

2-ビニル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報告書

試験番号：0826

CAS No. 100-69-6

2014年3月28日

中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター

目次

標題	i
試験目的	i
試験法	i
GLP 対応	i
動物福祉	i
試験委託者	i
試験施設及び運営管理者	ii
試験日程	ii
試験関係者一覧	ii
試資料の保管	iii
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	iii
陳述書	iv
信頼性保証証明書	v
本文	vi
TABLES	1~7	
FIGURES	1~3	
PHOTOGRAPHS	1~3	
APPENDICES	1-1~3-4	

標題

2-ビニル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

試験目的

2段階発がんモデルによるラット肝中期発がん性試験（伊東法）を用いて、2-ビニルピリジンの肝発がん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。

試験法

本試験は、「ラット肝中期発がん性試験による調査の基準」（平成25年7月8日厚生労働省発がん性評価ワーキンググループ合意事項）に準拠して実施した。

GLP 対応

本試験は、「労働安全衛生規則第34条の3第2項の規定に基づく試験施設等が具備すべき基準（安衛法GLP）」（昭和63年9月1日労働省告示第76号、最終改正平成12年12月25日労働省告示第120号）に準拠して実施した。

動物福祉

本試験は、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年4月28日環境省告示第88号、最終改正平成25年8月30日環境省告示第84号）、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成18年6月1日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程」（平成24年4月25日規程第17号、最終改正平成25年3月28日規程第12号）を遵守した。また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で審査、承認された（承認番号0056）。

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
東京都千代田区霞が関1-2-2

2-ビニル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報告書

試験番号：0826

本文

本文目次

項目	頁
1. 要約	1
2. 試験材料	
2-1. 被験物質	
2-1-1. 被験物質の名称等	3
2-1-2. 被験物質の構造式及び分子量	3
2-1-3. 被験物質の物理化学的性状等	3
2-1-4. 被験物質の使用ロット等	3
2-1-5. 被験物質の特性・同一性、安定性	
2-1-5-1. 被験物質の特性・同一性	4
2-1-5-2. 被験物質の安定性	4
2-2. 媒体	
2-2-1. 媒体の名称等	4
2-3. 陽性対照物質	
2-3-1. 陽性対照物質の名称等	4
2-3-2. 陽性対照物質の特性・同一性、安定性	
2-3-2-1. 陽性対照物質の特性・同一性、安定性	5
2-3-2-2. 陽性対照物質の特性・同一性、安定性	5
2-4. 起始物質	
2-4-1. 起始物質の名称等	5
2-4-2. 起始物質の特性・同一性、安定性	
2-4-2-1. 起始物質の特性・同一性	5
2-4-2-2. 起始物質の安定性	5
2-5. 試験動物	6
3. 試験方法	
3-1. 試験の概略	7
3-2. 投与	
3-2-1. 被験物質	
3-2-1-1. 被験物質の投与経路	7
3-2-1-2. 被験物質の投与量及び投与方法	7
3-2-1-3. 被験物質の投与方法及び投与量の設定理由	7
3-2-1-4. 被験物質投与液の調製	8
3-2-1-5. 被験物質投与液中の被験物質濃度及び均一性	8
3-2-1-6. 被験物質投与液中の被験物質の安定性	9

本文目次(続き)

項 目	頁
3-2-2. 陽性対照物質	
3-2-2-1. 陽性対照物質の投与量及び投与方法	9
3-2-2-2. 陽性対照物質投与液の調製	9
3-2-2-3. 陽性対照物質投与液中の陽性対照物質濃度及び均一性	9
3-2-2-4. 陽性対照物質投与液中の陽性対照物質の安定性	10
3-2-3. 起始物質(イニシエーター)	
3-2-3-1. 起始物質(DEN)の投与量及び投与方法	10
3-2-3-2. 起始物質投与液の調製	10
3-2-2-3. 起始物質投与液中の起始物質濃度及び均一性	10
3-3. 動物管理	
3-3-1. 群の構成と動物数	11
3-3-2. 群分け方法	11
3-3-3. 動物の個体識別	11
3-3-4. 使用飼育室・手術室、ならびに他試験及び異種動物との区別	11
3-3-5. 飼育条件	12
3-4. 部分肝切除手術(PH)	12
3-5. 観察・検査項目及び方法	
3-5-1. 動物の生死および一般状態の観察	13
3-5-2. 体重測定	13
3-5-3. 摂餌量測定	13
3-5-4. 病理学的検査	13
3-6. 数値処理と統計方法	
3-6-1. 数値の取扱と表示	14
3-6-2. 統計処理	14
4. 試験結果	
4-1. 生死状況及び一般状態	15
4-2. 体重	15
4-3. 摂餌量	15
4-4. 病理学的検査	
4-4-1. 剖検	15
4-4-2. 臓器重量	16
4-4-3. 病理組織学的検査	16
5. 考察及びまとめ	17
6. 結論	18
7. 文献	19
8. 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 及び試験計画に従わなかつたこと	21

