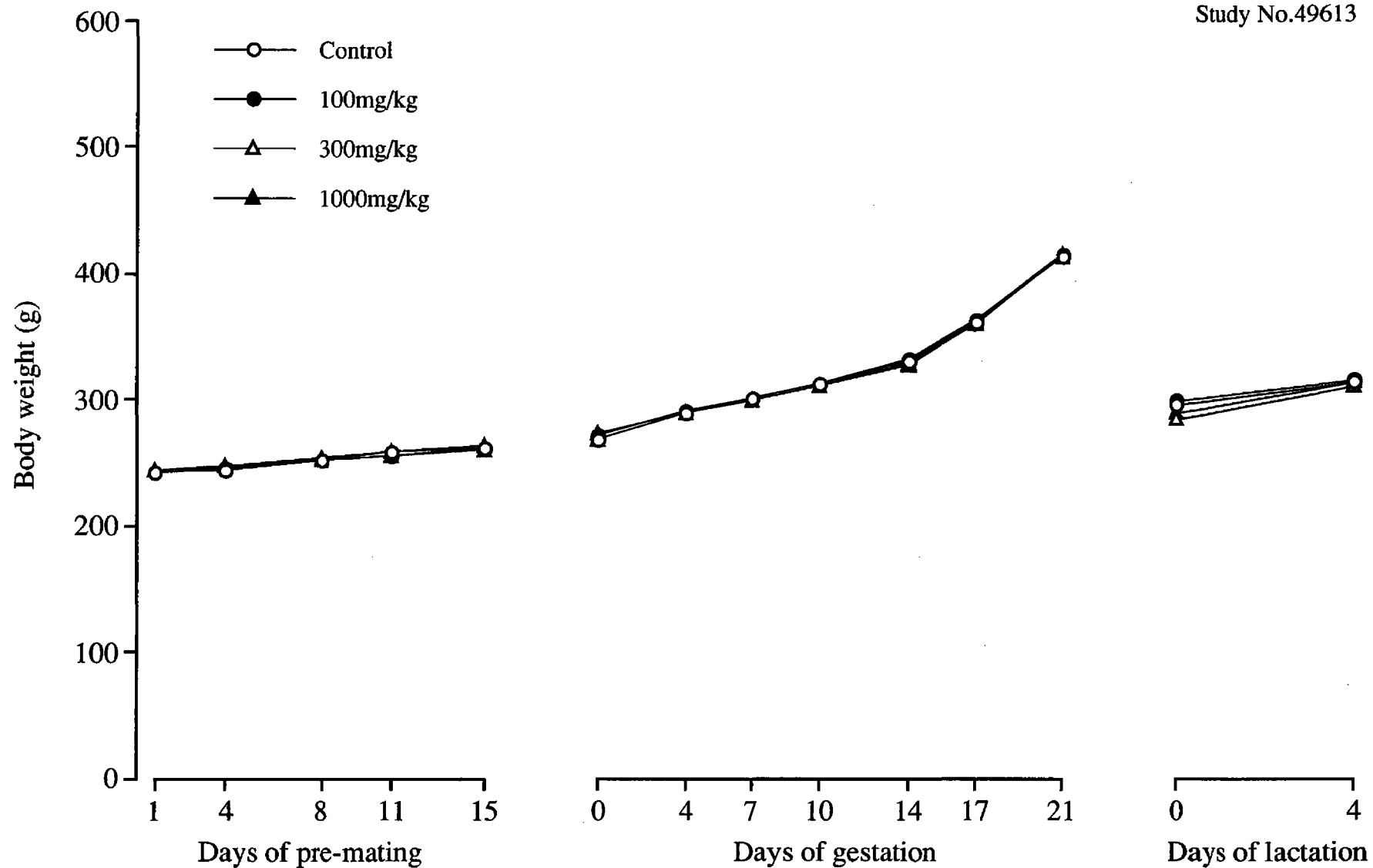


Fig. 2 Mean body weight changes of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

