

グリオキサ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：0267

CAS No. 107-22-2

2000年4月21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

グリオキサ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：0267

本 文

本文目次

頁

要約	1
I 試験材料	
I-1 被験物質の性状等	
I-1-1 名称と別名	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	4
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性	
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	
II-1 投与	
II-1-1 投与経路、投与方法及び投与期間	5
II-1-2 投与濃度及びその設定理由	5
II-1-3 被験物質混合飲水の調製方法	5
II-1-4 被験物質混合飲水中の被験物質の濃度測定	5
II-1-5 被験物質混合飲水中の被験物質の安定性	6
II-1-6 被験物質の摂取量	6
II-2 動物管理	
II-2-1 各群の使用動物数	6
II-2-2 群分け及び個体識別方法	6
II-2-3 飼育条件	7

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の一般状態の観察	7
II-3-2 体重測定	8
II-3-3 摂水量測定	8
II-3-4 摂餌量測定	8
II-3-5 血液学的検査	8
II-3-6 血液生化学的検査	8
II-3-7 尿検査	8
II-3-8 病理学的検査	9

II-4 数値処理と統計処理

II-4-1 数値の取り扱いと表示	9
II-4-2 母数の取り扱い	10
II-4-3 統計処理	10

II-5 試資料の保管 11

III 試験成績

III-1 生死状況	12
III-2 一般状態	12
III-3 体重	12
III-4 摂水量	12
III-5 摂餌量	13
III-6 被験物質摂取量	13
III-7 血液学的検査	13
III-8 血液生化学的検査	14
III-9 尿検査	14
III-10 病理組織学的検査	
III-10-1 剖検	14
III-10-2 臓器重量	15
III-10-3 病理組織学的検査	15
III-10-4 死因	18

IV 考察及びまとめ

IV-1	生死状況、死因、一般状態、体重、摂餌量、摂水量	19
IV-2	腫瘍性病変	19
IV-3	非腫瘍性病変	20
IV-4	その他	22

V	結論	23
---	----------	----

VI	文献	24
----	----------	----

TABLES

- TABLE 1 EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS IN THE DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- TABLE 2 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- TABLE 3 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- TABLE 4 INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- TABLE 5 INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- TABLE 6 WATER CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- TABLE 7 WATER CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- TABLE 8 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- TABLE 9 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- TABLE 10 NEOPLASTIC LESIONS INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL

TABLE 11 NEOPLASTIC LESIONS INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS OF
FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF
GLYOXAL

TABLE 12 NUMBER OF RATS WITH SELECTED NON-NEOPLASTIC LESIONS IN
THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL

TABLE 13 CAUSE OF DEATH OF RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER
STUDY OF GLYOXAL

FIGURES

- FIGURE 1 SURVIVAL ANIMAL RATE OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- FIGURE 2 SURVIVAL ANIMAL RATE OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- FIGURE 3 BODY WEIGHT CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- FIGURE 4 BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- FIGURE 5 WATER CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- FIGURE 6 WATER CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- FIGURE 7 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL
- FIGURE 8 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF GLYOXAL

PHOTOGRAPHS

- PHOTOGRAPH 1 UTERUS : ENDOMETRIAL STROMAL POLYP
FEMALE, 3000ppm, ANIMAL No. 2339 (H&E)
- PHOTOGRAPH 2 UTERUS : ENDOMETRIAL STROMAL POLYP
FEMALE, 3000ppm, ANIMAL No. 2339 (H&E)
- PHOTOGRAPH 3 KIDNEY :
DEPOSIT OF CRYSTAL (arrow A)
NECROSIS : PAPILLA (arrow B)
HYPERPLASIA : PELVIS (arrow C)
MALE, 3000ppm, ANIMAL No. 2308 (H&E)
- PHOTOGRAPH 4 LUNG : ACCUMURATION OF FOAMY CELLS (arrow head)
FEMALE, 3000ppm, ANIMAL No. 2320 (H&E)

APPENDIXES

- APPENDIX A 1 CLINICAL OBSERVATION: SUMMARY, RAT: MALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX A 2 CLINICAL OBSERVATION: SUMMARY, RAT: FEMALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX B 1 BODY WEIGHT CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX B 2 BODY WEIGHT CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX C 1 WATER CONSUMPTION CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX C 2 WATER CONSUMPTION CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX D 1 FOOD CONSUMPTION CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX D 2 FOOD CONSUMPTION CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX E 1 CHEMICAL INTAKE CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX E 2 CHEMICAL INTAKE CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX F 1 HEMATOLOGY: SUMMARY, RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX F 2 HEMATOLOGY: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX G 1 BIOCHEMISTRY: SUMMARY, RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX G 2 BIOCHEMISTRY: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX H 1 URINALYSIS: SUMMARY, RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX H 2 URINALYSIS: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX I 1 GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: MALE: ALL ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX I 2 GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: MALE
: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX I 3 GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: MALE
: SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX I 4 GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: FEMALE
: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX I 5 GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: FEMALE
: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX I 6 GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: FEMALE
: SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX J 1 ORGAN WEIGHT, ABSOLUTE: SUMMARY, RAT: MALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX J 2 ORGAN WEIGHT, ABSOLUTE: SUMMARY, RAT: FEMALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX K 1 ORGAN WEIGHT, RELATIVE: SUMMARY, RAT: MALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX K 2 ORGAN WEIGHT, RELATIVE: SUMMARY, RAT: FEMALE
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX L 1 HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS:
SUMMARY, RAT: MALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX L 2 HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS:
SUMMARY, RAT: MALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX L 3 HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS:
SUMMARY, RAT: MALE: SACRIFICED ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX L 4 HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS:
SUMMARY, RAT: FEMALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX L 5 HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS:
SUMMARY, RAT: FEMALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX L 6 HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS:
SUMMARY, RAT: FEMALE: SACRIFICED ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX M 1 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF
TUMORS-TIME RELATED, RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX M 2 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF
TUMORS-TIME RELATED, RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX N 1 HISTOLOGICAL FINDINGS: NEOPLASTIC LESIONS:
SUMMARY, RAT: MALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX N 2 HISTOLOGICAL FINDINGS: NEOPLASTIC LESIONS:
SUMMARY, RAT: FEMALE : ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX O 1 NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL
ANALYSIS, RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX O 2 NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL
ANALYSIS, RAT: FEMALE(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX P 1 HISTOLOGICAL FINDINGS: METASTASIS OF TUMOR:
SUMMARY, RAT: MALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
- APPENDIX P 2 HISTOLOGICAL FINDINGS: METASTASIS OF TUMOR:
SUMMARY, RAT: MALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX P 3 HISTOLOGICAL FINDINGS: METASTASIS OF TUMOR:
SUMMARY, RAT: MALE: SACRIFICED ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX P 4 HISTOLOGICAL FINDINGS: METASTASIS OF TUMOR:
SUMMARY, RAT: FEMALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

