最 終 報 告 書

トランスジェニックマウスを用いる 2-Vinylpyridine の遺伝子突然変異試験

試験番号：D849（ 115－224 ）

平成25 年 3 月 21 日

試験委託者
厚生労働省

公益財団法人 食[redacted]全性評価センター

試験責任者の署名および日付

表　　題：　トランスジェニックマウスを用いる 2-Vinylpyridine の遺伝子突然変異試験

試験番号：　D849（ 115－224 ）

試験責任者：　[redacted]　平成 25 年 3 月 21 日

公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目　次

要　約 6
1. 表題 7
2. 試験目的 7
3. 遵守した GLP と動物実験関連規則，遺伝子組換え生物等関連規則および準拠したガイドライン 7
4. 試験番号 7
5. 試験施設 7
6. 試験委託者 8
7. 試験責任者 8
8. 被験物質等管理責任者 8
9. 分担責任者 8
10. 試験日程 8
11. 被験物質 9
12. 対照物質 11
13. 試験材料および方法 12
14. 試験成立条件 30
15. 結果 30
16. 考察および結論 34
17. 参考文献 35
18. 試験関係資料の保存 36
19. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかったこと 36

Tables

Table 1 Mortality in dose-finding study of 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)] 37
Table 2 Gross findings in dose-finding study of 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)] 38
Table 3 Induction of mutation (*gpt* assay) in liver of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)] 39

Table 4 Induction of mutation (*gpt* assay) in bone marrow of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]..... 40

Table 5 Induction of mutation (*gpt* assay) in stomach of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]..... 41

Table 6 Induction of mutation (*gpt* assay) in testis of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]..... 42

Table 7 Induction of mutation (Spi⁻ assay) in liver of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]..... 43

Table 8 Induction of mutation (Spi⁻ assay) in bone marrow of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]..... 44

Table 9 Induction of mutation (Spi⁻ assay) in stomach of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]..... 45

Table 10 Induction of mutation (Spi⁻ assay) in testis of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]..... 46

Appendices

Appendix 1 Body weight in dose-finding study of 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]..... 47

Appendix 2 Clinical observations in dose-finding study of 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]..... 48

Appendix 3 Body weight in the gene mutation assay of 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]..... 49

Appendix 4 Clinical observations in the gene mutation assay of 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)] 51

Appendix 5 Organ weight in the gene mutation assay of 2-vinylpyridine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]..... 58

Appendix 6 Individual gross findings on 2-vinylpyridine-treated transgenic mice for the gene mutation assay [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]..... 60

信頼性保証書..... 65

要　約

2-Vinylpyridine の変異原性について，トランスジェニックマウス（*gpt* delta）を用いて肝臓，骨髄，胃（腺胃）および精巣における遺伝子突然変異誘発性（レポーター遺伝子：*gpt* および *red*/*gam*）を検討した．

20.0，60.0，200 および 600 mg/kg の 4 用量について 1 日 1 回，24 時間間隔で 7 日間連続強制経口投与を実施した用量設定試験の結果，600 mg/kg 群では Day 1 に全例（3/3 例）の死亡が認められた．200 mg/kg 群以下の投与群では毒性兆候を示す一般状態の変化は認められず，体重の顕著な減少も認められなかった．また，剖検時の肉眼所見においても 200 mg/kg 群以下の投与群では特筆すべき変化は認められなかった．したがって，最大耐量付近と考えられる 200 mg/kg を高用量とし，公比√10 程度で除した以下 60.0 および 20.0 mg/kg の計 3 用量を被験物質投与群として設定した．

被験物質をトランスジェニックマウスに 28 日間反復強制経口投与し，最終投与後 3 日の肝臓，骨髄，胃（腺胃）および精巣において *gpt* assay および Spi$^-$ assay により遺伝子突然変異頻度を求めた．

その結果，2-Vinylpyridine 投与群の肝臓，骨髄，胃（腺胃）および精巣のいずれにおいても，*gpt* assay および Spi$^-$ assay による遺伝子突然変異頻度に，陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められなかった．

陽性対照のエチルニトロソウレア（ENU）経口投与群（100 mg/kg）では，肝臓，骨髄および胃（腺胃）で *gpt* assay による遺伝子突然変異頻度が上昇しており，遺伝子突然変異頻度は陰性対照と比較して統計学的に有意（$p \leq 0.05$）な増加を示した．

Spi$^-$ assay が適切に行われたか否かを確認するため，Spi$^-$ assay で陽性であることが確認された別試験の肝臓を陽性対照群の肝臓として用いて Spi$^-$ assay を実施した結果，遺伝子突然変異頻度は陰性対照群に比べて明らかな増加を示した．群内のばらつきのため統計学的有意差はつかなかったが，陽性対照群の遺伝突然変異頻度の最小値（12.96×10^{-6}）が陰性対照群の最大値（11.82×10^{-6}）より大きく，また陽性対照群の遺伝突然変異頻度の平均値（26.88×10^{-6}）が陰性対照群の平均値（6.05×10^{-6}）の 4 倍以上に増加していることなどから陽性対照群において十分な陽性反応が確認できたと判断した．したがって，当該試験はいずれも適切に実施されたと判断した．

以上の結果から，当該試験条件下において，2-Vinylpyridine はトランスジェニックマウスに対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの（陰性）と判定された．

1. 表題

トランスジェニックマウスを用いる 2-Vinylpyridine の遺伝子突然変異試験

2. 試験目的

被験物質による標的器官での遺伝子突然変異誘発性を *in vivo* で検討する（レポーター遺伝子：*gpt* および *red*/*gam*）.