1. 要約

2段階発がんモデルによるラット肝中期発がん性試験（伊東法）を用いて、2-ビニルピリジンの肝発がん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。

本試験は、被験物質投与群4群、陰性（媒体）対照群及び陽性対照群の計6群の構成で、各群とも20匹のF344雄ラットを用いた。起始物質としてジエチルニトロソアミン（DEN）200 mg/kgを単回腹腔内投与した（以降、DEN処置と表記）。DEN処置後、第3週目より6週間、オリブ油に溶解した被験物質を0（媒体対照群）、15、30、60、120 mg/kgの用量で、また陽性対照群として生理食塩水に溶解したフェノバルビタールナトリウムを25 mg/kgの用量で毎日1回、強制経口投与した。なお、DEN処置後、第3週目の終わりに肝臓の2/3切除手術（以後、PHと表記）を行った。投与終了日の翌日に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）陽性細胞巢の発生を検査した。

被験物質による影響として、120 mg/kg投与群で投与後に流涎が散見され、また摂餌量の増加が認められた。被験物質に起因する動物の死亡は認められなかった。肝臓の相対重量は60及び120 mg/kg投与群で有意な増加が認められた。肝臓のGST-P陽性細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積は、媒体対照群と比較して低値傾向を示したが、統計学的な有意差は認められず、投与による肝臓の組織学的変化も認められなかった。陽性対照群におけるGST-P陽性細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積は、いずれも媒体対照群と比較して有意な高値を示した。

以上、2-ビニルピリジンは、ラット肝臓における発がんプロモーション作用を示さず、その発がん性は陰性と結論した。

付表 1 2-ビニルピリジンの肝中期発がん性試験結果 (肝臓の GST-P 陽性細胞巣)

投与量	評価 動物数 (匹)	GST-P 陽性細胞巣	
		陽性細胞巣数 (細胞巣数 / cm ²)	陽性細胞巣面積 (mm ² / cm ²)
0 mg/kg (媒体対照群)	18	3.57±0.83	0.32±0.13
15 mg/kg	16	3.28±0.90	0.25±0.08
30 mg/kg	19	3.21±1.16	0.26±0.12
60 mg/kg	19	2.78±1.18	0.21±0.11
120 mg/kg	16	3.18±1.29	0.26±0.17
フェノバルビタールナトリウム 25 mg/kg (陽性対照群)	13	6.94±1.52**	0.50±0.12##

** : p 0.01 で有意 (Aspin-Welch 検定)

: p 0.01 で有意 (Student t 検定)

2. 試験材料

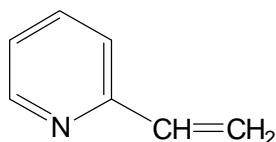
2-1. 被験物質

2-1-1. 被験物質の名称等

名 称 : 2-ビニルピリジン (2-VP)
 2-Vinylpyridine
 別 名 : 2-エテニルピリジン
 CAS No. : 100-69-6

2-1-2. 被験物質の構造式及び分子量 (文献1)

構 造 式 :



分 子 量 : 105.14

2-1-3. 被験物質の物理化学的性状等 (文献1)

性 状 : 茶色(淡黄色)液体
 比 重 : 0.9983 (20)
 融 点 : -30 以下
 沸 点 : 159~160
 蒸 気 圧 : 1.33 kPa (44.5)
 溶 解 性 : メタノール、ヘキサン、クロロホルムに可溶
 水に 27.5 g/L (20) 溶解
 保 管 条 件 : 冷凍保管 (-0 以下)

2-1-4. 被験物質の使用ロット等

名 称 : 2-ビニルピリジン
 製 造 元 : 東京化成工業(株)
 規 格 : 東京化成 1 級
 純 度 : 99.0 % (東京化成工業(株)検査成績データ)
 ロ ッ ト 番 号 : UOZZO

2-1-5. 被験物質の特性・同一性、安定性

2-1-5-1. 特性・同一性

被験物質の同一性は、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、文献値（文献 2）と比較することにより確認した。

その結果、物質の赤外吸収スペクトルは、文献値（文献 2）と同じ波数にピークが認められ、被験物質は 2-ビニルピリジンであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示した。

2-1-5-2. 安定性

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後に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、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、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ったことを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-2 に示した。

2-2. 媒体

2-2-1. 媒体の名称等

名 称	:	オリーブ油
規 格	:	日本薬局方
製 造 元	:	丸石製薬（株）
ロ ッ ト 番 号	:	37041
保 管 条 件	:	室温かつ遮光

2-3. 陽性対照物質

2-3-1. 陽性対照物質の名称等

名 称	:	フェノバルビタールナトリウム（PB） Phenobarbital Sodium Salt
CAS No.	:	57-30-7
製 造 元	:	東京化成工業(株)
規 格	:	東京化成 1 級
純 度	:	93.4 %（東京化成工業(株)試験成績書データ）
ロ ッ ト 番 号	:	GG01
保 管 条 件	:	室温かつ遮光