- APPENDIX P 5 HISTOLOGICAL FINDINGS: METASTASIS OF TUMOR:
SUMMARY, RAT: FEMALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX P 6 HISTOLOGICAL FINDINGS: METASTASIS OF TUMOR:
SUMMARY, RAT: FEMALE: SACRIFICED ANIMALS
(2-YEAR STUDY)
- APPENDIX Q 1 IDENTITY OF GLYOXAL IN THE 2-YEAR DRINKING WATER
STUDY
- APPENDIX Q 2 STABILITY OF GLYOXAL IN THE 2-YEAR DRINKING WATER
STUDY
- APPENDIX R 1 CONCENTRATION OF GLYOXAL IN FORMULATED WATER IN
THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY
- APPENDIX R 2 STABILITY OF GLYOXAL IN FORMULATED WATER IN THE 2-
YEAR DRINKING WATER STUDY
- APPENDIX S 1 METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY AND
URINALYSIS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF
GLYOXAL
- APPENDIX S 2 UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND
BIOCHEMISTRY IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF
GLYOXAL

要約

グリオキサルのがん原性を検索する目的でラットを用いた経口投与による 2 年間 (104 週間) の試験を実施した。

試験には F344/DuCrj(Fischer)ラットを用いた。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、グリオキサルを希釈混合した飲料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 750ppm、1500ppm、3000ppm (公比 2.0) とした。観察、検査項目は、一般状態の観察、体重、摂水量、摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

試験の結果、雌雄とも全投与群の生存率は、対照群より高値であった。投与期間中の動物の一般状態の観察においてグリオキサルの投与の影響と思われる特徴的な所見は雌雄ともに認められなかった。投与群の体重は、投与期間を通して雌雄とも 1500ppm 群と 3000ppm 群で対照群と比較して低値を示した。投与群の摂餌量は、雄では 3000ppm 群で、雌では 1500ppm 群と 3000ppm 群で対照群と比較して低値を示した。投与群の摂水量は、雌雄とも対照群と比較して投与濃度に対応した低値を示した。血液学的検査では血液濃縮様の変化が雄の 1500ppm 群と 3000ppm 群に認められた。血液生化学的検査では摂餌量の低下に起因すると思われる低栄養状態を示唆する変化が雌雄の 1500ppm 群と 3000ppm 群に認められた。尿検査では、腎臓の障害を示唆する変化として潜血の陽性例の増加が雄では 3000ppm 群に、雌では全投与群に認められた。病理組織学的検査では、雄にはグリオキサルの投与による腫瘍の発生増加は認められなかった。雌にはグリオキサルの投与により子宮内膜間質性ポリープのわずかな発生増加が認められたが、その程度は明らかながん原性の証拠にするには不十分であった。非腫瘍性病変について、グリオキサルの投与による影響と考えられるおもな変化は、雄の腎臓の乳頭壊死、雌の腎臓の乳頭壊死、乳頭への結晶沈着や鉍質沈着、近位尿細管の好酸滴、腎盂の尿路過形成、また、雌の肺の泡沫細胞の出現であった。

以上のことから、F344/DuCrj(Fischer)ラットの雄にはグリオキサルの投与による腫瘍の発生増加を示す証拠は認められなかった。F344/DuCrj(Fischer)ラットの雌に子宮内膜間質性ポリープのわずかな発生増加が認められ、この結果はグリオキサルの F344/DuCrj(Fischer)ラット雌に対するがん原性の可能性を示唆するものの不確実な証拠 (equivocal evidence) であった。

グリオキサルのがん原性試験におけるおもな腫瘍発生 (雄)

投 与 濃 度 (ppm)			0	750	1500	3000	ヘト- 検定	コクソア ミテージ 検定
検査動物数			50	50	50	50		
良性腫瘍	皮膚	角化棘細胞腫	0	3	0	0	↑	↓ ↓ ↑
	皮下組織	腺維腫	2	6	4	1		
	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	3	2	2	1		
	脾臓	島細胞腺腫	3	5	3	0		
	下垂体	腺腫	17	14	12	5**		
	甲状腺	C-細胞腺腫	3	6	1	10*		
	副腎	褐色細胞腫	3	6	1	3		
	精巣	間細胞腫	46	39	48	48		
悪性腫瘍	脾臓	単核球性白血病	4	1a)	3	3		
	副腎	悪性褐色細胞腫	2	3	2	1		
	下垂体	腺癌	2	1	0	0		
	下垂体	腺腫／腺癌	19	15	12	5**		↓ ↓

グリオキサルのがん原性試験におけるおもな腫瘍発生 (雌)

投 与 濃 度 (ppm)			0	750	1500	3000	ヘト- 検定	コクソア ミテージ 検定
検査動物数			50	50	50	50		
良性腫瘍	下垂体	腺腫	16	23	17a)	12	↑	↓
	甲状腺	C-細胞腺腫	5a)	5	5a)	6		
	副腎	褐色細胞腫	4	2	1	0		
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	8	12	9	15		
	陰核腺	腺腫	2	4	2	1		
	乳腺	腺腫	0	0	0	1		
		腺維腺腫	8	7	5	6		
悪性腫瘍	脾臓	単核球性白血病	6	4	5	3		↓
	副腎	悪性褐色細胞腫	1	0	0	0		
	乳腺	腺癌	3	4	0	0		
	子宮	子宮内膜間質性肉腫	1	4	0	1		
	副腎	褐色細胞腫／ 悪性褐色細胞腫	5	2	1	0		↓
	乳腺	腺腫／腺維腺腫／腺癌	11	10	5	7		

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

(フィッシャー検定)

↑ : $p \leq 0.05$ で有意増加

↑↑ : $p \leq 0.01$ で有意増加

(ヘト-、コクソアミテージ検定)

↓ : $p \leq 0.05$ で有意減少

↓↓ : $p \leq 0.01$ で有意減少

(コクソアミテージ検定)

a) : 検査動物数 49、他は上段に表示の検査動物数と同じ

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

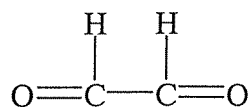
I-1-1 名称と別名

名 称 : グリオキサル(Glyoxal)

別 名 : ジホルミル、シュウ酸ジアルデヒド

CAS.No. : 107-22-2

I-1-2 構造式及び分子量 (文献 1)



分子量 : 58.04

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1,2)

純 度 : 100%

性 状 : 帯緑黄色液体

比 重 : 1.14 (15℃)

融 点 : 15℃

沸 点 : 50.4℃ (101.3kPa)

蒸気圧 : 220mmHg (20℃)