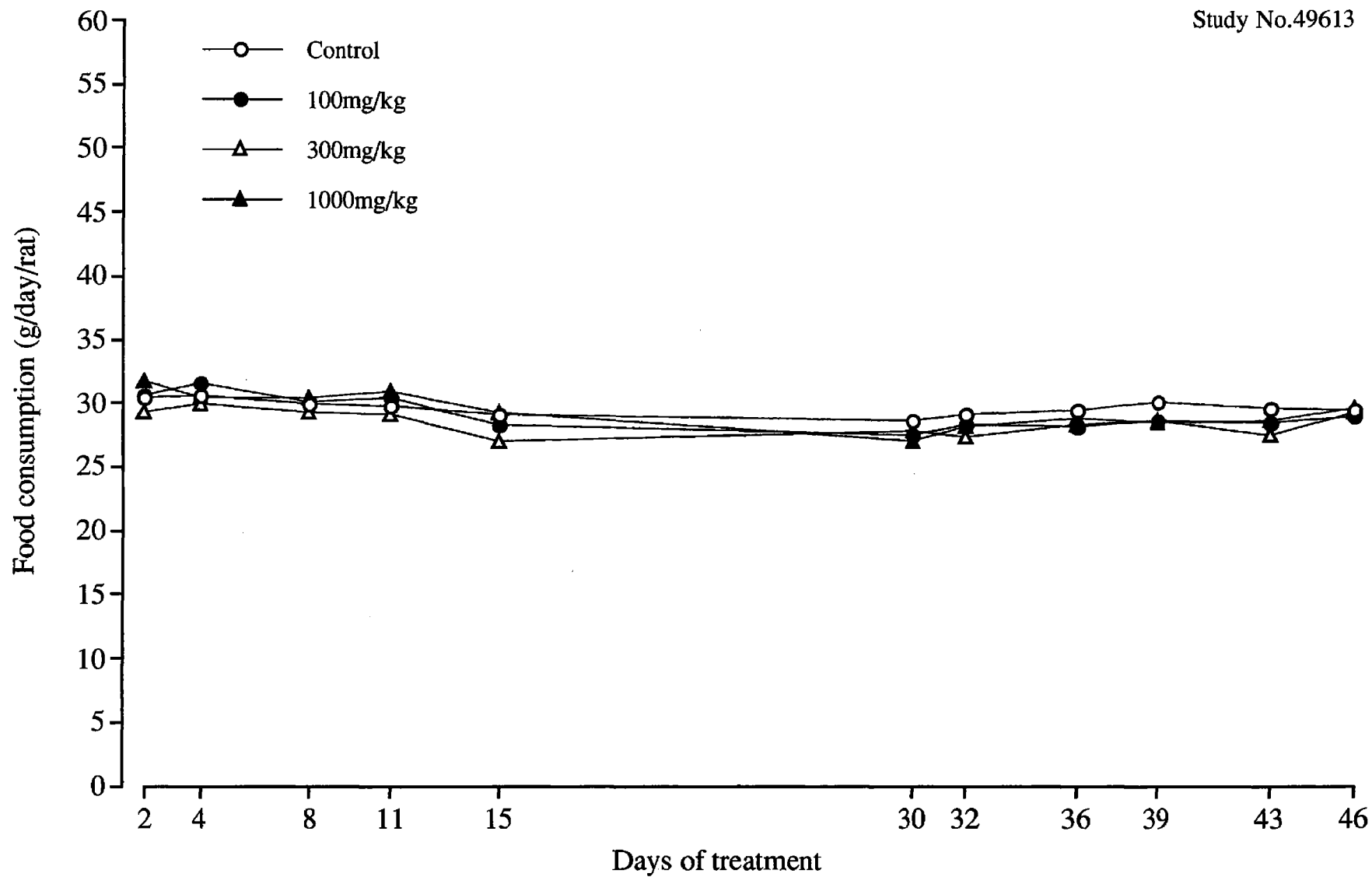


Fig. 3 Mean food consumption of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