2-3-2. 陽性対照物質の特性・同一性、安定性

2-3-2-1. 特性・同一性

陽性対照物質の同一性は、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、文献値（文献 3）と比較することにより確認した。

その結果、物質の赤外吸収スペクトルは、文献値（文献 3）と同じ波数にピークが認められ、物質はフェノバルビタールナトリウムであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 2-1 に示した。

2-3-2-2. 安定性

陽性対照物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後に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、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、使用開始前（試験番号 0827 使用開始前）と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の陽性対照物質は安定であったことを確認した。

それらの結果は APPENDIX 2-2 に示した。

2-4. 起始物質（イニシエーター）

2-4-1. 起始物質の名称等

名 称	:	<i>N</i> -ニトロソジエチルアミン (ジエチルニトロソアミン、 <i>N</i> -Nitrosodiethylamine、DEN)
CAS No.	:	55-18-5
製 造 元	:	東京化成工業(株)
規 格	:	東京化成 1 級
純 度	:	99.9 % (東京化成工業(株)試験成績書データ)
ロット番号	:	FBMVM
保 管 条 件	:	冷蔵(約 4)かつ遮光

2-4-2. 起始物質の特性・同一性、安定性

2-4-2-1. 特性・同一性

起始物質の同一性は、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、文献値（文献 2）と比較することにより確認した。

その結果、物質の赤外吸収スペクトルは、文献値（文献 2）と同じ波数にピークが認められ、物質は *N*-ニトロソジエチルアミンであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 3-1 に示した。

2-4-2-2. 安定性

起始物質の安定性は、使用開始前（試験番号 0827 使用開始前）及び使用終了後に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、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の起始物質は安定であったことを確認した。

それらの結果は APPENDIX 3-2 に示した。

2-5. 試験動物

5 週齢の F344/DuCrIjCrIj ラット（SPF）の雄 132 匹を、日本チャールス・リバー(株)（厚木飼育センター）より入手し、検疫と馴化を兼ねて 8 日間（2013 年 10 月 15 日～2013 年 10 月 22 日）飼育した後、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 120 匹（群分け時体重範囲、115～131g）を選別し、試験に用いた。

なお、試験に F344/DuCrIjCrIj ラット(SPF)を選択した理由は、遺伝的に安定していること、過去に多くの肝中期発がん性試験に用いたデータがあること、また、当センターのバクテリウムデータの蓄積があることによる。

3. 試験方法

3-1. 試験の概略

起始物質 (DEN) を腹腔内に単回投与後、第 3 週目より 6 週間、被験物質または陽性対照物質を毎日、強制経口投与した。なお、第 3 週目の終わりに肝臓の 2/3 切除 (PH: partial hepatectomy) を実施した。試験の概略を FIGURE 1 に示した。

投与終了日の翌日に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) 陽性細胞巢の発生を検査した。

3-2. 投与

3-2-1. 被験物質

3-2-1-1 被験物質の投与経路

投与経路は強制経口投与とした。

3-2-1-2. 被験物質の投与量及び投与方法

被験物質は、ディスポーザブル注射筒及びフレキシブル経口ゾンデを用いて、1 日 1 回、強制経口投与した。投与量は 0 (媒体対照、オリブ油)、15、30、60 及び 120 mg/kg とした。投与液量は 5 mL/kg とし、直近の体重に基づいて個体別に算出した。

投与は、起始物質の投与後 3 週目から 6 週間 (2013 年 11 月 6 日 ~ 2013 年 12 月 17 日)、毎日、13 時から 16 時の時間帯に行った。但し、PH 実施日に投与は行わなかった。

3-2-1-3. 被験物質の投与方法及び投与量の設定理由

投与方法は、被験物質の物理化学的性質及びヒトが曝露される経路を考慮して経口投与とし、また、体重当りの被験物質の投与量を一定にするために強制経口投与方法を選択した。

投与量は、2-ビニルピリジンの SD ラットを用いた強制経口投与による 28 日間及び 92 日間反復投与毒性試験報告 (文献 4、5)、及び当センターにおいて F344 ラットの雄を用いて実施した用量設定試験の結果を参考に決定した。