溶解性 : 水に易溶、有機溶剤に可溶

その他 : 保存中に重合してパラグリオキサルになる。

少量の水とは激しく反応する。

純度 100%のグリオキサルは反応性に富むため、試験には 40%水溶液を使用した。

純 度 : 40%水溶液

性 状 : 無色透明水溶液

比 重 : 1.260~1.310 (20/20℃)

pH : 2.0~3.5

保存条件 : 遮光、火気のない冷暗所に保存

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号：CAK4487 (1994.9.9～1995.8.18)

SKQ5736 (1995.8.18～1996.3.8)

SKE5515 (1996.3.8～1996.9.13)

製造元：和光純薬工業株式会社

グレード：化学用

純度：40.2～40.4% (水溶液)

CAK4487：40.2%

SKQ5736：40.4%

SKE5515：40.4%

I-3 被験物質の特性・同一性、安定性

I-3-1 特性・同一性

被験物質の同一性の確認は各ロット毎の被験物質のマススペクトルをマススペクトロメーター (Hitachi M-80B Mass Spectrometer) により測定し、グリオキサルの文献値と比較することにより行った。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値 (文献 3) と同じ分子イオン及びフラグメントピークを示し、グリオキサルであることを確認した。

それらの結果については、APPENDIX Q 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その使用終了後に、ガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 5890A) により被験物質のガスクロマトグラムを測定し、それぞれのデータを比較することにより行った。

その結果、使用開始前及び使用終了後のガスクロマトグラムに差はみられず、投与期間中のグリオキサルは安定であった。

それらの結果については、APPENDIX Q 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) (神奈川県厚木市下古沢 795 番地) から購入した F344/DuCrj (Fischer) ラット (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 248 匹を生後 4 週齢で導入し、各 1 週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 200 匹 (群構成時体重範囲、雄：115～132g、雌：93～106g) を選別し、試験に供した。

II 試験方法

試験計画、材料及び方法等の概要を TABLE 1 に示した。

II-1 投与

II-1-1 投与経路、投与方法及び投与期間

被験物質を脱イオン水（市水を脱イオンし、紫外線滅菌し、フィルターろ過した飲料水）によって設定濃度に希釈調製した混水試料を褐色給水瓶に充填し、それを動物に自由摂取させる経口投与とした。投与期間は 104 週間とし、定期解剖日まで連続投与した。なお、対照群の動物には脱イオン水のみを与えた。

II-1-2 投与濃度及びその設定理由

各群の投与濃度は予備試験である 13 週間投与試験（文献 4）の結果に基づき決定した。すなわち、6 週齢の F344/DuCrj(Fischer)ラット 120 匹を 5 投与群と 1 対照群（各群雌雄 10 匹）に分け、グリオキサールを設定濃度に希釈調製し、動物に自由摂取させる 13 週間の経口投与を行った。グリオキサールの投与群の濃度は雌雄とも 4000ppm、2000ppm、1000ppm、500ppm、250ppm とした。その結果、4000ppm 群では雌雄とも病理組織所見では著変はないが、臓器重量及び血液・生化学的検査で著変が認められ、体重も対照群に対して 90% を下回っていた。2000ppm 群では雌雄とも病理組織学的検査では著変は認められず、臓器重量及び血液・生化学的検査で若干の変化があるのみで長期間の投与を実施した場合、動物の生死に係わる濃度であるとは考えられなかった。

以上のことから、がん原性試験の投与群の最高用量は雌雄とも 4000ppm と 2000ppm の間の 3000ppm とし、以下 1500ppm、750ppm（公比 2）とした。

II-1-3 被験物質混合飲水の調製方法

脱イオン水に被験物質を溶解して各設定濃度になるように希釈混合により調製した。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、被験物質混合飲水の調製頻度は、給水瓶の交換頻度に合わせて週に 2 回とした。

II-1-4 被験物質混合飲水中の被験物質の濃度測定

各投与濃度に調製された被験物質混合飲水中の被験物質の濃度は、概ね 3 ヶ月毎にガス

クロマトグラフ (Hewlett Packard 5890A) を用いて分析した。それらの結果を APPENDIX R 1 に示した。

各群の調製濃度は設定濃度に対し、96.9～112.2%の範囲であった。

II-1-5 被験物質混合飲水中の被験物質の安定性

被験物質混合飲水は、試験開始前に 8 日間、試験期間中に 14 日間室温で保管し、被験物質混合飲水中の被験物質の安定性を確認した。

被験物質混合飲水中の被験物質濃度はガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 5890A) を用いて分析した。その結果、室温での保管期間において安定であることを確認した。

それらの結果について、APPENDIX R 2 に示した。

II-1-6 被験物質の摂取量

各計測週における摂水量と設定濃度より体重当たりの被験物質の摂取量 (g/kg/day) を算出した。

それらの結果について、APPENDIX E 1,2 に示した。

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、雌雄各群 50 匹の動物を用いた。

雄		雌	
群 名 称	使用動物数 (動物番号)	群 名 称	使用動物数 (動物番号)
対照群	50 匹 (1001～1050)	対照群	50 匹 (2001～2050)
750ppm	50 匹 (1101～1150)	750ppm	50 匹 (2101～2150)
1500ppm	50 匹 (1201～1250)	1500ppm	50 匹 (2201～2250)
3000ppm	50 匹 (1301～1350)	3000ppm	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、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 5)。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間においては色素塗布した。投与期間においては耳パンチにより識別した。なお、全飼育期間を通してケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物は検疫期間を含む全飼育期間、バリア区域（AC-1 空調エリア）内の独立した室（雄を 101 室、雌を 103 室）にそれぞれ収容し、各室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

II-2-3 飼育条件

動物は、各試験ともに、全飼育期間を通して、温度： $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度： $55 \pm 10\%$ 、明暗サイクル：12 時間点灯（8:00～20:00）／12 時間消灯（20:00～8:00）、換気回数：15～17 回/時に設定した環境下で飼育した。なお、試験期間中飼育室の作業内容、空調設備の保守点検、一時的な停電により設定値の幅を越えることがあったが、動物の状態に影響を与えるほどの長時間または大きな変化ではなく、一日の平均値は設定値の範囲内であった。

動物は単飼ケージ（ステンレス製二連網ケージ：170W×294D×176H mm）に収容し、ケージ交換は 2 週間毎に実施した。

飼料は、全飼育期間を通してオリエンタル酵母工業(株) 千葉工場（千葉県千葉市美浜区新港 8-2）の CRF-1 固型飼料（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絶食させた。

飲水については、検疫期間はフィルターろ過した市水（秦野市水道局供給）に紫外線を照射し、自動給水装置により自由摂取させた。馴化期間は市水を脱イオンし、紫外線照射し、フィルターろ過した飲料水を給水瓶により自由摂取させた。投与期間は市水を脱イオンし、紫外線照射し、フィルターろ過した飲料水に被験物質を希釈混合したものを給水瓶により自由摂取させた。