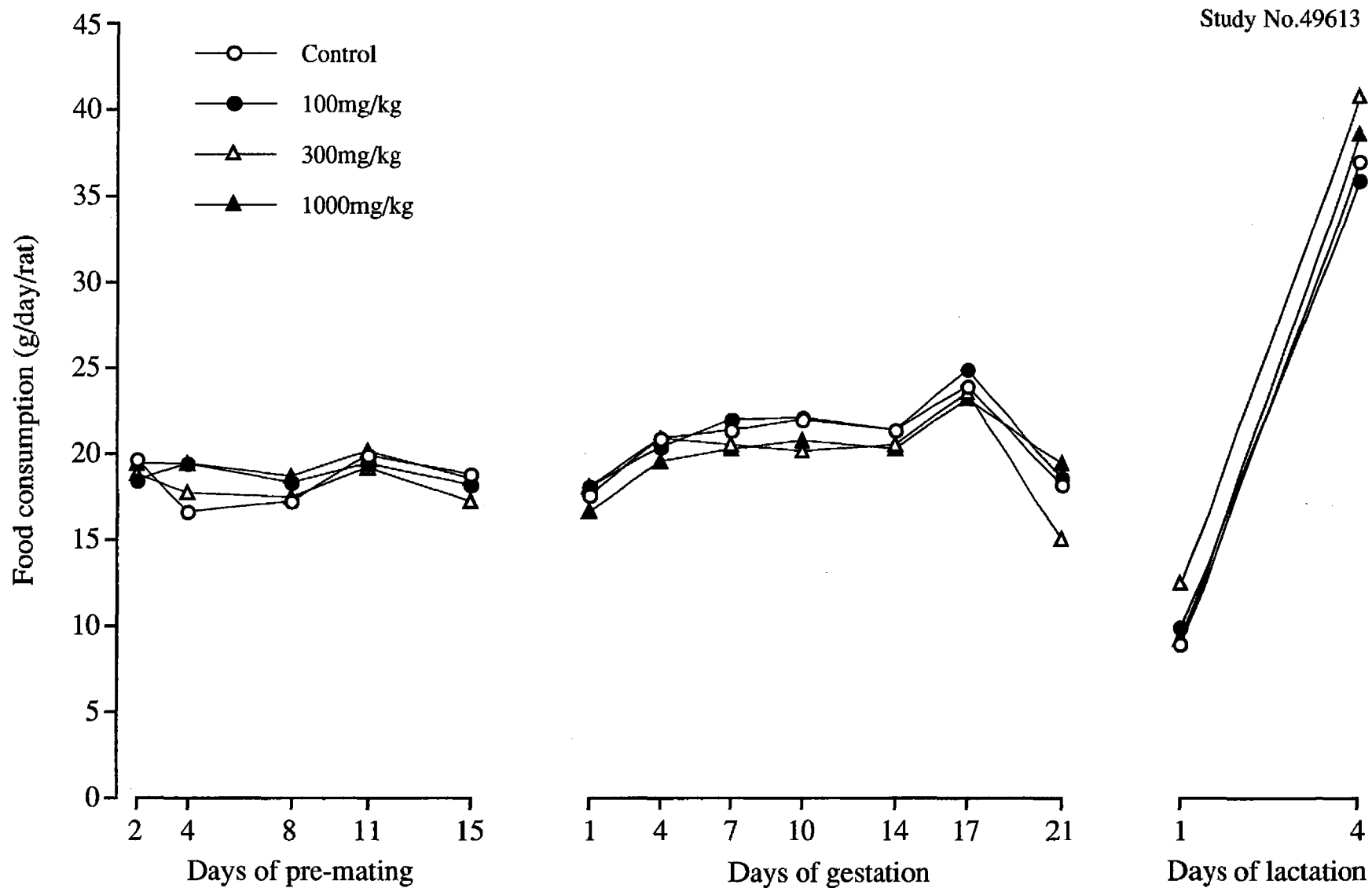


Fig. 4 Mean food consumption of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

Table 1 Body weights of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
Body weight(g)				
Days of treatment				
1	397.8±15.0(12)	396.4±13.3(12)	394.3±13.6(12)	395.6±13.8(12)
4	414.0±17.0(12)	413.2±15.9(12)	411.9±15.5(12)	415.1±16.8(12)
8	434.7±19.0(12)	434.6±18.4(12)	433.0±20.1(12)	439.2±20.9(12)
11	448.3±20.5(12)	447.9±19.6(12)	444.6±24.1(12)	453.6±23.3(12)
15	462.0±23.0(12)	462.6±21.1(12)	457.1±27.6(12)	468.4±25.1(12)
18	466.6±21.7(12)	465.7±18.9(12)	465.2±27.1(12)	477.5±26.6(12)
22	480.9±23.5(12)	480.6±21.2(12)	477.6±28.9(12)	490.5±30.8(12)
25	493.0±26.5(12)	492.2±24.0(12)	488.1±28.9(12)	500.5±30.7(12)
29	509.5±29.4(12)	506.9±25.3(12)	501.1±29.6(12)	513.7±33.2(12)
32	519.2±29.8(12)	516.2±26.6(12)	510.6±28.9(12)	522.7±34.7(12)
36	534.0±30.5(12)	529.6±25.7(12)	523.2±30.0(12)	536.4±35.8(12)
39	541.5±33.3(12)	538.2±29.5(12)	530.0±30.6(12)	542.4±35.6(12)
43	555.2±35.2(12)	550.5±29.8(12)	541.9±30.2(12)	556.8±39.3(12)
46	557.5±36.3(12)	553.7±28.4(12)	543.0±29.4(12)	560.6±39.7(12)

Not significantly different from control.