28 日間試験 (文献 4) では、雌雄の SD ラットに 2-ビニルピリジンを 12.5、50 及び 200 mg/kg の用量で 28 日間強制経口投与した。その結果、投与による死亡は認められず、200 mg/kg 群の雄に体重増加の抑制 (対照群の約 88%) が認められた。50 mg/kg 群と 200 mg/kg 群の雌雄には、2-ビニルピリジンの腐食性 (刺激性) に起因する胃粘膜傷害がみられ、200 mg/kg 群では胃粘膜の浮腫や糜爛も観察された。肝臓への影響は、200 mg/kg 群の雌の相対重量が増加した以外に認められなかった。

92 日間試験 (文献 5) では、雌雄の SD ラットに 2-ビニルピリジンを 20、60 及び 180 mg/kg の用量で 92 日間強制経口投与した結果、180 mg/kg 群の雄に体重増加の抑制が認められた。

60 mg/kg 群と 180 mg/kg 群には、2-ビニルピリジンの腐食性（刺激性）に起因する胃粘膜傷害がみられた。肝臓への影響は、60 mg/kg 群と 180 mg/kg 群の雌雄の相対重量が増加した以外は認められなかった。

用量設定試験では、F344 ラットの雄を用い起始物質投与及び PH を実施した群と実施しない群を設定し、上記 2 試験報告（文献 4、5）を参考に、2-ビニルピリジンを 60 及び 180 mg/kg の用量で計 6 週間の強制経口投与を実施した。起始物質投与後 3 週目からの 180 mg/kg の 2-ビニルピリジン投与では、体重減少や抑制がみられ、起始物質投与と PH を実施した動物は、PH 後の投与により動物の状態が悪くなり投与を中止した。60 mg/kg を投与した動物には、2-ビニルピリジン投与による状態異常は認められなかった。

以上の試験報告及び用量設定試験により、180 mg/kg の用量では 2-ビニルピリジンの刺激性による胃粘膜への障害が強く、それは起始物質投与と PH により動物の体重低下及び状態異常を重症化させると推測された。また、60 mg/kg では体重や一般状態に影響がなく、胃粘膜への障害は弱く、起始物質投与と PH により影響を受けない用量と推測された。したがって、本試験では 180 mg/kg の用量は高く、60 mg/kg の用量は低いと判断し、180 mg/kg と 60 mg/kg との間をとり、120 mg/kg を最高投与量として、以下、60、30 及び 15 mg/kg を設定した。

3-2-1-4. 被験物質投与液の調製

被験物質を正確に秤量し、オリーブ油を加え、攪拌により溶解して 24 mg/mL の最高濃度の投与液を調製した。その他の 12、6 及び 3 mg/mL 濃度の投与液は、段階希釈法により調製した。被験物質（2-ビニルピリジン）は、水と比較してオリーブ油のほうが、溶液中での安定性が良好であることから、オリーブ油を溶媒として選択した。

調製頻度は、7 日に 1 回調製し、投与液は投与日まで冷蔵庫（約 4℃、遮光）に保管した。

3-2-1-5. 被験物質投与液中の被験物質濃度及び均一性

被験物質調製液中の被験物質の濃度及び均一性は、投与開始前に、投与液とは別に調製した 3、6、12 及び 24 mg/mL 調製液を調製容器内から、それぞれ 7 点サンプリングし、被験物質濃度を高速液体クロマトグラム（(株)島津製作所、LC-10）用いて測定し、確認した。その結果、調製濃度は、設定濃度に対して 98.3%から 100%の範囲にあり、変動係数（CV 値）も 0.418 から 1.99%の範囲を示し、設定濃度に対して正確に調製されていることを確認した。

その結果を、濃度については APPENDIX 1-3、均一性については、APPENDIX 1-4 に示した。

3-2-1-6. 被験物質投与液中の被験物質の安定性

被験物質調製液中における被験物質の安定性は、投与開始前に、投与液とは別に調製した 3 mg/mL 及び 24 mg/mL 調製液を冷蔵（約 4℃）かつ遮光の条件下で 8 日間保管したものについて、調製時と保管 8 日目の調製液をそれぞれ調製容器内から 7 点サンプリングし、被験物質濃度を高速液体クロマトグラム（(株)島津製作所、LC-10）を用いて測定し、確認した。その結果、3 mg/mL 及び 24 mg/mL 被験物質調製液の測定濃度は、調製時はそれぞれ 2.99 mg/mL 及び 23.9 mg/mL、保管後は 2.99 mg/mL 及び 23.8 mg/mL であり、8 日間安定であることを確認した。

その結果を、APPENDIX 1-5 に示した。

3-2-2. 陽性対照物質

3-2-2-1. 陽性対照物質の投与量及び投与方法

陽性対照物質は、ディスポーザブル注射筒及びフレキシブル経口ゾンデを用いて、1 日 1 回、強制経口投与した。投与量は 25 mg/kg、投与液量は 5 mL/kg とし、直近の体重に基づいて個体別に算出した。