なお、飼料の夾雑物については(財)日本食品分析センター（東京都渋谷区元代々木町 52 番 1 号）の分析データを使用ロットごとに入手し、また飲料水については(財)食品薬品安全センター秦野研究所（神奈川県秦野市落合 729-5）に 3 ヶ月毎に分析を委託し、それぞれ試験計画書に規定した許容基準と比較して異常のないことを確認した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の一般状態の観察

投与期間中は生死及び瀕死の確認を毎日 1 回以上行い、全動物の一般状態の観察を週 1 回行った。

II-3-2 体重測定

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回、体重を測定した。なお、動物の死亡発見時と切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重を測定した。

II-3-3 摂水量測定

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（但し、104 週にも測定した）、給水量と残水量を測定し、その差を給水日数で除した値を 1 日当たりの摂水量とした。

II-3-4 摂餌量測定

投与開始後 14 週までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（但し、104 週にも測定した）、給餌量と残餌量を測定し、その差を給餌日数で除した値を 1 日当たりの摂餌量とした。

II-3-5 血液学的検査

定期解剖時まで生存した全動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2K 入り採血管に採血した血液を用いて血液学的検査を行った。検査対象動物は解剖日前日夕方より（18 時間以上）絶食させた。検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX S 1 に示した。

II-3-6 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存した全動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血し、遠心分離して得られた血漿を用いて血液生化学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食（18 時間以上）させた。検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX S 1 に示した。

II-3-7 尿検査

投与最終週まで生存した動物について、新鮮尿を採取し、尿検査を行った。検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX S 1 に示した。

II-3-8 病理学的検査

1 剖検

全動物について剖検を行った。

2 臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について TABLE 1 に示した臓器の実重量を測定した。また、実重量の体重比、すなわち定期解剖時の体重に対する百分率を算出した。

3 病理組織学的検査

全動物の臓器を 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液に固定後、TABLE 1 に示した臓器及び肉眼的に変化のみられた組織を、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡にて病理組織学的に検査した。

II-4 数値処理と統計処理

II-4-1 数値の取り扱いと表示

体重については g を単位とし、小数点以下第 1 位を四捨五入して整数値で表示した。

摂餌量と摂水量については g を単位とし、計測期間を通しての摂取量を小数点以下第 1 位まで計測し、この値を計測期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂取量を算出し、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。

グリオキサルの体重当りの摂取量は摂水量にグリオキサルの設定濃度を乗じ体重で除した値を g/kg(body weight)/day を単位として小数点以下第 4 位を四捨五入して小数点以下第 3 位まで表示した。

臓器実重量については g を単位とし、小数点以下第 3 位まで計測し、表示した。臓器重量体重比については臓器実重量値を解剖時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第 4 位を四捨五入し、小数点以下第 3 位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査については APPENDIX S 2 に示した精度により表示した。A/G 比はアルブミン/(総蛋白-アルブミン)による計算で求め、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。

なお、各数値データにおいての平均値及び標準偏差は上記に示した桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

II-4-2 母数の取り扱い

体重、摂水量及び摂餌量については、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、その中から欠測となったデータを除外して母数とした。

臓器重量、血液学的検査、血液生化学的検査は、定期解剖時まで生存した動物を対象とし、欠測となったデータを除外して母数とした。

尿検査は、投与最終週まで生存した動物を対象に行い、検査ができた動物数を母数とした。

剖検と病理組織学的検査データは、各群の有効動物数（供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数）を母数とした。ただし、腫瘍性病変については臓器別に、検査不能臓器数を除いたものを母数とした。

II-4-3 統計処理

本試験で得られた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。

予備検定については 5% の有意水準で両側検定を行い、最終検定では 5% 及び 1% で両側検定を行った。

なお、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等を基準に 1~4 のグレード分けし、 χ^2 検定を行った。また、尿検査についても 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、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto 検定（文献 6）、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。

χ^2 検定と Fisher 検定は対照群と各投与群間との検定である。

各群雌雄毎に検査数が 2 以下の項目については検定より除外した。

注：Peto 検定に用いるコンテックス

- 0：定期解剖例にみつかった腫瘍
- 1：死亡／瀕死例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 だと思うが、確かでない腫瘍
- 3：多分 4 だと思うが、確かでない腫瘍
- 4：死亡／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関わっていた腫瘍

II-5 試資料の保管

試験計画書、標本、生データ、記録文書、最終報告書、信頼性保証証明書、被験物質、その他本試験に係る資料は試資料保管施設に保管する。保管期間は最終報告書提出後 5 年間とする。

III 試験成績

III-1 生死状況

生死状況を TABLE 2, 3 及び FIGURE 1, 2 に示した。

雌雄とも全投与群の試験終了時の生存率は、対照群より高値であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、雄では対照群：39/50 例(78%)、750ppm 群：41/50 例(82%)、1500ppm 群：41/50 例(82%)、3000ppm 群：46/50 例(92%)、雌では対照群：38/50 例(76%)、750ppm 群：41/50 例(82%)、1500ppm 群：42/50 例(84%)、3000ppm 群：39/50 例(78%)であった。

III-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1, 2 に、外部腫瘍、内部腫瘍の発生動物数を TABLE 4, 5 に示した。

グリオキサルの投与による特徴的な所見は、雌雄とも死亡動物及び生存動物のいずれにも認めなかった。また、投与群の外部腫瘍、内部腫瘍の発生時期は、雌雄とも対照群とほぼ同じ時期か、むしろ遅かった。なお、外部腫瘍の発生数は、対照群に比べ雌雄とも 3000ppm 群で少なかった。

III-3 体重

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

雌雄とも 1500ppm 群と 3000ppm 群で全投与期間を通じて体重増加の抑制が認められた。750ppm 群で雄は 2 週から 10 週にかけて、雌は投与期間後半の 74～104 週にかけて有意な体重の低値が認められた。

なお、投与終了時の各投与群の体重は対照群に対して、雄は 750ppm 群：100%、1500ppm 群：94%、3000ppm 群：78%であり、雌は 750ppm 群：92%、1500ppm 群：83%、3000ppm 群：68%であった。

III-4 摂水量

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

雄の投与群の摂水量は、全投与期間を通して投与濃度に対応した低値を示した。全投与期間における各群の平均摂水量は、対照群：19.4g(100%)、750ppm 群：17.0g(87.6%)、1500ppm 群：14.6g(75.3%)、3000ppm 群：12.2g(62.9%)であった。

雌でも投与群の摂水量は対照群に対して低値を示した。ただし、1500ppm 群と 3000ppm 群の摂水量は同様の推移を示した。全投与期間における各群の平均摂水量は、対照群：18.5g(100%)、750ppm 群：14.2g(76.8%)、1500ppm 群：12.1g(65.4%)、3000ppm 群：11.0g(59.5%)であった。