3. 遵守したGLPと動物実験関連規則，遺伝子組換え生物等関連規則および準拠したガイドライン

GLP

新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について（平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 8 号，平成 23・03・29 製局第 6 号，環保企発第 110331010 号）

動物実験関連規則

動物の飼育および動物の取り扱いについては，「動物の愛護及び管理に関する法律」，「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」および当該施設の「動物実験に関する指針」を遵守し，動物を適正に使用した（安評センター動物実験倫理委員会承認番号 11-0236A）.

遺伝子組換え生物等関連規則

遺伝子組換え生物等の取り扱いについては，「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」および当該施設の「遺伝子組換え生物等の使用等に関する安全管理規程」を遵守し，遺伝子組換え生物等を適正に使用した（安評センター組換え DNA 実験安全委員会承認番号 65）.

ガイドライン等

- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 488 (28 July 2011: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays)
- Environmental Health Criteria 233 (United Nations WHO 2006; Transgenic Animal Mutagenicity Assays)

4. 試験番号

D849（ 115－224 ）

5. 試験施設

公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター（略称　安評センター）

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582 番地 2

Tel: 0538-58-1266　Fax: 0538-58-1293

6. 試験委託者

厚生労働省

医薬食品局審査管理課

化学物質安全対策室

〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

Tel: 03-3595-2298　Fax: 03-3593-8913

7. 試験責任者

[redacted]

公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582 番地 2

Tel: 0538-58-1326　Fax: 0538-58-1368

E-mail: t_jin@anpyo.or.jp

8. 被験物質等管理責任者

[redacted]

9. 分担責任者

変異原性実験：

検疫：

被験物質液調製：

飼育管理：

病理学検査：

[redacted]

10. 試験日程

試験開始日：	平成 24 年 2 月 10 日
実験開始日：	平成 24 年 2 月 21 日
【用量設定試験】	
動物入荷日：	平成 24 年 2 月 13 日
被験物質液調製日：	平成 24 年 2 月 21～27 日
投与開始日（Day 1）：	平成 24 年 2 月 21 日
投与終了日（Day 7）：	平成 24 年 2 月 27 日
動物観察終了日（Day 8）：	平成 24 年 2 月 28 日
【トランスジェニック（TG）試験】	
動物入荷日：	平成 24 年 4 月 9 日
被験物質液調製日：	平成 24 年 4 月 18 日～5 月 15 日

≪陰性対照群，被験物質群≫

投与開始日（Day 1）：	平成 24 年 4 月 18 日
投与終了日（Day 28）：	平成 24 年 5 月 15 日
標的器官（臓器）摘出日（Day 31）：	平成 24 年 5 月 18 日

≪陽性対照群≫

投与日（Day 3，Day 4）：	平成 24 年 4 月 20，21 日
標的器官（臓器）摘出日（Day 14）：	平成 24 年 5 月 1 日
アッセイ終了日：	平成 24 年 8 月 31 日
実験終了日：	平成 24 年 8 月 31 日
試験終了日：	平成 25 年 3 月 21 日

11. 被験物質

2-Vinylpyridine

（和名：2-ビニルピリジン）

11.1. ロット番号

EPK2457

11.2. 含量

98.9%（毛管カラム GC）

11.3. 購入先

[redacted]

11.4. 製造年月

平成 23 年 7 月

11.5. 有効期限

開封しない状態で受領日（平成 24 年 1 月 6 日）から 1 年

11.6. 保存条件

遮光，気密，冷蔵（基準値：2～10°C）

11.7. 保存場所

被験物質調製室，冷蔵保管庫

- 室温保管室 ch. 72

  保存期間：2012 年 1 月 6 日～2 月 15 日（受領日～試験責任者への配布日）

  実測値：3.5～7.4°C

- バイオマルチクーラー ch. 41

  保存期間：2012 年 2 月 15 日～5 月 15 日（試験責任者受領日～最終使用日）

  実測値：4.3～6.7℃

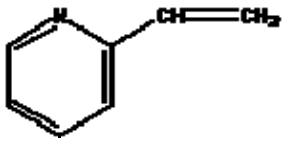
  システム不具合発生から解消までの間（2012 年 3 月 10 日；11 時 40 分）の保存温度は，バックアップデータで確認した.

  実測値：4.8～5.2℃（2012 年 3 月 10 日 11 時 31 分～11 時 41 分）

11.8. CAS No.

100-69-6

11.9. 化学構造



11.10. 分子式

C_7H_7N

11.11. 分子量

105.14

11.12. 物質の状態

暗赤褐色，澄明の液体

11.13. 沸点

159°C

11.14. 密度

0.975 g/mL（20°C）

11.15. 溶解性

エタノールに極めて溶けやすい.

水に可溶（32.1 mg/mL 以上，試験施設データ）.

トウモロコシ油に不溶（25.0 mg/mL，試験施設データ）.

11.16. 安定性

光により変質する．重合しやすい．常圧で加熱すれば 158～160°C で固化する.

11.17. 取り扱い上の注意

高温物，スパークを避け，強酸化剤との接触をさける.

吸入したり，眼，皮膚および衣類に触れないように適切な保護具（マスク，手袋，保護眼鏡等）を着用する.