投与は、被験物質と同じく起始物質投与後 3 週目から 6 週間（2013 年 11 月 6 日～2013 年 12 月 17 日）、毎日、13 時から 16 時の時間帯に行った。但し、PH 実施日に投与は行わなかった。

3-2-2-2. 陽性対照物質投与液の調製

陽性対照物質を正確に秤量し、注射用水（日本薬局方、(株)大塚製薬工場、ロット番号 0F98N）を加え、攪拌により溶解して 5 mg/mL に調製した。

調製頻度は、7 日に 1 回調製し、投与液は投与日まで冷蔵庫（約 4℃、遮光）に保管した。

3-2-2-3. 陽性対照物質投与液中の陽性対照物質濃度及び均一性

陽性対照物質調製液中の陽性対照物質の濃度及び均一性は、投与開始前に、投与液とは別に調製した 5 mg/mL 調製液を調製容器内から 7 点サンプリングし、高速液体クロマトグラフ（(株)島津製作所、LC-10）を用いて測定し、確認した。

その結果、調製濃度は、設定濃度に対して 96.0%であり、また CV 値も 0.716%を示し、設定濃度に対して正確に調製されていることを確認した。

その結果を、濃度については APPENDIX 2-3、均一性については、APPENDIX 2-4 に示した。

3-2-2-4. 陽性対照物質投与液中の陽性対照物質の安定性

陽性対照物質調製液中における陽性対照物質の安定性は、5 mg/mL 調製液を冷蔵（約 4 ）かつ遮光の条件下で 8 日間保管したものについて、調製時と保管 8 日目の調製液をそれぞれ調製容器内から 7 点サンプリングし、陽性対照物質濃度を高速液体クロマトグラフ（(株)島津製作所、LC-10）を用いて測定し、確認した。その結果、測定濃度は、調製時及び保管後それぞれ 4.80 mg/mL、4.89 mg/mL であり、8 日間安定であることを確認した。

その結果を、APPENDIX 2-5 に示した。

3-2-3. 起始物質

3-2-3-1 起始物質（DEN）の投与量及び投与方法

起始物質は、25G 注射針を装着したディスプレイブル注射筒を用いて、単回腹腔内投与した。投与量は 200 mg/kg、投与液量は 5 mL/kg とし、直近の体重に基づいて個体別に算出した。

起始物質の投与は、群分け日の翌日（2013 年 10 月 23 日）の 13 時から 15 時にかけて実施した。

3-2-3-2. 起始物質投与液の調製

起始物質を正確に秤量し、生理食塩液（日本薬局方、(株)大塚製薬工場、ロット番号 K3C97）を加え、攪拌により溶解して 40 mg/mL に調製した。投与液は用時調製とし、投与日の午前中に実施した。

3-2-3-3. 起始物質投与液中の起始物質濃度及び均一性

起始物質投与液中の起始物質の濃度及び均一性は、投与開始前に、投与液とは別に調製した 40 mg/mL 調製液を調製容器内から 7 点サンプリングし、ガスクロマトグラフ（アジレントテクノロジー、5890A）を用いて測定し、確認した。

その結果、調製濃度は、設定濃度に対して 108% であり、また CV 値も 1.85% を示し、設定濃度に対して正確に調製されていることを確認した。

その結果を、濃度については APPENDIX 3-3、均一性については、APPENDIX 3-4 に示した。

3-3. 動物管理

3-3-1. 群の構成と動物数

媒体対照群 1 群、被験物質投与群 4 群及び陽性対照群 1 群の計 6 群を設け、1 群当たり 20 匹の動物を用いた。

各群の使用動物数と動物番号

群 名 称	動物数 (動物番号)
媒体対照群	20 匹 (1001 ~ 1020)
15 mg/kg 群	20 匹 (1101 ~ 1120)
30 mg/kg 群	20 匹 (1201 ~ 1220)
60 mg/kg 群	20 匹 (1301 ~ 1320)
120 mg/kg 群	20 匹 (1401 ~ 1420)
陽性対照群	20 匹 (1501 ~ 1520)

3-3-2. 群分け方法

検疫・馴化期間を通して一般状態及び体重の推移に異常を認めなかった動物から、起始物質 (DEN) 投与前日 (2013 年 10 月 22 日) に体重の中央値に近い 120 匹を選定した。群分けは、これらの選定し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で、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 6)。

3-3-3. 動物の個体識別

動物は、検疫・馴化期間中は動物導入日に尾に油性マーカーによる色素塗布をすることで識別し、以降は、群分け時に耳パンチをすることで個体識別した。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

3-3-4. 使用飼育室・手術室、ならびに他試験及び異種動物との区別

動物はバリア区域内の独立した飼育室 (208 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。

なお、PH は、同じバリア区域内の手術室 (211 室) で実施した。

3-3-5. 飼育条件

(1) 飼育環境

動物は、飼育期間を通して以下の環境で飼育した。飼育室の温湿度は実測値（平均値 ± 標準偏差）及び（最小値～最大値）で示した。飼育室内の環境は、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 : 22.9±0.3 （最小値 22.4～最大値 24.5 ）