III-5 摂餌量

摂餌量を TABLE 8, 9, FIGURE 7, 8 及び APPENDIX D 1, 2 に示した。

雄の摂餌量は、750ppm 群と 1500ppm 群で対照群より有意な低値を示す週が散見されるものの、全体的には対照群と同様な摂餌量の推移を示した。3000ppm 群では全投与期間を通して有意な低値が認められた。全投与期間における各群の平均摂餌量は、対照群：15.5g(100%)、750ppm 群：15.3g(98.7%)、1500ppm 群：15.0g(96.8%)、3000ppm 群：13.6g(87.7%)であった。

雌では、750ppm 群で対照群と同様な摂餌量の推移を示した。1500ppm 群では全投与期間を通してわずかな摂餌量の低値が認められた。3000ppm 群では全投与期間を通して有意な低値が認められた。全投与期間における各群の平均摂餌量は、対照群：11.1g(100%)、750ppm 群：10.9g(98.2%)、1500ppm 群：10.5g(94.6%)、3000ppm 群：9.6g(86.5%)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 E 1, 2 に示した。

1 日当たりの被験物質摂取量は、雄で 750ppm 群：0.027～0.078g/kg、1500ppm 群：0.050～0.139g/kg、3000ppm 群：0.096～0.263g/kg、雌では 750ppm 群：0.038～0.085g/kg、1500ppm 群：0.072～0.142g/kg、3000ppm 群：0.143～0.278g/kg の範囲にあった。

全投与期間における各群の平均被験物質摂取量は雄で 750ppm 群と 1500ppm 群：1.8 倍、1500ppm 群と 3000ppm 群：1.9 倍、雌では 750ppm 群と 1500ppm 群：1.8 倍、1500ppm 群と 3000ppm 群：2.0 倍であり、ほぼ設定用量比（公比 2.0）に対応していた。

III-7 血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX F 1, 2 に示した。

雄では、血液濃縮様の変化として、赤血球数、ヘモグロビン濃度、血小板数及びヘマトクリット値の増加が 1500ppm 群と 3000ppm 群で認められた。その他、MCV 及び MCH の減少が 3000ppm 群で認められた。なお、白血球分類でその他（識別不能）の減少が 3000ppm 群で、増加が 1500ppm 群で認められたが、その変化の程度はわずかであった。

雌では、著変はみられなかった。

Ⅲ-8 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を APPENDIX G 1, 2 に示した。

雄では、A/G比の増加、GOT 活性の上昇ならびに総蛋白、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、クレアチニン及びカルシウムの減少が 1500ppm 群と 3000ppm 群に認められ、 γ -GTP 活性の低下が 3000ppm 群に認められた。

雌では、ALP 活性の低下が全投与群に認められ、A/G比の増加、ならびに総蛋白、総コレステロール、トリグリセライド及びリン脂質の減少が 1500ppm 群と 3000ppm 群に認められた。また、尿素窒素の増加と CPK 活性の上昇、カルシウムの減少ならびに γ -GTP 活性、GPT 活性の低下が 3000ppm 群に認められた。

Ⅲ-9 尿検査

尿検査の結果を APPENDIX H 1, 2 に示した。

雄では、蛋白の陽性度の減少及び潜血の陽性例の増加が 3000ppm 群に認められた。

雌では、潜血の陽性例の増加が投与濃度に対応して全投与群に認められた。

Ⅲ-10 病理学的検査

Ⅲ-10-1 剖検

解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX I 1~6 に示した。

雄では、精巣の結節が 1500ppm 群と 3000ppm 群に多く認められた。その発生例数は、対照群で 39/50 例、750ppm 群で 36/50 例、1500ppm 群で 47/50 例、3000ppm 群で 45/50 例であった。また、腎臓の顆粒状変化が投与濃度に対応して減少した。その発生例数は、対照群で 31/50 例、750ppm 群で 21/50 例、1500ppm 群で 6/50 例、3000ppm 群で 3/50 例であった。

雌では、皮下腫瘍の発生が投与群で減少した。その発生例数は、対照群で 13/50 例、750ppm 群で 12/50 例、1500ppm 群で 4/50 例、3000ppm 群で 7/50 例であった。また、子宮の結節が投与群に多く認められた。その発生例数は、対照群で 3/50 例、750ppm 群で 8/50 例、1500ppm 群で 6/50 例、3000ppm 群で 7/50 例であった。

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 APPENDIX J 1, 2、K 1, 2 に示した。

雄では、対照群に比較して 1500ppm 群と 3000ppm 群に肝臓の体重比と実重量の低値が認められた。なお、1500ppm 群と 3000ppm 群の解剖時体重は対照群と比較して低値であり、これに伴って 1500ppm 群では副腎、心臓及び腎臓の実重量の低値、3000ppm 群では副腎、心臓、肺、腎臓、脾臓及び脳の実重量の低値と精巣、肺、腎臓及び脳の体重比の高値がみられた。

雌では、全投与群の解剖時体重は対照群と比較して低値であり、これに伴って 1500ppm 群では副腎、心臓、肺、腎臓及び肝臓の実重量の低値と卵巣、肺、腎臓及び脳の体重比の高値、3000ppm 群では副腎、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓及び脳の実重量の低値と副腎、卵巣、心臓、肺、腎臓、肝臓及び脳の体重比の高値がみられた。

III-10-3 病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果は APPENDIX L 1~6 に、その中のおもな非腫瘍性病変を TABLE 12 に抜粋して示した。腫瘍性病変の結果は、APPENDIX M 1, 2 に担腫瘍動物数と腫瘍数、APPENDIX N 1, 2 に腫瘍の種類別の発生数、APPENDIX O 1, 2 に統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定)、APPENDIX P 1~6 に転移性病変を示し、おもな腫瘍性病変を TABLE 10, 11 に抜粋した。

<鼻腔>

雄では、炎症が 3000ppm 群で減少した。

雌では、嗅上皮のエオジン好性変化が 3000ppm 群で増加した。

<下垂体>

雄の腺腫の発生(対照群:17/50 例、750ppm 群:14/50 例、1500ppm 群:12/50 例、3000ppm 群:5/50 例)が、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定でも 3000ppm 群で対照群に比較して減少を示した。腺癌の発生(対照群:2/50 例、750ppm 群:1/50 例、1500ppm 群:0/50 例、3000ppm 群:0/50 例)は統計的には有意差を示さなかったが、腺腫と腺癌を合わせた発生(対照群:19/50 例、750ppm 群:15/50 例、1500ppm 群:12/50 例、3000ppm 群:5/50 例)は Cochran-Armitage 検定(減少傾向)と Fisher 検定(3000ppm 群で減少)で有意差を示した。

<甲状腺>

雄の C-細胞腺腫の発生(対照群:3/50 例、750ppm 群:6/50 例、1500ppm 群:1/50 例、

3000ppm 群：10/50 例）が、Peto 検定（死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し Fisher 検定でも 3000ppm 群で有意な減少を示した。