11.18. 残余被験物質の処理

実験終了後，残余被験物質の一部（約 2 g）を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し，残りを専用の容器（安全廃棄システム，NALGENE®）に廃棄した.

12. 対照物質

12.1. 陰性対照物質

被験物質液調製に媒体として使用する注射用水を陰性対照物質に選択した.

12.1.1. 対照物質名

注射用水（日本薬局方注射用水，大塚蒸留水）

12.1.2. ロット番号

用量設定試験：1B84N

本試験：1J98N

12.1.3. 製造元

株式会社大塚製薬工場

12.1.4. 保存条件

室温

12.1.5. 保存場所

被験物質調製室

12.2. 陽性対照物質

ガイドラインで推奨されている，下記の物質を陽性対照物質に選択した.

12.2.1. 対照物質名

エチルニトロソウレア（ENU）

12.2.2. ロット番号

4-RFS-48-2

12.2.3. 製造元

Toronto Research Chemicals Inc.

12.2.4. 保存条件

冷凍（基準値：–30～–5°C）

12.2.5. 保存場所

被験物質調製室，冷凍保管庫

13. 試験材料および方法

TG 試験で使用する動物が *gpt* delta トランスジェニックマウスであることから，P1A レベルの拡散防止処置とした.

13.1. 試験動物

13.1.1. 種

用量設定試験：マウス

TG 試験：マウス（*gpt* delta トランスジェニックマウス）

13.1.2. 系統

用量設定試験：C57BL/6JJmsSlc

TG 試験：C57BL/6JJmsSlc-Tg（*gpt* delta）

13.1.3. 生産場

日本エスエルシー株式会社

13.1.4. 週齢および体重

購入時：9 週齢

群分け時：10 週齢（体重；用量設定試験：23.5～26.0 g，TG 試験：25.0～27.8 g）

13.1.5. 購入動物数

用量設定試験：雄 15 匹

TG 試験：雄 34 匹

13.1.6. 使用動物数

用量設定試験：雄 12 匹

TG 試験：雄 30 匹

13.1.7. 種・系統選択理由

用量設定試験：TG 試験の親動物である本系統のマウスを選択した.

TG 試験：遺伝子導入マウスとして広く利用されており，入手のし易さ等を考慮して本系統のトランスジェニックマウスを選択した.

13.2. 飼育管理

13.2.1. 飼育環境

バリアシステムの 7-110 号飼育室（W 6.4 × D 10.3 × H 2.6 m）で動物を飼育し，環境調節の基準値は，次のとおりとした．なお，*gpt* delta トランスジェニックマウスの飼育期間中，出入り口にネズミ返しを設置した．

温度	23±3°C［実測値：22.8～23.0°C（用量設定試験），22.8～23.0°C（TG 試験）］
湿度	55±20%RH［実測値：48.5～53.3%RH（用量設定試験），45.3～56.1%RH（TG 試験）］
換気回数	12 回以上／h
空気差圧	外気+30Pa 以上（扉閉鎖時）
照明	12 時間（午前 7 時点灯，午後 7 時消灯）

水洗式飼育機（東京理工）を使用し，金属製飼育ケージ（W 10.0 × D 19.6 × H 13.0 cm）に動物を 1 匹ずつ収容した. 飼育ケージは隔週 1 回, 給餌器は週 1 回の頻度で交換した．

13.2.2. 飼料

放射線滅菌固型飼料（CRF-1，Lot No. 110908 または 111109，オリエンタル酵母工業）を自由に摂取させた. 飼料中の汚染物質に関する分析成績書（No. AR-11-JP-002270-01, AR-11-JP-003254-01）を製造元から入手し，その値が日本実験動物飼料協会案の許容基準値内であることを確認した．なお，餌の補給は，給餌器の交換と同時に行った．

13.2.3. 給水

水道水を自動給水ノズルから自由に摂取させた．水道法に基づく水質検査を 2011 年 10 月および 2012 年 4 月に株式会社 エコプロ・リサーチで行い，2012 年 1，2，3，5 および 6 月に安評センターで細菌検査（一般細菌および大腸菌検査）を実施した．検査結果（水質検査: 第 113689-3 号および第 122682-3 号, 細菌検査: 第 GT12-01 号, 第 GT12-02 号，第 GT12-03 号，第 GT12-05 号および第 GT12-06 号）については，上水道水質基準の基準値内であることおよび細菌が検出されていないことを確認した．

13.3. 検疫・馴化

搬入後，動物の一般状態および体重の推移を観察し，試験環境に馴化させた．1 日 1 回, 9 日間（用量設定試験 : 7 日間）一般状態を観察し，搬入日（用量設定試験 : Day –8, TG 試験：Day –9）および検疫・馴化期間終了日（用量設定試験：Day –1*，TG 試験：Day 1）に体重を測定した．なお，一般状態および体重推移より試験に用いることが不適切と判断された動物は，観察されなかった．

*：媒体選択に時間を要し，検疫・馴化期間終了日の翌日を投与開始日としたため．

13.4. 群分け

群分けは Day 1（用量設定試験 : Day –1）に測定した体重を基に，LATOX-F/V5（FFC）システムを用いて行った．群分けにより除外された動物は，余剰動物として扱い，群分け終了後（用量設定試験 : 2012 年 2 月 28 日，TG 試験 : 2012 年 4 月 18 日）に炭酸ガスにより安楽死させた．