湿度 : 56±2% （最小値 48～最大値 77%）

明暗サイクル : 12 時間点灯（8:00～20:00）/ 12 時間消灯（20:00～8:00）

換気回数 : 15～17 回/時

ケージへの動物の収容方法 : 個別飼育

ケージの材質・形状・寸法等 : ステンレス製 2 連網ケージ

(170(W)×294(D)×176(H) mm/匹)

飼育器材（ラック、ケージ、餌箱、給水ノズル、作業台車、トレー等）は、オートクレーブを用いて滅菌（約 120℃、15 分以上）したものをを用いた。

(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) 千葉工場製造の CRF-1 固型（30kGy- 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。

試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物については、オリエンタル酵母工業(株)から分析データを入手し、その記録は保管した。

(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）をフィルターを通過した後、紫外線照射し、自動給水ノズルから自由摂取させた。

飲水の水質については、試験施設として 3 ヶ月ごとに実施している水質検査（(財)食品薬品安全センター秦野研究所に依頼）で、建築物衛生法施行規則第 4 条に基づく水質基準に適合していることを確認し、その記録は保管した。

3-4. 部分肝切除手術（PH）

手術室においてイソフルランによる麻酔下で、肝臓の約 2/3（中央葉と左葉）を切除する手術を全動物に行った。なお、手術に先立って、全動物の胸部から腹部にかけて、バリカンを用いて毛刈りを行った。

部分肝切除手術は、起始物質投与後、第 3 週目の終わり（2013 年 11 月 13 日）の 9 時から 13 時の間に実施した。手術の終了した動物は、麻酔からの覚醒を確認後、速やかに手術室から飼育室へ戻した。

3-5. 観察・検査項目及び方法

3-5-1. 動物の生死及び一般状態の観察

投与日（起始物質投与日、被験物質投与日）は、全動物について、投与前及び投与後に生死及び一般状態を観察した。投与の無い日は、全動物について、午前中に1回、生死及び一般状態を観察した。

3-5-2. 体重測定

全動物について、週に1回、午前中に体重を測定した。さらに、PH後1日及び3日にも体重を測定した。

3-5-3. 摂餌量測定

全動物について、週に1回、給餌量及び残餌量を測定し、1匹当たりの1日の摂餌量を算出した。

3-5-4. 病理学的検査

(1) 剖検

定期解剖時まで生存した全動物について、イソフルラン麻酔下で腹大動脈切断により放血して安楽死させた後、剖検し肉眼的に観察を行った。

(2) 肝臓重量

定期解剖動物について、肝臓の湿重量（実重量）を測定した。また、実重量の搬出時体重に対する百分率（相対重量）を算出した。

(3) 臓器の採取固定

剖検した動物は、肝臓を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。脾臓、胃及び腎臓については、摘出後10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定し保管した。

(4) 肝臓の免疫組織化学的検査

定期解剖動物について、固定・保存した肝臓（右上葉、右下葉及び尾状葉）を切り出し、パラフィン包埋、薄切後、GST-Pの免疫組織学的染色を行った。肝臓組織の測定総面積並びにGST-P陽性細胞巢の個数及び面積を病理標本画像解析装置（オリンパス株式会社、VS120；画像解析ソフトウェア、Visiopharm A/S, tissuemorphDP™）を用

いて計測し、肝臓切片 1 cm² 当たりの GST-P 陽性細胞巢（直径 0.2 mm 以上）の個数及び総面積を算出した。

肝臓の組織切片は、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理組織学的検査を実施した。

3-6. 数値処理と統計方法

3-6-1. 数値の取扱いと表示

各数値データは、測定機器の精度に合わせて表示した。

体重は、g を単位とし、整数値の 1 の位まで測定し、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。

肝臓の実重量は、g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。相対重量は、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。

GST-P 陽性細胞巢の個数及び面積は、1 匹当たりの GST-P 陽性細胞巢の個数（個/cm²）及び面積（mm²/cm²）を算出し、小数点以下第 3 位を四捨五入して小数点以下第 2 位までを表示した。

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

3-6-2. 統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より PH の不成立等の理由で外された動物数を減じた動物数とした。

体重、摂餌量、臓器重量の測定値及び肝臓の GST-P 陽性細胞巢の個数と面積は、被験物質投与群においては媒体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。各検定は 5% の有意水準で両側検定を行い、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（文献 7）。

陽性対照群と媒体対照群の平均値の有意差検定は、まず F 検定を用い、等分散である場合は Student の t 検定（片側）を行い、等分散でない場合は Aspin-Welch 検定（片側）を行った（文献 7）。

