

2-クロロピリジンのラットを用いた強制経口投与による肝中期発がん性試験

株式会社 DIMS 医科学研究所

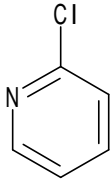
1 被験物質

1.1 名称等

名称	: 2-クロロピリジン
英語名	: 2-Chloropyridine
製造元	: 東京化成工業株式会社
CAS No.	: 109-09-1
ロット番号	: SWMXF
純度	: 99.5%

1.2 構造式及び分子量

構造式:



分子量: 113.55

1.3 物理化学的性状等

外観及び性状	: 無色～ごくうすい黄色で透明な液体
比重	: 1.2
融点	: -46.5°C
沸点	: 166°C
蒸気圧	: 2.18 mmHg (25.0°C)
溶解	: エタノール、ジエチルエーテルに可溶

1.4 製造量

製造量 : 年間約 100 トン (文献 1)

1.5 用途

用途 : ピリチオン (殺菌剤) の製造、ピリプロキシフェンなどの殺虫剤の製造

1.6 許容濃度等

管理濃度	: 未設定
許容濃度 (ばくろ限界値、生物学的ばくろ指標)	
ACGIH	: 未設定
日本産業衛生学会	: 未設定

1.7 遺伝毒性

Salmonella typhimurium/mammalian microsome test において変異原性陽性との報告（文献 2）があり、国内遺伝毒性評価ワーキンググループにおいて、強い遺伝毒性ありに分類されている。また、マウス Lymphoma cell を用いた *In vitro* 遺伝子突然変異試験においても陽性の結果が得られている（文献 3）が、*In vivo* での発がん性試験の報告はない。

2 目的

F344/DuCrjCrj 系ラットを用いた肝中期発がん性試験（伊東法）を用いて、2-クロロピリジンの肝臓に対するプロモーション作用の有無を検索し、その発がん性を予測した。

3 方法

試験は、被験物質投与群 3 群、陰性（媒体）対照群及び陽性対照群の計 5 群の構成で、各群とも 20 匹の F344 雄ラットを使用した。起始物質として、ジエチルニトロソアミン（DEN）を 200 mg/kg の用量で単回腹腔内投与した（以下 DEN 処置と表記）。DEN 処置後、第 3 週目より 6 週間、トウモロコシ油に溶解した被験物質を 0（媒体対照群）、1、3 及び 10 mg/kg/day の用量で毎日 1 回強制経口投与した。陽性対照群にはフェノバルビタールナトリウム（S.PB）を 500 ppm の濃度で基礎飼料中に混じ、自由摂取させた。なお、DEN 処置後、第 3 週経過時に 2/3 肝部分切除術（以後、PH と表記）を行った。投与終了の翌日に全生存動物を安楽死させ、肝臓の前腫瘍性病変である胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巢の数及び面積を計測し、肝臓単位面積当たりの陽性細胞巢の数及び面積を算出して評価した。

4 投与量設定の理由（添付資料参照）

本試験で用いる投与量を設定する目的で、最初に「2-クロロピリジンのラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験（試験番号 14155）」（文献 4）を 0, 100, 150 及び 200 mg/kg/day の投与量で実施した。その結果、100 mg/kg/day 以上を投与した動物は、投与開始翌日に 10% 以上の体重減少及び一般状態の悪化がみられたため切迫屠殺した。

その後、参考データを得るために残りの対照群の動物 5 匹を用いて 0, 1, 3, 10 及び 30 mg/kg/day の用量で各 1 匹に 4 週間投与した結果、一般状態、体重及び剖検時の肉眼的病理学検査では被験物質投与の影響はみられなかったが、肝臓重量及び肝臓相対重量は用量に関連して高値を示し、1, 3, 10 及び 30 mg/kg/day 群の相対重量はそれぞれ対照群（2.868%）の 1.0 倍（2.839%）、1.1 倍（3.002%）、1.2 倍（3.303%）及び 1.4 倍（4.032%）の値を示した。

追加試験として、100 mg/kg/day 投与での再現性の確認及び 100 mg/kg/day と 30 mg/kg/day の間の用量での被験物質の毒性を確認する目的で 50, 75 及び 100 mg/kg/day の投与量で各群 2 匹に 1 週間投与したところ、75 mg/kg/day 以上の投与量では、前述と同様、投与開始翌日に体重減少及び一般状態の悪化がみられたため切迫屠殺したが、50 mg/kg/day を投与した動物は投与開始翌日に体重増加抑制がみられたものの、その後増加に転じ、1 週間投与後の剖検時の肉眼的病理学検査