13.5. 個体識別

動物入荷時に通し番号（仮動物番号）を割り当て，検疫・馴化期間中は個体別飼育ケージに仮動物番号カードを付け，油性インクで動物の尾部に仮動物番号を記入し個体の識別を行った．さらに，TG 試験の場合は検疫・馴化期間中に，動物の耳介に仮動物番号を入墨した．

群分け後は，試験番号，飼育室番号，試験群，仮動物番号および個体識別番号を明記した個体識別カード（ID カード）を飼育ケージに付して識別した．

13.6. ゲノム DNA 抽出試薬の調製

13.6.1. ダウンス緩衝液

以下の割合で調製した．

Na_2HPO_4（関東化学）	1.75	g
KH_2PO_4（関東化学）	0.25	g
NaCl（関東化学）	8	g
KCl（関東化学）	0.2	g
0.5 mol/L EDTA［pH 8.0］（Lot No. 01379K または 01572B, ニッポンジーン）	20	mL
超純水	1000	mL

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 8.0 に調整後，オートクレーブ（121°C, 20 分）で滅菌し，室温（基準値 : 1～30°C）で保存した．

13.6.2. RNase 含有ダウンス緩衝液

以下の割合で調製した．

ダウンス緩衝液	100	mL
RNase 溶液（10 mg/mL，Lot No. 90002C，ニッポンジーン）	2.0	mL

用時調製した．

13.6.3. 0.5 mol/L ショ糖溶液

以下の割合で調製した.

ショ糖（M.W. = 342.30）	17.1	g
ダウンス緩衝液	100	mL

フィルター（孔径 0.2 μm）ろ過除菌後，冷蔵（基準値：1～9°C）保存した.

13.6.4. 組織破砕用緩衝液

以下の割合で調製した.

ダウンス緩衝液	45	mL
0.5 mol/L ショ糖溶液	45	mL
0.5 mol/L EDTA［pH 8.0］	10	mL
RNase 溶液（10 mg/mL）	2	mL

用時調製した.

13.6.5. 10 w/v% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）溶液

以下の割合で調製した.

SDS（Lot No. STL8668，和光純薬工業）	10	g
遺伝子工学用滅菌水（Lot No. 02702A，ニッポンジーン）	100	mL

フィルター（孔径 0.2 μm）ろ過除菌後，室温（基準値：1～30°C）保存した.

13.6.6. プロテナーゼ K 溶液

以下の割合で調製した.

プロテナーゼ K（Lot No. LAM2357，和光純薬工業）	200	mg
遺伝子工学用滅菌水（Lot No. 02712B）	60	mL
10 w/v% SDS 溶液	20	mL
0.5 mol/L EDTA［pH 7.5］[注1)]	20	mL

注 1）pH 8.0 の EDTA 溶液（Lot No. 01440J，ニッポンジーン）を 1 mol/L の塩酸で pH 7.5 に調整した後に使用した.

用時調製した.

13.6.7. フェノール／クロロホルム（Ph/Cl）混液

以下の割合で調製した.

クロロホルム（Lot No. 404N1128，関東化学）	100	mL
TE 飽和フェノール（Lot No. 07932A あるいは 07972B，ニッポンジーン）	100	mL

用時調製した.

13.7. 培地および培養液等の調製

13.7.1. LB 培養液

以下の割合で調製した.

Bacto tryptone（Lot No. 1285257，BD Diagnostic）	10	g
Bacto yeast extract（Lot No. 1105209，BD Diagnostic）	5	g
NaCl	5	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ（121℃，20 分）で滅菌した後，冷蔵（基準値：1～9℃）保存した. 3 ヵ月以内に使用した.

13.7.2. SM 緩衝液

以下の割合で調製した.

NaCl	5.84	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$（関東化学）	2.03	g
1 mol/L Tris-HCl［pH 7.5］（Lot No. 00691C，ニッポンジーン）	50.0	mL
ゼラチン末（Lot No. 912W2043，関東化学）	100	mg
調製量	1000	mL

ビーカーに超純水を適量入れ，スターラーで撹拌しながら上記の試薬を添加した．溶解後，超純水で調製量に定容した．オートクレーブ（121℃，20 分）で滅菌した後，室温（基準値：1～30℃）で保存した.

13.7.3. 200 mg/mL マルトース水溶液

以下の割合で調製した.

マルトース（和光純薬工業）	20	g
超純水	100	mL

フィルター（孔径 0.2 μm）ろ過除菌後，冷蔵（基準値：1～9℃）保存した.

13.7.4. 5 × M9 salt

以下の割合で調製した.