4. 試験結果

4-1. 生死状況及び一般状態

各群における一般状態の観察結果を TABLE 1 に示した。

生死状況は、投与又は横隔膜ヘルニアに伴う PH の不成立により、0、15、30、60、120 mg/kg 投与群及び陽性対照群で、それぞれ 2、3、1、1、4 及び 6 匹死亡した。また定期解剖の剖検において 15 mg/kg 投与群及び陽性対照群で各 1 匹に PH の失敗による横隔膜穿孔又は内臓癒着を示す動物を認めた。そのため当該動物を有効動物から除外した。従って、最終的な有効動物数は、0、15、30、60、120 mg/kg 投与群及び陽性対照群で、それぞれ 18、16、19、19、16 及び 13 匹であった。

一般状態については、PH 後に全ての群で黄色尿及び外陰汚染が散見されたが、PH 後 10 日までに回復が認められた。また、被験物質 60 及び 120 mg/kg 投与群で投与後に流涎が散見された。

4-2. 体重

各群における体重推移の結果を TABLE 2 及び FIGURE 2 に示した。

60 mg/kg 投与群では被験物質投与開始後 4 週目より、また 120 mg/kg 投与群では 2 週目より媒体対照群と比較して有意な体重増加の抑制が認められた。各被験物質投与群の最終体重は、媒体対照群と比較して 15、30、60 及び 120 mg/kg 投与群でそれぞれ 98、97、96、89%であった。また陽性対照群は、102%であった。

4-3 摂餌量

各群における摂餌量の結果を TABLE 3 及び FIGURE 3 に示した。

120 mg/kg 投与群において、被験物質投与後 4 週目より、媒体対照群と比較して有意な摂餌量の高値が認められた。被験物質投与最終週の各投与群の摂餌量は、媒体対照群と比較して 15、30、60 及び 120 mg/kg 投与群でそれぞれ 99、98、101、110%であった。また陽性対照群は、投与 1 週目より、有意な摂餌量の高値が認められ、最終週では媒体対照群と比較して 137%であった。

4-4. 病理学的検査

4-4-1. 剖検

各群における剖検の結果を TABLE 4 に示した。

全内臓諸器官の剖検結果については、所見は見られなかった。

4-4-2. 臓器重量

各群における肝臓の実重量及び相対重量の結果を TABLE 5 に示した。

実重量は、被験物質投与群は用量依存的に増加傾向を示したが、統計学的に有意な高値は認められなかった。また相対重量は、60 及び 120 mg/kg 投与群で統計学的に有意な高値を示した。

また陽性対照群は、実重量、相対重量ともに媒体対照群と比較して統計学的に有意な高値を示した。

4-4-3. 病理組織学的検査

(1) 肝臓の免疫組織化学的検査

各群における肝臓の GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数 (個/cm²) 及び面積 (mm²/cm²) を TABLE 6 に示した。

被験物質投与群における肝臓の GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積は、媒体対照群と比較して低値傾向を示したが、統計学的な有意差は認められなかった。陽性対照群における GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積は、それぞれ媒体対照群と比較して有意な高値を示した。

(2) 病理組織学的検査

各群における肝臓の病理組織学的検査の結果を TABLE 7 に示した。

被験物質投与群では、投与の影響と思われる病理組織学的変化は認められなかった。陽性対照群では、小葉中心性の肝細胞肥大が媒体対照群と比較して有意に増加した。なお、15 mg/kg 投与群において、好酸性小増殖巢の減少が認められたが、投与量に対応した変化ではなかった。

5. 考察及びまとめ

2段階発がんモデルによる肝中期発がん性試験（伊東法）を用いて、2-ビニルピリジンの肝発がん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。

本試験は、被験物質投与群4群、陰性（媒体）対照群及び陽性対照群の計6群の構成で、各群とも20匹のF344雄ラットを用いた。起始物質としてDEN 200 mg/kgを単回腹腔内投与した。DEN処置後、第3週目より6週間、オリブ油に溶解した被験物質を0（媒体対照群）、15、30、60、120 mg/kgの用量で、また陽性対照群として生理食塩水に溶解したフェノバルビタールナトリウムを25 mg/kgの用量で毎日1回、強制経口投与した。なお、第3週目の終わりにPHを行った。投与終了日の翌日に生存動物を安楽死させ、肝臓の前腫瘍性病変であるGST-P陽性細胞巢の発生を検査した。

試験の結果、PHの不成立により、最終的な有効動物は、0、15、30、60、120 mg/kg投与群及び陽性対照群で、それぞれ18、16、19、19、16及び13匹であった。