Values are mean ±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

Table 2 Body weights of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
Body weight(g)				
Days of pre-mating				
1	242.2±7.0 (12)	242.3±6.4 (12)	243.3±7.1 (12)	243.6±8.4 (12)
4	243.7±8.8 (12)	245.3±7.2 (12)	246.0±10.3(12)	246.7±9.8 (12)
8	251.6±10.2(12)	251.4±7.0 (12)	250.9±10.4(12)	254.0±9.0 (12)
11	257.5±11.2(12)	255.1±6.9 (12)	255.5±9.9 (12)	258.5±8.9 (12)
15	260.7±11.2(12)	261.1±6.4 (12)	259.1±9.2 (12)	262.4±10.7(12)
Days of gestation				
0	268.5±11.5(12)	270.3±8.9 (11)	268.6±9.9 (12)	273.1±12.3(12)
4	288.7±10.1(12)	290.0±9.0 (11)	288.7±11.6(12)	289.0±12.2(12)
7	299.6±10.1(12)	300.9±11.1(11)	299.3±12.1(12)	298.5±13.7(12)
10	312.5±12.5(12)	311.8±12.8(11)	309.9±15.1(12)	309.9±14.2(12)
14	330.2±13.3(12)	331.7±12.2(11)	328.2±12.6(12)	325.8±16.4(12)
17	361.4±17.2(12)	362.3±12.8(11)	361.4±15.6(12)	358.9±18.2(12)
21	412.1±18.5(12)	414.0±14.6(11)	413.1±16.6(12)	413.6±21.8(12)
Days of lactation				
0	295.3±19.9(12)	298.0±20.7(11)	283.6±18.1(12)	288.8±16.5(12)
4	312.8±14.2(12)	315.4±10.3(11)	310.6±10.0(11)	312.9±13.5(12)

Not significantly different from control.

Values are mean ±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal of 300mg/kg group died on day 3 of lactation.

Table 3 Food consumption of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
Food consumption(g/day/rat)				
Days of treatment				
2	30.3±2.8(12)	30.5±3.4(12)	29.2±2.4(12)	31.7±1.9(12)
4	30.6±2.3(12)	31.5±3.3(12)	29.8±2.6(12)	30.3±2.0(12)
8	29.8±1.7(12)	30.1±2.8(12)	29.3±2.7(12)	30.4±2.8(12)
11	29.7±2.0(12)	30.4±3.2(12)	29.0±2.7(12)	30.9±2.6(12)
15	29.0±2.5(12)	28.2±3.0(12)	27.0±3.7(12)	29.3±2.4(12)
30	28.6±2.7(12)	27.4±2.9(12)	27.8±2.6(12)	27.0±2.4(12)
32	29.1±1.8(12)	28.3±3.0(12)	27.2±1.8(12)	28.1±3.2(12)
36	29.4±2.8(12)	28.1±2.6(12)	28.2±2.5(12)	28.8±2.9(12)
39	30.0±2.8(12)	28.5±3.0(12)	28.5±3.2(12)	28.4±3.3(12)
43	29.6±2.5(12)	28.4±2.9(12)	27.5±2.1(12)	28.5±3.6(12)
46	29.4±2.8(12)	28.9±2.4(12)	29.2±3.8(12)	29.5±3.0(12)

Not significantly different from control.

Values are mean ±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

Table 4 Food consumption of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
Food consumption(g/day/rat)				
Days of pre-mating				
2	19.6±2.7(12)	18.4±3.2(12)	18.7±3.6(12)	19.3±2.6(12)
4	16.5±2.8(12)	19.3±2.0(12)	17.6±4.1(12)	19.4±3.4(12)
8	17.2±3.2(12)	18.3±2.2(12)	17.4±3.6(12)	18.6±1.9(12)
11	19.9±2.2(12)	19.4±2.0(12)	19.1±3.2(12)	20.1±2.5(12)
15	18.7±2.2(12)	18.1±2.6(12)	17.2±2.5(12)	18.5±2.9(12)
Days of gestation				
1	17.5±2.4(12)	18.0±2.7(11)	18.0±2.7(12)	16.6±2.3(12)
4	20.8±2.0(12)	20.3±2.7(11)	20.8±3.0(12)	19.5±2.4(12)
7	21.3±1.8(12)	21.9±2.5(11)	20.4±2.5(12)	20.2±2.4(12)
10	21.9±2.5(12)	22.0±3.3(11)	20.1±2.5(12)	20.7±2.4(12)
14	21.3±1.8(12)	21.3±2.3(11)	20.5±2.0(12)	20.2±2.2(12)
17	23.9±2.8(12)	24.8±3.1(11)	23.5±2.2(12)	23.1±2.8(12)
21	18.1±3.7(12)	18.5±5.8(11)	14.9±5.2(12)	19.3±6.6(12)
Days of lactation				
1	8.8±5.9(12)	9.8±7.0(11)	12.4±6.9(12)	9.1±5.0(12)
4	37.0±5.0(12)	35.8±5.0(11)	40.7±3.2(11)	38.5±5.3(12)

Not significantly different from control.