Na_2HPO_4	33.9	g
KH_2PO_4	15.0	g
NaCl	2.50	g
NH_4Cl（和光純薬工業）	5.00	g
調製量	1000	mL

ビーカーに超純水を適量入れ，スターラーで撹拌しながら，各試薬を少量ずつ添加し

た．溶解後，超純水を用いて定容した．オートクレーブ（121°C，20 分）で滅菌した後，冷蔵（基準値：1～9°C）保存した．

13.7.5. 50 w/v%グリセロール

以下の割合で調製した．

グリセリン（1.260 g/mL，和光純薬工業）	39.7	mL
調製量	100	mL

ビーカーに超純水を適量入れ，スターラーで撹拌しながら少しずつグリセリンを添加した．溶解後，超純水を用いて定容した．オートクレーブ（121°C，20 分）で滅菌した後，冷蔵（基準値：1～9°C）保存した．

13.7.6. 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液

以下の割合で調製した．

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	24.6	g
調製量	100	mL

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ，スターラーで撹拌しながら $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を添加した．溶解後，超純水で調製量に定容した．オートクレーブ（121°C，20 分）滅菌後，室温（基準値：1～30°C）保存した．

13.7.7. 1 mol/L 塩化カルシウム水溶液

以下の割合で調製した．

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$（和光純薬工業）	1.47	g
調製量	10	mL

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ，スターラーで撹拌しながら $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ を添加した．溶解後，超純水で調製量に定容した．オートクレーブ（121°C，20 分）滅菌後，冷蔵（基準値：1～9°C）保存した．

13.7.8. 1 w/v%チアミン水溶液

以下の割合で調製した．

チアミン塩酸塩（Lot No. WER5857，和光純薬工業）	0.1	g
調製量	10	mL

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ，スターラーで撹拌しながらチアミン塩酸塩を添加した．溶解後，超純水で調製量に定容した．フィルター（孔径 0.2 μm）ろ過除菌後，冷蔵（基準値：1～9°C）保存した．

13.7.9. 10 mg/mL アミノ酸水溶液

以下の割合で調製した.

L(-)-プロリン（Lot No. PEE2878，和光純薬工業）	1	g
L-ロイシン（Lot No. CDJ4982，和光純薬工業）	1	g
L(+)-イソロイシン（Lot No. ALH4672，和光純薬工業）	1	g
調製量	100	mL

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ, スターラーで撹拌しながら各試薬を添加した．溶解後，超純水で調製量に定容した．フィルター（孔径 0.2 μm）ろ過除菌後，冷蔵（基準値：1～9°C）保存した.

13.7.10. 20 mg/mL カナマイシン水溶液

以下の割合で調製した.

カナマイシン硫酸塩（Lot No. LAR4778，和光純薬工業）	20	mg
注射用水	1	mL

フィルター（孔径 0.2 μm）ろ過除菌後，冷凍保存した.

13.7.11. 25 mg/mL クロラムフェニコール溶液

以下の割合で調製した.

クロラムフェニコール（Lot No. WKH3920，和光純薬工業）	250	mg
調製量	10	mL

クロラムフェニコールに調製量の 8 割程度のエタノール (関東化学) を加え溶解した．溶解後，エタノールで調製量に定容した．フィルター（孔径 0.2 μm）ろ過除菌後，冷凍保存した.

13.7.12. 25 mg/mL 6-チオグアニン溶液（6-TG 溶液）

以下の割合で調製した.

6-チオグアニン（Lot No. AEHGH，東京化成工業）	25	mg
DMSO（和光純薬工業）	1	mL

アルミホイルを巻いて遮光し，1 時間程度室温に放置した．用時調製した.

13.7.13. ソフトアガー

以下の割合で調製した.

NaCl	6	g
バクトアガー（Lot No. 1279022，BD Diagnostic）	6	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 使用時までウォーターバスを用いて,

50°C に保温した.

6-TG ソフトアガーの場合は，さらに 25 mg/mL 6-TG 溶液（用時調製）を使用直前に 1 mL 添加した.

13.7.14. M9 + Cm 寒天培地および M9 + Cm + 6TG 寒天培地

以下の割合で調製した.

バクトアガー	15	g
超純水	800	mL

上記の試薬を秤量し，所定量の超純水を添加後，スターラーバーを入れてオートクレーブ（121°C，20 分）で滅菌した．スターラーの上に 50°C の湯煎を置き，オートクレーブが終了したアガーを保温した.

5 × M9 salt	200	mL
50 w/v%グリセロール	20	mL
1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液	2	mL
1 mol/L 塩化カルシウム水溶液	0.1	mL
1 w/v%チアミン水溶液	0.5	mL
10 mg/mL アミノ酸水溶液	4	mL
25 mg/mL クロラムフェニコール溶液	1	mL
25 mg/mL 6TG 溶液（M9 + Cm + 6TG 寒天培地のみ）	1	mL

アガーの温度が下がったら，スターラーを用いて撹拌しながら，上記の試薬を添加した．シャーレ（直径 90 mm）に寒天培地 25 mL を添加し，寒天培地が固化した後，プレートをラックに入れ，上からアルミホイルを掛けることで遮光し，室温で保存した.

13.7.15. 1/15 mol/L Na-K 緩衝液

以下の割合で調製した.

Na_2HPO_4	7.57	g
KH_2PO_4	1.82	g
調製量	1000	mL

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ，スターラーで撹拌しながら各試薬を添加した．溶解後，超純水で調製量に定容した．オートクレーブ（121°C，20 分）で滅菌した後，室温（基準値：1～30°C）で保存した.

13.7.16. λ-trypticase 寒天培地

以下の割合で調製した.

BBL trypticase peptone (Lot No. 1362705 あるいは 0230928，BD Diagnostic)	10	g
NaCl	5	g
バクトアガー	10	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ（121°C，20 分）で滅菌した後，室温で約 60°C まで冷却し，1 mol/L $MgSO_4$ 10 mL を添加した（最終濃度 10 mmol/L）．シャーレ（直径 90 mm）に本寒天培地 25 mL を添加し, 寒天培地が固化した後にプレートをラックに入れ, 4°C で保存した.