<副腎>

雌の褐色細胞腫の発生（対照群：4/50 例、750ppm 群：2/50 例、1500ppm 群：1/50 例、3000ppm 群：0/50 例）が、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。また、褐色細胞腫と悪性褐色細胞腫の合計の発生（対照群：5/50 例、750ppm 群：2/50 例、1500ppm 群：1/50 例、3000ppm 群：0/50 例）も Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

<骨髄>

雄では、赤血球造血の増加が 1500ppm 群と 3000ppm 群で減少した。

<肺>

泡沫細胞の出現が、雌の対照群の 2 例（軽度）、750ppm 群の 3 例（軽度）、1500ppm 群の 5 例（軽度）、3000ppm 群の 15 例（軽度 14 例、中等度 1 例）に認められ、3000ppm 群で増加を示した。

<脾臓>

雌では、ヘモジデリン沈着が 3000ppm 群で減少した。

<肝臓>

雄では、肉芽形成、明細胞性小増殖巣及び肝海綿状変性が 3000ppm 群で減少した。

雌では、胆管の増生が 3000ppm 群で減少した。

<腎臓>

腎臓の変化として、雌雄ともに乳頭壊死の発生増加、雌に乳頭への鉍質沈着と結晶沈着、近位尿細管の好酸滴及び腎盂の尿路上皮過形成の発生増加が認められた。また、雌雄とも慢性腎症の発生は減少していた。

乳頭壊死は雄では 750ppm 群の 1 例（軽度）、1500ppm 群の 9 例（軽度）、3000ppm 群の 24 例（軽度 23 例、中等度 1 例）、雌では 750ppm 群の 4 例（軽度）、1500ppm 群の 31 例（軽度 13 例、中等度 18 例）、3000ppm 群の 47 例（軽度 10 例、中等度 35 例、重度 2 例）に発生した。対照群での乳頭壊死の発生は雌雄ともにみられず、1500ppm 群と 3000ppm 群に統計学的に有意な増加が示された。乳頭壊死は雌雄ともにほとんどの例で腎乳頭の間より先端の部分にみられ、壊死の程度は雌に強くみられた。雄では腎乳頭の間質だけに壊死がみられ一部の例に上皮の空胞化がみられたのに対し、雌では多くの例で腎乳頭の先端の脱落を伴う壊死がみられ、雌の 2 例は乳頭の基部までの重度な壊死であった。

乳頭の結晶沈着は雌の 1500ppm 群の 1 例（軽度）と 3000ppm 群の 17 例（軽度 14 例、中等度 3 例）にみられ、3000ppm 群に有意な増加が示された。結晶の沈着部位は多くの例で乳頭の先端部分であった。この所見は対照群と 750ppm 群には発生がみられなかった。

腎盂における尿路上皮の過形成は、雌の対照群の 1 例（軽度）、1500ppm 群の 2 例（軽度）、3000ppm 群の 34 例（軽度 24 例、中等度 9 例、重度 1 例）に発生がみられ、3000ppm 群に有意な増加が示された。乳頭に結晶沈着を認めた例の多くに腎盂の尿路上皮の過形成がみられ、結晶の沈着部位に対応した腎盂の部分に過形成が強くみられた。また、乳頭の結晶沈着が強いものほど乳頭壊死が強く、腎盂の尿路上皮の過形成も強かった。

乳頭の鉍質沈着は、雌の 1500ppm 群の 6 例（軽度）と 3000ppm 群の 19 例（軽度）にみられた。この所見は対照群と 750ppm 群には発生がみられず、1500ppm 群と 3000ppm 群に有意な増加が示された。

雌の近位尿細管の好酸滴の発生は、対照群が 13 例（軽度 11 例、中等度 2 例）であったのに対し、750ppm 群が 18 例（軽度 14 例、中等度 4 例）、1500ppm 群が 26 例（軽度 24 例、中等度 2 例）、3000ppm 群が 23 例（軽度）であり、1500ppm 群と 3000ppm 群に有意な増加が示された。

慢性腎症は、雄では 1500ppm 群と 3000ppm 群で、雌では 3000ppm 群で減少した。

<子宮>

子宮内膜間質性ポリープの発生（対照群：8/50 例、750ppm 群：12/50 例、1500ppm 群：9/50 例、3000ppm 群：15/50 例）が、Peto 検定（死亡率法）で増加傾向を示した。

<乳腺>

雌の腺癌の発生（対照群：3/50 例、750ppm 群：4/50 例、1500ppm 群：0/50 例、3000ppm 群：0/50 例）が、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

上記の所見の他に投与用量に対応したものではなかったが、投与群と対照群の間に統計的に有意な増加あるいは減少を示した非腫瘍性病変を以下に示す。

鼻腔：雄では、呼吸上皮のエオジン好性変化が 750ppm 群と 1500ppm 群で、鼻腺の呼吸上皮化生が 1500ppm 群で減少し、異物性の炎症が 750ppm 群で増加した。雌では、呼吸上皮のエオジン好性変化が 750ppm 群と 1500ppm 群で増加した。

脾臓：雄では、ヘモジデリン沈着が 750ppm 群で増加、髄外造血が 1500ppm 群で減少した。

肝臓：好塩基性小増殖巣が雄の 1500ppm 群で減少した。

腎臓：腎盂の鉍質沈着が雌の 750ppm 群と 1500ppm 群で減少した。

精巣：萎縮が雄の 750ppm 群で減少した。

前立腺：過形成が雄の 750ppm 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 13 に示した。

雌雄とも投与群の死亡／瀕死数は対照群よりも少なく、投与群に特徴的な死因は認められなかった。

IV 考察及びまとめ

IV-1 生死状況、死因、一般状態、体重、摂餌量、摂水量

最終計測週（104 週）における投与群の生存率は、雌雄とも対照群より高値であった。動物の生存率は、制限給餌を行った場合など体重増加の抑制があるときに向上すると報告されており（文献 7, 8）、雌雄とも投与群の動物に摂餌量の減少あるいは体重増加の抑制があることから生存率の向上があったと考えられる。被験物質投与群に特徴的な死因は認められず、投与期間中の一般状態の観察では、被験物質の投与によると思われる所見は認められなかった。雌雄とも 1500ppm 群と 3000ppm 群に全投与期間を通した体重増加の抑制が認められた。雌の 1500ppm 群と雌雄の 3000ppm 群で全投与期間を通した摂餌量の低値が認められた。雌雄とも投与群の摂水量は投与濃度に対応した低値を示した。

IV-2 腫瘍性病変

腫瘍性病変では、雄の甲状腺の C-細胞腺腫、雌の子宮内膜間質性ポリープの発生は有意な増加傾向を示した。これに対し、雄の下垂体腺腫及び腺腫と腺癌を合わせた発生、雌の副腎の褐色細胞腫及び褐色細胞腫と悪性褐色細胞腫を合わせた発生ならびに乳腺の腺癌の発生には有意な減少が示された。これらの変化について考察する。