では著変はみられなかった。しかしながら、肝臓相対重量は 30 mg/kg/day の用量を 4 週間投与した動物より高値を示した。

上記の結果を基に「2-クロロピリジンのラットを用いた強制経口投与による肝中期発がん性試験の用量設定試験（試験番号 14150）」（文献 5）を実施した。DEN を処置した雄性 F344/DuCrj 系ラットにその 2 週間後より前述の反復投与毒性試験で肝臓相対重量がわずかに高値を示した 10 mg/kg/day を最高用量とし、公比 2 で除した 5 mg/kg/day の用量で被験物質を 3 週間反復経口投与し、投与開始 1 週後に PH を実施した。その結果、一般状態では変化はみられず、体重ではいずれの群においても対照群との間に統計学的差異はみられなかったが、肝臓重量及び肝臓相対重量では、10 及び 5 mg/kg/day 群ともに対照群と比較して有意な高値がみられた。

以上の結果から、肝臓重量の変動を基に本試験の投与量は最高用量を 10 mg/kg/day とし、以下公比約 3 で除した 3 及び 1 mg/kg/day を選択した。

5 結果

生存率、一般状態、体重（表 1）、摂餌量では被験物質投与の影響はみられなかった。

肉眼的病理学検査では、10 mg/kg/day 群のみに胃の変色斑がみられ、病理組織学的検査で軽微から軽度の腺胃の出血が有意な高値を示したことから、被験物質投与による影響と考えられた。

肝臓重量（表 2）では、10 及び 3 mg/kg/day 群で絶対重量及び相対重量が、また 1 mg/kg/day 群においても相対重量が対照群と比較して有意な高値を示した。病理組織学的検査では、被験物質投与群でび慢性肝細胞肥大がみられ、その程度も用量に関連して増強する結果が得られたことから、被験物質による肝臓に対する毒性影響が示唆された。しかしながら、免疫組織化学的検査（表 3）では、被験物質投与群と対照群の間に統計学的な差異はみられず、発がん促進作用は検出されなかった。

陽性対照の S.PB 群では、体重及び摂餌量の高値、肝臓の絶対重量及び相対重量の有意な高値がみられ、また免疫組織化学的検査では、GST-P 陽性細胞巢の個数及び面積共に統計学的に有意な高値を示し、病理組織学的検査においても小葉中心性の肝細胞肥大、脂肪変性といった S.PB 投与に特徴的な病変が観察されたことから、S.PB による肝発がんプロモーション作用が明確に検出され、本試験の妥当性が示された。

6 結論

2-クロロピリジンは本試験条件下において強い肝毒性を有する結果が得られたものの、肝臓の前がん病変発生に対しては、明らかな修飾作用は示さなかった。

7 文献

- 1) シーエムシー編集部、ファインケミカル、24、36、1995.

- 2) Claxton L. D., Dearfield K. L., Spanggord R. J., Riccio, E. S., Mortelmans K. Comparative mutagenicity of halogenated pyridines in the Salmonella typhimurium/mammalian microsome test. Mutat Res., 176, 185-198, 1987.
- 3) Dearfield K. L., Harrington-Brock K., Doerr C. L., Parker L., Moore, M. M. Genotoxicity of three pyridine compounds to L5178Y mouse lymphoma cells. Mutat Res., 301, 57-63, 1993.
- 4) 河部真弓「2-クロロピリジンのラットを用いた4週間反復投与毒性試験(試験番号14155)」株式会社DIMS 医科学研究所、2014.
- 5) 河部真弓「2-クロロピリジンのラットを用いた強制経口投与による肝中期発がん性試験の用量設定試験(試験番号14150)」株式会社DIMS 医科学研究所、2014.

表1 2-クロロピリジンの肝中期発がん性試験における体重推移

群	投与量 (mg/kg/day)	week	体重 (g)								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0		117.7	125.9	168.6	196.6	199.8	222.5	240.5	254.0	264.1
2	1		117.8	125.1	168.0	195.5	200.3	223.9	242.6	255.3	266.5
3	3		117.8	124.6	169.0	197.6	201.6	225.3	244.7	258.6	271.5
4	10		117.4	125.3	169.5	198.7	199.1	226.4	246.1	260.6	273.7
5	S.PB 500 ppm		117.8	125.4	169.8	206.2**	210.4**	238.2**	256.6**	270.6**	280.1**

** : Significantly different from control group at P<0.01.

表2 2-クロロピリジンの肝中期発がん性試験における肝臓重量結果

群	投与量 (mg/kg/day)	検索 匹数	剖検時体重 ^a (g)	肝臓絶対重量 (g)	肝臓相対重量 (%)
1	0	20	253. 6 ± 18.2	5.932 8 ± 0.4979	2.338 4 ± 0.0748
2	1	20	254. 9 ± 13.4	6.252 6 ± 0.3904	2.453 0 ± *
3	3	20	259. 3 ± 11.7	6.652 1 ± *	2.562 7 ± *
4	10	19	260. 9 ± 13.2	7.770 0 ± *	2.977 2 ± *
5	S.PB 500 ppm	20	264. 7 ± 10.1*	8.527 4 ± *	3.222 2 ± *

a : The value presented were obtained after the animals were fasted overnight.

*, ** : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

表3 2-クロロピリジンの肝中期発がん性試験における免疫組織化学的検査結果

群	投与量 (mg/kg/day)	検索 匹数	GST-P 陽性細胞巢	
			陽性細胞巢数 (No./cm ²)	陽性細胞巢面積 (mm ² /cm ²)
1	0	20	5.507 ± 1.638	0.428 ± 0.192
2	1	20	5.642 ± 1.684	0.425 ± 0.118
3	3	20	5.505 ± 1.939	0.462 ± 0.243
4	10	19	4.943 ± 2.070	0.317 ± 0.145
5	S.PB 500 ppm	20	7.320 ± 2.315**	0.700 ± 0.452*

*, ** : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

添付資料：2-クロロピリジン用量設定試験概要

1.4 週間反復投与毒性試験（試験番号：14155）

投与量の設定根拠：LD50 が 342 mg/kg/day であるとの情報より設定した。

投与量 (mg/kg/day)	動物数	一般状態	体重	肉眼的病理学検査
0	5	異常なし	異常なし	異常なし
100	5	初回投与の1時間後頃から眼瞼下垂（両眼）及び流涙、投与翌日には蒼白、立毛、体温低下、自発運動消失がみられたことにより全例切迫屠殺した。	初回投与翌日に10%以上の体重減少がみられた。	肝臓の変色、肥大、出血痕：各群全例 前胃の出血痕：各群 4~5 例 腺胃の出血痕：100 mg/kg 群 2 例、150 mg/kg 群 4 例、200 mg/kg 群 5 例 その他、腸管の黒色物貯留、膀胱の赤色尿、黒色物貯留、脾臓の小型化、肺の出血痕、腎臓の肥大及び変色、胸壁の出血痕が散見された。
150	5			
200	5			

2.4 週間反復投与毒性試験 再試験（試験番号：14155）

上記の対照群 5 匹の動物を用い、各群 1 匹として 0, 1, 3, 10 及び 30 mg/kg/day の用量で 4 週間反復投与した。

投与量 (mg/kg/day)	一般状態	体重	肉眼的病理学検査	肝臓重量 (g)	肝臓相対重量 (%)	相対重量の対照群に対する増加比
0	異常なし	異常なし	異常なし	6.626	2.868	-
1	異常なし	異常なし	異常なし	6.701	2.839	1.0 倍
3	異常なし	異常なし	異常なし	6.875	3.002	1.1 倍
10	異常なし	異常なし	異常なし	7.795	3.303	1.2 倍
30	異常なし	異常なし	異常なし	8.911	4.032	1.4 倍

3.1 週間反復投与毒性試験 追加試験（試験番号：14155）

別試験の余剰動物 6 匹を用い、50, 75 及び 100 mg/kg/day の投与量で各群 2 匹に 1 週間反復投与し、100 mg/kg/day での再現性の確認と 30 mg/kg/day と 100 mg/kg/day の間の用量での毒性を確認した。

投与量 (mg/kg/day)	動物数	一般状態	体重	肉眼的病理学検査	肝臓重量 (g)	肝臓相対重量 (%)
50	2	異常なし	初回投与翌日に 体重増加抑制、 その後回復し た。	異常なし	6.426	4.601 ^a
75	2	眼瞼下垂（両眼）、立毛、 蒼白、自発運動低下あるい は消失がみられ投与 2 日 目に全例切迫屠殺した。	初回投与翌日に 10%以上の体重 減少がみられ た。	肝臓の変色、肥大、出血痕、変色斑 前胃の出血痕 腺胃の出血痕 腸管の黄色化 膀胱の黄色尿貯留など	-	-
100	2				-	-

a: 30 mg/kg/day を 4 週間投与した結果より高値

4. 中期肝発がん性試験のための用量設定試験（試験番号：14150）

投与量 (mg/kg/day)	動物数	一般状態	体重	肉眼的病理学検査	肝臓重量 (g)	肝臓相対重量 (%)
0	6	異常なし	異常なし	異常なし	5.147	2.538
5	6	異常なし	異常なし	異常なし	5.773*	2.865**
10	6	異常なし	異常なし	1 例：小腸の変色域	6.107**	3.011**

*, **: Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.