13.7.17. λ-trypticase トップアガー

以下の割合で調製した.

BBL trypticase peptone	1	g
NaCl	0.5	g
バクトアガー	0.6	g
超純水	100	mL

オートクレーブ（121°C，20 分）で滅菌した後，室温で約 60°C まで冷却し，1 mol/L $MgSO_4$ 1 mL を添加した（最終濃度 10 mmol/L）．使用時までウォーターバスを用いて 50°C の条件で保温した.

13.8. 被験物質液等

13.8.1. 被験物質液の調製

「2-ビニルピリジンのラットを用いる 28 日間反復投与毒性試験」[1]においてトウモロコシ油を媒体として選択していたため，トウモロコシ油を用いて被験物質液の調製を実施した．しかし，被験物質がトウモロコシ油に溶解せず，懸濁性も良好でなかった．そのため，被験物質の溶解性について検討し注射用水を使用溶媒とした.

用量設定試験では, 300 mg を目盛り付き試験管に正確に秤量した. 注射用水を加え, 10 mL とすることにより 30.0 mg/mL 溶液を調製した．この 30.0 mg/mL 溶液 2 mL に注射用水 4 mL を加えて 10.0 mg/mL 溶液を調製した．この 10.0 mg/mL 溶液 1.5 mL に注射用水 3.5 mL を加えて 3.00 mg/mL 溶液を調製した．この 3.00 mg/mL 溶液 2 mL に注射用水 4 mL を加えて 1.00 mg/mL 溶液を調製した.

TG 試験では, 150 mg を目盛り付き試験管に正確に秤量した. 注射用水を加え, 15 mL とすることにより 10.0 mg/mL 溶液を調製した．この 10.0 mg/mL 溶液 3 mL に注射用水 7 mL を加えて 3.00 mg/mL 溶液を調製した. この 3.00 mg/mL 溶液 3 mL に注射用水 6 mL

を加えて 1.00 mg/mL 溶液を調製した.

各被験物質液は，用時調製した.

13.8.2. 残余被験物質液の処分

専用の容器（安全廃棄システム，NALGENE®）に廃棄した.

13.8.3. 陽性対照物質液の調製

ENU 50 mg を量り，目盛り付試験管に移した後，1/15 mol/L リン酸緩衝液（pH 6）を加えて 5 mL に定容し，10 mg/mL 液を準備した．陽性対照物質液は，用時調製した.

13.8.4. 残余対照物質液の処分

専用の容器（安全廃棄システム，NALGENE®）に廃棄した.

13.9. 対照群

13.9.1. 陰性対照群

被験物質液調製に用いる媒体である注射用水を使用した.

13.9.2. 陽性対照群

gpt assay 用に，ガイドラインで推奨されている ENU を選択した．用量は文献 [2)]により 100 mg/kg とし，すべての臓器を評価対照とした．Spi$^-$ assay 用に，2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine が 400 ppm の用量で混餌投与され，陽性結果がでることが確認された別試験 [3)]の肝臓を用いた.

13.10. 用量設定試験（予備試験）

13.10.1. 用量

外部機関により実施された試験の情報より，2-Vinylpyridine をマウスおよびラットに経口投与したときの LD_{50} 値は，420 および 100 mg/kg であった [4)]．また，「2-ビニルピリジンのラットを用いる 28 日間反復投与毒性試験」 [1)]では，12.5，50 および 200 mg/kg の 3 用量にて試験が実施され，雌雄いずれの群においても死亡例は観察されなかった．一般状態の観察では，雌雄の 200 mg/kg 群で口の周囲から下顎部を濡らす程度の流涎が認められ，さらに下顎部の被毛の汚れが認められた．また，雌雄の 50 mg/kg 群においても口の周囲を濡らす程度の流涎が認められた．したがって投与可能な限界用量付近の 600 mg/kg を最高用量とし，以下 200，60.0 および 20.0 mg/kg の 4 用量を設定した.

13.10.2. 試験群の構成

試験群	用量（mg/kg）	動物数	動物番号
被験物質	20.0	3	1101～1103
	60.0	3	1201～1203
	200	3	1301～1303
	600	3	1401～1403

13.10.3. 投与方法および投与回数

被験物質の投与経路は経口とし，ディスポーザブルシリンジとテフロン製ゾンデを用いて 1 日 1 回，約 24 時間間隔で 7 日間連続強制投与した．投与容量は体重 100 g 当たり 2 mL とし，群分け時の体重から投与液量（mL）を求めた．

13.10.4. 体重測定および一般状態観察

動物搬入時，検疫期間終了時（群分け時）および最終投与後 1 日に電子天秤（PG6002-S, メトラー・トレド）を用いて体重を測定した．また，死亡動物については死亡発見時に体重を測定した．

初回投与日から最終投与後 1 日まで 1 日 1 回以上，動物の一般状態を観察した後，各用量の最終投与後 1 日での死亡率を求めた．

13.10.5. 病理学的検査

病理学的検査では，肉眼観察のみを実施した．

平成 24 年 2 月 28 日に全生存動物を，イソフルラン麻酔下で放血により安楽死させた後，剖検した．死亡動物については，発見後直ちに剖検した．

剖検では，全例の体表，自然開孔部を観察し，腹腔，胸腔，骨盤腔，頭蓋腔等の器官・組織を始めとする全身の諸器官・組織を肉眼観察した．すべての肉眼的異常について，部位，大きさ，色調等を記録した．解剖後の屍体は速やかに処理した．