被験物質による影響として、60及び120 mg/kg投与群で投与後に流涎が散見され、また60及び120 mg/kg投与群で体重増加の有意な抑制及び120 mg/kg投与群で摂餌量の高値が認められた。被験物質投与による死亡動物は認められなかった。肝臓重量は、用量依存的に増加傾向を示し、60及び120 mg/kg投与群の相対重量で有意な増加が認められた。肝臓のGST-P陽性細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積は、媒体対照群と比較して低値傾向を示したが、統計学的な有意差は認められなかった。投与による肝臓の組織学的変化も認められなかった。陽性対照群におけるGST-P陽性細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積は、ともに媒体対照群と比較して有意な高値を示した。

本試験は、被験物質の最高投与量を体重の増加抑制及び肝重量の増加を示す用量まで実施した。また、媒体対照群を含む被験物質投与群の最終的な有効動物は各群15匹以上であり、また媒体対照群及び陽性対照群のGST-P陽性巢の単位面積あたりの個数及び面積はバックグラウンドデータの範囲内であり試験は適切に実施されていた。

本被験物質に関しては、ネズミチフス菌を用いた遺伝子突然変異試験（文献8、9、10）及びラット初代培養肝細胞を用いた不定期DNA合成（UDS）試験（文献9）で陰性と報告されているが、NTPによるPCB誘導のチャイニーズハムスターS9を30%添加したネズミチフス菌を用いた遺伝子突然変異試験（文献11）およびラットS9を10%添加した大腸菌を用いた遺伝子突然変異試験（文献10）で陽性、また、チャイニーズハムスター肺細胞（CHL）を用いた染色体異常試験（文献12）で陽性の報告があり、in vitro 遺伝毒性を有することが示唆される。in vivo 遺伝毒性試験に関する報告はなかった。発がん性に関しては、0、10 µmol（約1 mg）を週に3回（合計20回）を雌のA/Jマウスに腹腔内投与し20週間後に評価した試験で、肺腫瘍の発生数に有意な変化は認められていない（文献9）。

6. 結論

2 段階発がんモデルによる肝中期発がん性試験（伊東法）の結果、2-ビニルピリジンは、ラット肝臓における発がんプロモーション作用を示さず、その発がん性は陰性と結論した。

7. 参考文献

- 1) 新エネルギー・産業技術総合開発機構 .2005. 化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0 . No.18 2-ビニルピリジン .
- 2) 独立行政法人 産業技術総合研究所 .有機化合物スペクトルデータベース (SDBS) . 2-Vinylpyridine、 N-Nitrosodiethylamine .
[http://r+iodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi. Accessed 2013/6/25]
- 3) 株式会社 島津テクノリサーチ . Phenobarbital Sodium Salt 赤外吸収スペクトルデータ . 測定日 2013/9/12 .
- 4) 厚生省 . 1997 . 2-ビニルピリジンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験 . 生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, 化学物質点検推進連絡協議会編 . 5. 309-321.
- 5) Eastman Kodak Co. 1984. Basic toxicity of 2-Vinyl pyridine; 09/28/92; EPA Doc. No. 88-920008941; Fiche No. ots0546362.
(新エネルギー・産業技術総合開発機構、「化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0 、 No.18 2-ビニルピリジン」より引用)
- 6) 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.
- 7) 吉村 功編 . 毒性・薬効データの統計解析-事例研究によるアプローチ- . 東京 : サイエンティスト社 . 1987 . pp22-64 .
- 8) Simmon V.F. and Baden J.F. (1980) Mutagenic activity of vinyl compounds and derived epoxides. Mutation Res. 78: 227-231.
- 9) Brunnemann K.D., Rivenson A., Cheng S.C., Saa V. and Hoffmann D. (1992) A study of tobacco carcinogenesis XLVII. Bioassay of vinylpyridines for genotoxicity and for tumorigenicity in A/J mice. Cancer Let. 65: 107-113.
- 10) 厚生省 . 1997 . 2-ビニルピリジンの細菌を用いる復帰突然変異試験 . 生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, 化学物質点検推進連絡協議会編 . 5. 323-327.

- 11) U.S. National Institute of Environmental Health Sciences (2002) Department of Health and Human Services, Chemical Effects in Biological Systems.
(<http://tools.niehs.nih.gov/cebs3/ntpViews/?activeTab=summary&studyNumber=A86958> Accessed 2014/3/26)

- 12) 厚生省 . 1997 . 2-ビニルピリジンの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 . 生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, 化学物質点検推進連絡協議会編 . 5. 309-321.

8. 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に従わなかつたこと

法定電気設備点検のため、2013年10月26日13時から17時まで停電となり、飼育施設の空調が停止した。その結果、飼育室の飼育室の換気回数はゼロとなり、湿度は3時間70%を超え試験計画書で規定する範囲を逸脱した。空調の復帰直後の動物の一般状態に異常は認められず、また、その後の一般状態及び体重に異常は認められなかつたことから、本件による試験結果に対する影響はなかつたと考えられる。

その他に、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に従わなかつたことはなかつた。