雄の甲状腺の C-細胞腺腫の発生は、対照群：3/50 例(6%)であったのに対し、750ppm 群：6/50 例(12%)、1500ppm 群：1/50 例(2%)、3000ppm 群：10/50 例(20%)であり、Peto 検定で増加傾向が示され、Fisher 検定で 3000ppm 群に有意な増加が示された。しかし、当センターのヒストリカルコントロールデータでは、対照群における甲状腺の C-細胞腺腫の発生率は 4~26%(108/900 例、平均 12.0%)の範囲にあり、今回の試験における投与群の発生率はいずれの群も当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内にあった。また、投与濃度に対応した変化ではなかった。したがって、甲状腺の C-細胞腺腫の発生は有意な増加傾向を示したものの、被験物質の投与による影響で増加したとは考えられなかった。

雌の子宮内膜間質性ポリープの発生は、対照群：8/50 例(16%)であったのに対し、750ppm 群：12/50 例(24%)、1500ppm 群：9/50 例(18%)、3000ppm 群：15/50 例(30%)であり、Peto 検定で増加傾向が示された。当センターのヒストリカルコントロールデータでは子宮内膜間質性ポリープの発生率は 2~28%(131/899 例、平均 14.6%)の範囲であり、3000ppm 群の発生率はこの範囲をこくわずかに越えていた。しかしながら、子宮内膜間質性ポリープは、F344 ラットには一般的な自然発生腫瘍であり、最高用量の 3000ppm 群でも当センターのヒストリカルコントロールデータの上限をわずかに 1 例上回っただけであるので、被験物質の影響であると断言できなかった。

雄の下垂体腺腫の発生は、対照群：17/50 例(34%)であるのに対し、750ppm 群：14/50

例(28%)、1500ppm 群：12/50 例(24%)、3000ppm 群：5/50 例(10%)であり、Cochran-Armitage 検定で減少傾向、Fisher 検定で 3000ppm 群に有意な減少が示された。また、下垂体の腺腫と腺癌の合計の発生でも Cochran-Armitage 検定で減少傾向が示された。当センターのヒストリカルコントロールデータでは、下垂体の腺腫の発生率は 20～54% (309/900 例、平均 34.3%) の範囲であり、3000ppm 群の発生率はこれより低いことから、被験物質の投与によって、この腫瘍が減少した可能性がある。下垂体の腺腫は、体重増加の抑制があるときに減少すると報告されており（文献 7, 8, 9）、雄の 3000ppm 群に体重増加の抑制があることから、下垂体の腺腫の発生減少はグリオキサルの投与による体重増加の抑制に対応したものと考えられた。

雌における副腎の褐色細胞腫の発生は、対照群：4/50 例(8%)であるのに対し、750ppm 群：2/50 例(4%)、1500ppm 群：1/50 例(2%)、3000ppm 群：0/50 例(0%)であり、Cochran-Armitage 検定で減少傾向が示された。また、褐色細胞腫と悪性褐色細胞腫の合計の発生も Cochran-Armitage 検定で減少傾向が示された。しかし、当センターでのヒストリカルコントロールデータの副腎の褐色細胞腫の発生率は 0～16%(41/899 例、平均 4.6%) の範囲であり、投与群の発生率はこの範囲内にあることと、群間の差が小さいことから、グリオキサルの投与によって、この腫瘍発生が抑制されたとは言えなかった。

雌の乳腺の腺癌は、対照群の発生が 3/50 例(6%)であるのに対し 750ppm 群では 4/50 例(8%)、1500ppm 群と 3000ppm 群では 0/50 例(0%)であり、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。しかし、当センターでのヒストリカルコントロールデータの乳腺の腺癌の発生率は 0～6%(14/899 例、平均 1.6%)の範囲であり、1500ppm 群と 3000ppm 群の発生率はこの範囲内にあることと、群間の差が小さいことから、グリオキサルの投与によってこの腫瘍発生が抑制されたとは言えなかった。

以上のように、雄にはグリオキサルの投与によると考えられる腫瘍の発生増加は認められなかった。雌には子宮内膜間質性ポリープのわずかな発生増加がみられたが、グリオキサルのがん原性の可能性を示唆するものの、その程度は明らかな証拠にするには不十分であった。なお、雄の下垂体腺腫の減少は、被験物質の投与により生じた体重増加の抑制による変化と考えられた。

IV-3 非腫瘍性病変

非腫瘍性病変については、腎臓への影響がグリオキサルの 180 日間の飲水投与試験で報告されており（文献 10）、今回の試験でも腎臓に対する影響が示唆された。また、肺にも病変が認められた。

腎臓の変化は、雄では乳頭壊死の発生増加が 1500ppm 群と 3000ppm 群で認められ、雌では乳頭壊死、乳頭の鉍質沈着及び近位尿細管の好酸滴の発生増加が 1500ppm 群と 3000ppm 群に、乳頭の結晶沈着と腎盂の尿路過形成の発生増加が 3000ppm 群に認められた。

乳頭壊死の発生は雌雄で差があり、雄に比べて雌に発生例数が多く、また壊死の程度も強く認められた。さらに、雌では乳頭壊死に加えて乳頭への結晶沈着や鉍質沈着、近位尿細管の好酸滴及び腎盂の尿路過形成の発生も増加していた。これらの所見の中で、乳頭壊死、乳頭への結晶沈着及び腎盂の尿路過形成には関連性があり、乳頭への結晶沈着が強く認められる腎臓では、その部位に対応して乳頭の壊死が強く認められ、また、腎盂の過形成も結晶沈着の部位に対応して見られた。腎臓に結晶沈着を起こす化学物質の例としてエチレングリコールが知られている。エチレングリコールは体内でグリコールアルデヒド→グリオキサル→グリオキシリク酸→シュウ酸となり、尿中のカルシウムと結合しシュウ酸カルシウムの形で尿細管に沈着すると報告（文献 11）されており、グリオキサルはその中間代謝物であることから、同じ代謝経路をとると考えられる。また、グリオキサルは *in vitro* では濃硝酸で酸化されてシュウ酸になり、また、経口投与では尿中にシュウ酸として現れるとの報告（文献 12）がある。今回の試験で雌でみられた乳頭の結晶沈着の機序は明らかでないが、グリオキサルの代謝物であるシュウ酸あるいはシュウ酸塩の尿路への沈着の可能性が考えられた。乳頭の鉍質沈着はカルシウムの沈着を示唆する所見であり、カルシウムの沈着は乳頭壊死部に初期変化としてみられることが知られており、本試験でみられた乳頭の鉍質沈着の増加も乳頭壊死の発生に伴う二次的な所見と考えられた。