13.11. トランスジェニック（TG）試験 [5-7)]

13.11.1. 用量

用量設定試験の結果，600 mg/kg 群では投与初日に全例の死亡が認められた．200 mg/kg 群以下の投与群では毒性兆候を示す一般状態の変化は認められず，体重の顕著な減少も認められなかった．また，解剖時の肉眼所見においても 200 mg/kg 群以下の投与群では特筆すべき変化は認められなかった．したがって，最大耐量付近と考えられる 200 mg/kg を高用量とし，公比$\sqrt{10}$程度で除した以下 60.0 および 20.0 mg/kg の計 3 用量を被験物質群として設定した．

13.11.2. 試験群の構成

試験群	用量 (mg/kg/day)	動物数		動物番号
		投与数	評価数	
陰性対照*	0	6	5	2001～2006
被験物質	20.0	6	5	2101～2106
	60.0	6	5	2201～2206
	200	6	5	2301～2306
陽性対照**	100	6	5	2401～2406

*：注射用水　**：ENU（mg/kg）

13.11.3. 投与動物数

陰性対照群および被験物質投与群については，評価数 5 匹を確保するため，6 匹に投与した．200 mg/kg 投与群では，2 例の死亡が認められたことから生存例全例を評価に使用した．その他の群では，死亡例等が認められなかったことから，動物番号の小さい順に 5 匹を評価に使用した．評価に使用しない動物については，13.11.7.に記載する各器官（臓器）を摘出した後に凍結保存し，ゲノム DNA の抽出は行わなかった．

13.11.4. 投与方法および投与回数

被験物質の投与経路は経口とし，ディスポーザブルシリンジおよびテフロン製胃ゾンデを用いて，1 日 1 回，28 日間連続強制投与した．被験物質液の投与液量（mL）は，体重 100 g 当たり 2 mL とし，13.11.6.の項で測定した最新の体重から求めた．

陽性対照物質の投与は，腹腔内投与とし，25G 注射針を装着したディスポーザブルシリンジを用いて 1 日 1 回，2 日間腹腔内投与した．投与液量は，体重 100 g 当たり 1 mL とし，Day 1 の体重を基に算出した．

13.11.5. 投与期間および発現期間

投与開始日を Day 1 と定め，搬入日（Day –9）から群分け日（Day 1）までを検疫・馴化期間，Day 1 から Day 28 までを投与期間，Day 29 から Day 31 までを発現期間とするとともに，Day 1～7 を Week 1，Day 8～14 を Week 2，Day 15～21 を Week 3，Day 22～28 を Week 4 とした．最終投与後 3 日（Day 31）に器官を摘出した．陽性対照群については，Day3 および 4 に投与し，最終投与後 10 日（Day 14）に器官を摘出した．

なお，発現期間は，OECD Guideline for the Testing of Chemicals 488 に準じて設定した．

13.11.6. 体重測定および一般状態観察

Day –9（動物搬入時），1［群分け日（投与開始日）］，8，15，22，29 および 31（器官摘出直前）に，電子天秤（PG6002-S，メトラー・トレド）を用いて体重を測定した．陽性対照群については，Day –9（動物搬入時），1（群分け日）および 14（器官摘出直前）に電子天秤を用いて体重を測定した．また，死亡動物については，死亡発見時に体重を測定した．

器官摘出まで，1 日 1 回以上，動物の一般状態を観察した．

13.11.7. 器官（組織）摘出，肉眼観察および保存

炭酸ガスを用いて安楽死させた動物から，肝臓，大腿骨，胃および精巣を摘出し，これら器官の肉眼観察を行った．また，摘出した器官（肝臓および精巣）についての重量を，電子天秤（XS603S，メトラー・トレド）を用いて測定し，記録した．なお，解剖室の出入り口にはネズミ返しを設置した．

器官重量／体重比（相対重量）を，剖検日の体重および器官重量から算出した［(器官重量 / 剖検日の体重) × 100］．なお，肝臓および精巣の測定単位は g（小数第 2 位まで）とした．

各器官の摘出・保存は，以下の方法に従った．

肝臓： 左葉の外側辺縁を生検トレパン（BP-50F，貝印）を用いて 4 ヵ所程度くり抜いた．くり抜いた肝臓は，それぞれ別のマイクロチューブに入れ，液体窒素（LN_2）中で凍結させた．残った左葉およびその他の葉は，保存袋に入れ，LN_2 を入れた底面が平らな金属製容器を用いて上から押し潰し，凍結させた．

大腿骨：左右の大腿骨を摘出した後，チューブに入れ，LN_2 で凍結させた．

胃： 噴門部は食道，幽門部は十二指腸を含めた形で摘出し，大弯側を切開した後，内容物を生理食塩液で洗い出した．その後，粘膜を観察した上で前胃と腺胃に分割した．腺胃については保存袋に入れ，LN_2 中で凍結させた．

精巣： 左右の精巣を摘出した後，それぞれ別のマイクロチューブに入れ，液体窒素（LN_2）中で凍結させた．

凍結後は，超低温フリーザー（MDF-U71V，三洋電機，設定値 : –80°C，基準値 : –90～–60°C）中に保存した．

すべての摘出器官（組織）は，最終報告書作成後まで保存される．その後の保存については，試験委託者と安評センターで協議し，別途定める．

13.11.8. 摘出器官の選択理由

肝臓： 本被験物質による影響が示唆され，主要な代謝器官であり，被験物質が比較的高濃度で存在すると考えられるため.