Values are mean ±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal of 300mg/kg group died on day 3 of lactation.

Table 5 Hematological findings of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Leucocyte ($10^2/\mu\text{l}$)	82 ± 26	84 ± 27	82 ± 23	89 ± 23
Erythrocyte ($10^4/\mu\text{l}$)	862 ± 47	873 ± 52	863 ± 52	873 ± 50
Hemoglobin (g/dl)	15.3 ± 0.6	15.4 ± 0.8	15.4 ± 0.4	15.5 ± 0.5
Hematocrit (%)	47.8 ± 2.3	48.3 ± 2.7	47.9 ± 2.0	48.5 ± 2.1
Platelet ($10^4/\mu\text{l}$)	95.4 ± 10.1	92.5 ± 18.8	100.7 ± 5.9	94.7 ± 8.7
MCV (fl)	55 ± 2	56 ± 2	56 ± 2	56 ± 2
MCH (pg)	17.7 ± 0.7	17.6 ± 0.6	17.8 ± 0.7	17.8 ± 0.8
MCHC (%)	32.0 ± 0.7	31.8 ± 0.6	32.1 ± 0.6	31.9 ± 0.7

Not significantly different from control.

Values are mean $\pm$ S.D.

Table 6 Biochemical findings of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
T.protein (g/dl)	5.6±0.2	5.7±0.2	5.6±0.3	5.7±0.3
Albumin (g/dl)	3.7±0.2	3.8±0.1	3.7±0.2	3.8±0.2
A/G ratio	1.99±0.12	2.05±0.20	2.00±0.15	1.98±0.18
GOT (IU/l)	108±12	125±29	110±18	130±39
GPT (IU/l)	24±4	29±14	23±4	48±65
γ-GTP (IU/l)	0.1±0.1	0.1±0.4	0.0±0.0**	0.1±0.1
ALP (IU/l)	167±33	183±35	140±23	165±77
T.cholesterol (mg/dl)	69±9	61±5*	65±15	72±17
Triglycerides (mg/dl)	71±33	65±18	61±22	91±35
Phospholipids (mg/dl)	120±14	111±8	113±19	124±23
T.bilirubin (mg/dl)	0.0±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Glucose (mg/dl)	118±15	122±15	115±14	125±17
BUN (mg/dl)	18.0±2.6	18.3±1.4	18.0±2.2	18.6±1.9
Creatinine (mg/dl)	0.5±0.0	0.5±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1
IP (mg/dl)	6.3±0.6	6.8±1.1	6.4±0.4	6.6±1.0
Ca (mg/dl)	9.7±0.3	9.7±0.3	9.7±0.2	9.8±0.3
Na (mEq/l)	147.2±1.7	147.1±1.1	147.5±1.0	147.3±0.7
K (mEq/l)	4.32±0.23	4.75±1.30	4.39±0.16	4.32±0.19
Cl (mEq/l)	105.9±1.6	105.9±1.3	106.4±1.3	106.2±0.9

* : P<0.05, ** : P<0.01(significantly different from control).

Values are mean ±S.D.

Table 7 Necropsy findings of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
		<u>Terminal sacrifice</u> 12	<u>Terminal sacrifice</u> 12	<u>Terminal sacrifice</u> 12	<u>Terminal sacrifice</u> 12
Hematopoietic system					
Spleen					
Enlargement		0	1	0	0
Others					
Thoracic cavity					
Inversion		0	1	0	0
Abdominal cavity					
Inversion		0	1	0	0

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 8 Necropsy findings of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control	100mg/kg	300mg/kg	
		<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Imminent sacrifice/Dead</u>
		12	12	11	1
Digestive system					
Stomach					
Spot, blackish red, mucosa, forestomach		0	0	0	1
Spot, blackish red, mucosa, glandular stomach		0	0	0	1
Urinary system					
Kidney					
Coloration, blackish red, papilla		0	0	0	1
Urinary bladder					
Retention, urine, blackish red		0	0	0	1
Genital system					
Vagina					
Retention, blood		0	0	0	1

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 8 - continued Necropsy findings of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose
and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	1000mg/kg
		Terminal sacrifice 12
Digestive system		
Stomach		
Spot, blackish red, mucosa, forestomach		0
Spot, blackish red, mucosa, glandular stomach		0
Urinary system		
Kidney		
Coloration, blackish red, papilla		0
Urinary bladder		
Retention, urine, blackish red		0
Genital system		
Vagina		
Retention, blood		0