なお、慢性腎症の発生は雌雄とも減少していた。慢性腎症は加齢に伴って発生する自然発生病変で、体重増加の抑制があるとその発生が抑制されることが知られており（文献 7, 8, 9）、グリオキサルの投与群に認められた慢性腎症の発生減少も体重増加抑制の影響と考えた。

肺については、泡沫細胞の出現が雌の 3000ppm 群で増加しており、グリオキサルの投与の影響による変化である可能性が示唆された。泡沫細胞の出現は肺に沈着した異物の肺胞マクロファージによる処理を示す所見であるが、本試験では肺に異物の沈着は認められなかった。

上記の非腫瘍性病変の他に、雄における骨髓の赤血球造血の亢進像の減少（1500ppm 群と 3000ppm 群）及び肝臓の肉芽形成や明細胞性小増殖巣の減少（3000ppm 群）、肝海綿状変性の減少（3000ppm 群）ならびに鼻腔の炎症の減少（3000ppm 群）、雌における鼻腔の嗅上皮のエオジン好性変化の増加（3000ppm 群）、脾臓のヘモジデリン沈着の減少（3000ppm 群）及び肝臓の胆管の増生の減少（3000ppm 群）が認められた。これら自然発生病変の増加または減少の原因は明らかではないが、グリオキサルの投与による影響と考えられた。

IV-4 その他

血液学的検査では、雄の 1500ppm 群と 3000ppm 群に赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の増加等が認められた。これらの変化は摂水量低下に起因する血液濃縮を示唆する所見と考えられたが、制限給餌でもこれらの変化が起こると報告されている（文献 7）ことと、同じ摂水量の低下のある雌ではこれらの変化は認められなかったことからこの原因は不明であった。血液生化学的検査では、摂餌量低下に起因すると思われる低栄養状態を示唆する所見として、雌雄とも 1500ppm 群と 3000ppm 群に総蛋白、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質の減少が認められた。尿検査では、腎臓の障害を示唆する所見として、雄では 3000ppm 群に、雌では全投与群に潜血の陽性例の増加が認められた。また、雄で尿蛋白の低下が 3000ppm 群に認められ、慢性腎症の発生減少に伴う変化と考えられた。剖検では、雄の腎臓の顆粒状変化が投与濃度に対応して減少し、雌では、子宮の結節が投与群に多く認められた。これらの中で、剖検での雄の腎臓の顆粒状変化が投与濃度に対応し減少していたことは、病理組織学的検査での慢性腎症の減少に対応していた。また、剖検で子宮の結節が投与群に多く認められたことは、病理組織学的検査での子宮内膜間質性ポリープ及び子宮内膜間質性肉腫の投与群での発生増加に対応していた。臓器重量では、諸臓器にみられた実重量の低値や体重比の高値は体重増加の抑制に伴う変化と考えられた。ただし、雄の 1500ppm 群と 3000ppm 群に認められた肝臓の重量低下は低栄養状態を示唆するものと考えられた。

その他、血液学的検査、血液生化学的検査で変化のみられたパラメータがあった。しかし、これらの変化は、わずかな変化であったり、病理組織学的検査でも関連する臓器及び組織に変化が認められなかったことから、被験物質との関連は不明であった。

V 結論

F344/DuCrj(Fischer)ラットを用いてグリオキサルの2年間(104週間)にわたる経口投与(混水)によるがん原性試験を行った。

その結果、F344/DuCrj(Fischer)ラット雄にはグリオキサルの投与による腫瘍の発生増加を示す証拠は認められなかった。F344/DuCrj(Fischer)ラット雌にはグリオキサルの投与により、子宮内膜間質性ポリープのわずかな発生増加が認められた。しかし、その程度は明らかながん原性の証拠にするには不十分であった。したがって、グリオキサルはF344/DuCrj(Fischer)ラット雌に対するがん原性の可能性を示唆するものの不確実な証拠(equivocal evidence)であった。

なお、おもな非腫瘍性病変として、グリオキサルの投与による影響と考えられる変化は、雄の腎臓の乳頭壊死、雌の腎臓の乳頭壊死、乳頭への結晶沈着や鉍質沈着、近位尿細管の好酸滴、腎盂の尿路過形成、雌の肺の泡沫細胞の出現であった。

VI 文献

1. 化学工業日報社 (1999)
13599 の化学商品
p.429, 化学工業日報社, 東京
2. 後藤稔、池田正之、原一郎 編 (1977)
産業中毒便覧 (増補版)
pp.1092-1093, 医歯薬出版, 東京
3. Heller, S.R. and Milne, G.W.A. (1978)
EPA/NIH Mass Spectral Data Base Vol.1, p.882
U. S. Government Printing Office, Washington
4. 日本バイオアッセイ研究センター (1995)
グリオキサルのラット及びマウスを用いた経口投与によるがん原性予備 (混水試験) 試験報告書
日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川
5. 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
6. Peto, R., Pike, M.C., Day, N.E., Gray, R.G., Lee, P.N., Parish, S., Peto, J., Richards, S. and Wahrendorf, J. (1980)
Guideline for simple, sensitive significance test for carcinogenic effects in long-term animal experiments.
In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogenes: A Critical Proposal.
IARC Monographs, Suppl. 2, pp.311-426, IARC, Lyon.
7. Imai K., Yoshimura S., Yamaguchi K., Matsui E., Isaka H., Hashimoto K. and Boorman, G.A. (1990)
Effects of dietary restriction on age associated pathologic changes in F344 rats.
Journal of Toxicologic Pathology. 3, pp.209-221

8. Witt, W.M., Sheldon, W.G., and Thurman, J.D. (1991)
Pathological endpoints in dietary restricted rodents-Fischer 344 rats and B₆C₃F₁ mice.
In: L. Fishbein (ed.) Biological Effects of Dietary Restriction.
pp.73-86, Springer-Verlag, New York
9. Seilkop, S.E. (1995)
The effect of body weight on tumor incidence and carcinogenicity testing in B₆C₃F₁ mice and F344 rats.
Fundamental and Applied Toxicology. 24, pp.247-259
10. Ueno H., Segawa T., Hasegawa T., Nakamuro K., Maeda.H., Hiramatu Y., Okada S. and Sayato Y. (1991)
Subchronic oral toxicity of glyoxal via drinking water in rats.
Fundamental and Applied Toxicology. 16, pp.763-772
11. Rowe, V.K. and Wolf, M.A. (1982)
Glycols.
In: Clayton, G.D., Clayton, F.E. (eds.), Patty's Industrial Hygiene and Toxicology.
Third revised edition. Volume 2C. pp.3826-3828.
John Wiley and Sons, New York, NY.
12. Browning, E. (1965)
Toxicity and Metabolism of Industrial Solvent.
pp.478-480, 484-487
Elsevier, Amsterdam