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 9 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Absolute organ weight				
Final Body Weight (g)	530.9±38.2	526.6±29.8	514.8±26.5	534.8±38.0
Brain (g)	2.26±0.07	2.29±0.05	2.31±0.07	2.25±0.08
Heart (g)	1.50±0.14	1.55±0.11	1.49±0.09	1.54±0.09
Lungs (g)	1.52±0.11	1.49±0.10	1.48±0.08	1.46±0.11
Thymus (g)	0.29±0.08	0.30±0.09	0.30±0.07	0.30±0.09
Liver (g)	14.18±1.31	14.16±1.98	13.30±0.94	14.16±1.17
Spleen (g)	0.81±0.08	1.27±1.63	0.90±0.07*	0.84±0.09
Kidneys (g)	3.19±0.28	3.13±0.44	3.15±0.25	3.05±0.23
Adrenals (mg)	60.6±6.0	59.0±6.5	61.7±8.0	60.4±6.9
Testes (g)	3.41±0.24	3.39±0.22	3.47±0.25	3.48±0.22
Epididymides (g)	1.30±0.09	1.32±0.06	1.35±0.09	1.35±0.15
Relative organ weight				
Brain (g/100g B.W.)	0.43±0.03	0.44±0.03	0.45±0.03	0.42±0.03
Heart (g/100g B.W.)	0.28±0.02	0.30±0.02	0.29±0.02	0.29±0.01
Lungs (g/100g B.W.)	0.28±0.02	0.28±0.02	0.29±0.02	0.27±0.02
Thymus (g/100g B.W.)	0.06±0.01	0.06±0.02	0.06±0.02	0.06±0.02
Liver (g/100g B.W.)	2.67±0.14	2.68±0.26	2.58±0.11	2.65±0.17
Spleen (g/100g B.W.)	0.15±0.02	0.25±0.33	0.17±0.01*	0.16±0.02
Kidneys (g/100g B.W.)	0.60±0.04	0.59±0.06	0.61±0.04	0.57±0.06
Adrenals (mg/100g B.W.)	11.5±1.1	11.3±1.4	12.0±1.6	11.3±1.0
Testes (g/100g B.W.)	0.64±0.06	0.65±0.05	0.67±0.04	0.65±0.06
Epididymides (g/100g B.W.)	0.25±0.02	0.25±0.02	0.26±0.02	0.25±0.03

*: P<0.05(significantly different from control).

Values are mean ±S.D.

Table 10 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
No. of animals	12	11	11	12
Absolute organ weight				
Final Body Weight (g)	312.8±14.2	315.4±10.3	310.6±10.0	312.9±13.5
Brain (g)	2.12±0.08	2.16±0.08	2.11±0.08	2.08±0.10
Heart (g)	0.99±0.07	1.00±0.10	0.98±0.11	0.98±0.08
Lungs (g)	1.08±0.10	1.08±0.07	1.11±0.10	1.07±0.04
Thymus (g)	0.16±0.05	0.13±0.04	0.14±0.03	0.15±0.06
Liver (g)	12.70±1.24	12.38±1.20	12.67±1.52	12.76±1.13
Spleen (g)	0.62±0.08	0.58±0.06	0.66±0.08	0.58±0.05
Kidneys (g)	1.91±0.14	1.96±0.10	1.90±0.15	1.99±0.28
Adrenals (mg)	74.6±7.2	69.1±6.0	72.6±3.9	71.6±7.0
Ovaries (mg)	108.1±11.5	99.5±13.0	96.7±12.5	99.3±16.3
Relative organ weight				
Brain (g/100g B.W.)	0.68±0.05	0.68±0.04	0.68±0.02	0.67±0.04
Heart (g/100g B.W.)	0.32±0.02	0.32±0.03	0.32±0.04	0.31±0.02
Lungs (g/100g B.W.)	0.35±0.03	0.34±0.02	0.36±0.03	0.34±0.02
Thymus (g/100g B.W.)	0.05±0.02	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0.02
Liver (g/100g B.W.)	4.06±0.38	3.93±0.35	4.08±0.46	4.08±0.33
Spleen (g/100g B.W.)	0.20±0.02	0.19±0.02	0.21±0.03	0.19±0.01
Kidneys (g/100g B.W.)	0.61±0.06	0.62±0.04	0.61±0.06	0.64±0.10
Adrenals (mg/100g B.W.)	23.9±2.1	21.9±1.8	23.4±1.3	22.9±2.6
Ovaries (mg/100g B.W.)	34.6±3.9	31.6±4.3	31.2±4.2	31.7±5.1

Not significantly different from control.

Values are mean ±S.D.

Table 11A Histopathological findings of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control				100mg/kg				300mg/kg				1000mg/kg			
		Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice			
		12				12				12				12			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Circulatory system																	
Heart					(12)				(0)				(0)				(12)
Cellular infiltration, lymphocyte, focal		12	0	0	0									11	1	0	0
Others																	
Multiple organs					(0)				(1)				(0)				(0)
Leukemia, myeloid						0	1	0	0								

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, lung, thymus, spleen, kidney, testis, epididymis, adrenal and brain of all animals in control and 1000mg/kg groups, and mesenteric lymph node of one animal in 100mg/kg group.

Table 11B Histopathological findings of male rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
	Number of animals	<u>Terminal sacrifice</u> 12	<u>Terminal sacrifice</u> 12	<u>Terminal sacrifice</u> 12	<u>Terminal sacrifice</u> 12
Circulatory system					
Heart		(12)	(0)	(0)	(12)
Cellular infiltration, lymphocyte, focal		0			1
Others					
Multiple organs		(0)	(1)	(0)	(0)
Leukemia, myeloid			1		

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, lung, thymus, spleen, kidney, testis, epididymis, adrenal and brain of all animals in control and 1000mg/kg groups, and mesenteric lymph node of one animal in 100mg/kg group.

Table 12A Histopathological findings of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings		Group and dose		Number of animals		Control				100mg/kg				300mg/kg											
						Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Imminent sacrifice/Dead				Total			
						12				12				11				1				12			
-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++						
Digestive system																									
Liver																									
(12)																									
(0)																									
(0)																									
Necrosis, focal																									
12 0 0 0																									
(0)																									
(0)																									
Stomach																									
(0)																									
(0)																									
Ulcer, forestomach																									
0 1 0 0																									
0 1 0 0																									
Erosion, glandular stomach																									
0 1 0 0																									
0 1 0 0																									
0 1 0 0																									
Respiratory system																									
Lung																									
(12)																									
(0)																									
(0)																									
(1)																									
(1)																									
Thrombus																									
12 0 0 0																									
0 1 0 0																									
0 1 0 0																									
Hematopoietic system																									
Thymus																									
(12)																									
(0)																									
(0)																									
(1)																									
(1)																									
Atrophy																									
12 0 0 0																									
0 1 0 0																									
0 1 0 0																									
Urinary system																									
Kidney																									
(12)																									
(0)																									
(0)																									
(1)																									
(1)																									
Necrosis, tubular epithelium, proximal																									
12 0 0 0																									
0 1 0 0																									
0 1 0 0																									
Hemorrhage, renal tubule																									
12 0 0 0																									
0 0 1 0																									
0 0 1 0																									
Endocrine system																									
Adrenal																									
(12)																									
(0)																									
(0)																									
(1)																									
(1)																									
Hypertrophy, zona glomerulosa and zona fasciculata																									
12 0 0 0																									
0 1 0 0																									
0 1 0 0																									

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the spleen, heart, ovary and brain of all animals in control group and one animal in 300mg/kg group, ovary of one animal in 100mg/kg group and urinary bladder of one animal in 300mg/kg group.

Table 12A - continued Histopathological findings of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	1000mg/kg			
		Terminal sacrifice			
		-	12 +	++	+++
Digestive system					
Liver			(12)		
Necrosis, focal		12	0	0	0
Stomach			(0)		
Ulcer, forestomach					
Erosion, glandular stomach					
Respiratory system					
Lung			(12)		
Thrombus		12	0	0	0
Hematopoietic system					
Thymus			(12)		
Atrophy		12	0	0	0
Urinary system					
Kidney			(12)		
Necrosis, tubular epithelium, proximal		12	0	0	0
Hemorrhage, renal tubule		12	0	0	0
Endocrine system					
Adrenal			(12)		
Hypertrophy, zona glomerulosa and zona fasciculata		12	0	0	0

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the spleen, heart, ovary and brain of all animals in 1000mg/kg group.

Table 12B Histopathological findings of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control	100mg/kg	300mg/kg		Total
		Terminal sacrifice	Terminal sacrifice	Terminal sacrifice	Imminent sacrifice/Dead	
		12	12	11	1	12
Digestive system						
Liver		(12)	(0)	(0)	(1)	(1)
Necrosis, focal		0			1	1
Stomach		(0)	(0)	(0)	(1)	(1)
Ulcer, forestomach					1	1
Erosion, glandular stomach					1	1
Respiratory system						
Lung		(12)	(0)	(0)	(1)	(1)
Thrombus		0			1	1
Hematopoietic system						
Thymus		(12)	(0)	(0)	(1)	(1)
Atrophy		0			1	1
Urinary system						
Kidney		(12)	(0)	(0)	(1)	(1)
Necrosis, tubular epithelium, proximal		0			1	1
Hemorrhage, renal tubule		0			1	1
Endocrine system						
Adrenal		(12)	(0)	(0)	(1)	(1)
Hypertrophy, zona glomerulosa and zona fasciculata		0			1	1

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the spleen, heart, ovary and brain of all animals in control group and one animal in 300mg/kg group, ovary of one animal in 100mg/kg group and urinary bladder of one animal in 300mg/kg group.

Table 12B - continued Histopathological findings of female rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose	1000mg/kg
		<u>Terminal sacrifice</u>
	Number of animals	12
Digestive system		
Liver		(12)
Necrosis, focal		0
Stomach		(0)
Ulcer, forestomach		
Erosion, glandular stomach		
Respiratory system		
Lung		(12)
Thrombus		0
Hematopoietic system		
Thymus		(12)
Atrophy		0
Urinary system		
Kidney		(12)
Necrosis, tubular epithelium, proximal		0
Hemorrhage, renal tubule		0
Endocrine system		
Adrenal		(12)
Hypertrophy, zona glomerulosa and zona fasciculata		0

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the spleen, heart, ovary and brain of all animals in 1000mg/kg group.

Table 13 Reproductive performance of rats treated orally with methylacetoacetate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
No. of females examined	12	12	12	12
Count of estrus ^{a)}	3.42±0.51	3.83±0.39	3.50±0.52	3.75±0.45
Estrous cycle ^{b)}	3.97±0.10	4.00±0.00	4.13±0.31	4.04±0.14
No. of mated				
Male	12	12	12	12
Female	12	12	12	12
No. of copulated ^{c)}				
Male	12(100)	11(91.67)	12(100)	12(100)
Female	12(100)	11(91.67)	12(100)	12(100)
No. of impregnated ^{d)}	12(100)	11(100)	12(100)	12(100)
No. of pregnant ^{d)}	12(100)	11(100)	12(100)	12(100)
Duration of mating ^{b)}	2.08±1.16	2.91±1.45	2.25±1.29	3.17±1.59

Not significantly different from control.

a) Values are mean ±S.D.

b) Values are mean ±S.D.(day).

c) Values in parentheses represent percentages to the number of mated.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of copulated.

Table 14 Findings of delivery of F₀ dams treated orally with methylacetoacetate and observations on their offspring in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
No. of dams	12	11	12	12
Gestational days ^{a)}	22.42±0.51	22.36±0.50	22.42±0.51	22.33±0.49
No. of corpora lutea ^{b)}	204(17.00±0.85)	192(17.45±1.21)	214(17.83±1.11)	212(17.67±1.78)
No. of implantations ^{b)}	185(15.42±1.73)	180(16.36±1.21)	209(17.42±1.16)*	199(16.58±3.15)
No. of litter ^{b)}	173(14.42±1.31)	161(14.64±2.11)	194(16.17±1.27)*	185(15.42±2.91)
Gestation index ^{c)}	100	100	100	100
No. of stillborns ^{d)}				
Male	1	1	1	1
Female	1	1	2	2
Total	2(1.16)	2(1.24)	3(1.55)	3(1.62)
No. of live newborns ^{b)}	171(14.25±1.22)	159(14.45±2.07)	191(15.92±1.31)*	182(15.17±2.98)
Birth index ^{e)}	92.43	88.33	91.39	91.46
Sex ratio of live newborns ^{f)}	1.11(90/81)	0.69(65/94)*	1.27(107/84)	1.36(105/77)
Body weight of live newborns(g) ^{g)}				
Male On day 0	6.3±0.5	6.4±0.6	6.2±0.3	6.2±0.5
4	9.6±1.0	9.5±1.2	9.2±0.6 ⁱ⁾	9.4±1.1
Female On day 0	6.0±0.5	6.0±0.6	5.8±0.4	5.7±0.4
4	9.1±1.0	9.0±1.0	8.5±0.8 ⁱ⁾	8.6±0.7
Viability index ^{h)}	98.83	98.74	89.01	95.05
No. of external anomalies	0	0	0	0

* : P<0.05(significantly different from control).

a) Values are mean ±S.D.(day).

b) Values in parentheses represent mean ±S.D.

c) Gestation index=(Number of females with live newborns/Number of pregnant females)×100.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of litters.

e) Birth index=(Number of live newborns/Number of implantations)×100.

f) Values in parentheses represent the number of male/female live newborns.

g) Values are mean ±S.D.

h) Viability index=(Number of live newborns on day 4 after birth/Number of live newborns)×100.

i) n=11.