大腿骨：本被験物質による影響が示唆され，造血器官であるため.

胃： 本被験物質による影響が示唆され，経口投与では初期に被験物質と接触する器官であるため.

精巣： 本被験物質による影響が示唆され，次世代への影響を確認するため.

13.11.9. ゲノム DNA の抽出

肝臓，胃および精巣（左側）の場合は，ダウンス型ホモジナイザーに組織破砕用緩衝液（RNase を含む）3 mL を分注し，氷中で冷却した．次いで，凍結組織片を入れ，ペッスルを用いてホモジナイズした. あらかじめ 0.5 mol/L ショ糖溶液 3 mL を入れて氷冷した 15 mL 容の遠心管に上記の組織破砕液を静かに重層し，遠心機（LC-122，トミー精工）を用いて 3000 r/min（1710 G）で 10 分間遠心した．上清をスポイト等で除去し，冷却してある RNase 含有ダウンス緩衝液 3 mL を加え，よく懸濁した（核／細胞懸濁液）.

骨髄の場合は, 適量の RNase 含有ダウンス緩衝液を用いて大腿骨から骨髄を洗い出し，ペッスルを用いてホモジナイズした（核／細胞懸濁液）.

これらの核／細胞懸濁液にプロテナーゼ K 溶液 3 mL を加えて静かに転倒混和し, 1～5 時間程度（懸濁液が透明になるまで）50°C の条件で保温し，消化させた．等量（約 6 mL）の Ph/Cl 混液を加え，数回転倒混和し，さらに 10 分間回転混和させた後，遠心機（LC-122）を用いて 2500 r/min（1190 G）で 10 分間遠心した．上層（水相）をトランスファーピペットで静かに回収し，新たな 15 mL 容の遠心管に移した．回収した水相と等量の Ph/Cl 混液を加え，数回転倒混和し，さらに 10 分間回転混和させた後，2500 r/min で 10 分間遠心し，水相を回収した．回収した水相と等量のクロロホルム／イソアミルアルコール混液（容量比 24：1）を加え，数回転倒混和し，さらに 10 分間回転混和させた後，2500 r/min（1190 G）で 10 分間遠心した．水相を回収し，新しい 50 mL 容の遠心管に移した．遠心管にエタノールを徐々に加え，ゲノム DNA を析出させた．析出したゲノム DNA を 70%エタノールの入ったマイクロチューブに移し，およそ 10 分間浸した．次いで，遠心機（MX-160）を用いて 13000 r/min（13240 G）で 10 分間遠心した．上清をマイクロピペットで可能な限り除いた後, チューブを室温に放置することにより残ったエタノールを蒸散させた. 適量（50 あるいは 100 µL）の TE 緩衝液（ニッポンジーン）を加え，一晩室温に放置し，残渣の DNA を溶解させた．調製後は，冷蔵にて保存した.

Spi$^-$ assay の陽性対照は，試験番号 D848 において別試験の肝臓から抽出した DNA を用いた.

すべての DNA 溶液は，最終報告書作成後 3 ヵ月以内に処分する．

13.11.10. 試験菌株の準備（*gpt* assay）

容量 200 mL のバッフル付三角フラスコに LB 培養液 30 mL, マルトース水溶液（200 mg/mL）300 µL およびカナマイシン水溶液（20 mg/mL）30 µL を添加した．これに凍結保存（設定値 : –80°C）しておいた大腸菌 YG6020 株を融解した後，50 µL 接種した．37°C，120 回／分の振盪条件で一晩（14～18 時間）培養し，前培養液とした．

容量 500 mL のバッフル付三角フラスコに, LB 培養液 100 mL, マルトース水溶液（200 mg/mL）1 mL およびカナマイシン水溶液（20 mg/mL）100 µL を添加し，次いで，先の前培養液 1.5 mL を殖菌した後，同様に 2～6 時間程度培養を続けた．培養終了後，培養液を 10 分間遠心分離（2000 r/min）した. 上清を捨て, 回収した菌液の 1/2 量の 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液で再懸濁した（大腸菌懸濁液）.

13.11.11. 試験菌株の準備（Spi$^-$ assay）

容量 200 mL のバッフル付三角フラスコ 3 本に LB 培養液を 30 mL ずつ添加した．これに凍結保存（設定値 : –80°C）しておいた大腸菌（XL-1 Blue MRA），大腸菌［XL-1 Blue MRA（P2）］および大腸菌［WL95（P2）］*を融解した後，それぞれ 50 µL ずつ接種した．37°C，120 回／分の振盪条件で一晩（14～18 時間）培養し，前培養液とした．

容量 500 mL あるいは 200 mL のバッフル付三角フラスコ 3 本に，LB 培養液 100 あるいは 20 mL，マルトース水溶液（200 mg/mL）1 あるいは 0.2 mL をそれぞれ添加し，次いで，先の前培養液を 1.5 あるいは 0.3 mL ずつ殖菌した後，同様に 2～6 時間程度培養を続けた．培養終了後，培養液を 10 分間遠心分離（2000 r/min）した．上清を捨て，回収した菌液の 1/2 量の 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液をそれぞれ添加し，再懸濁した（大腸菌懸濁液）．

Confirmation 用の試験菌株の準備は，使用量に合わせて，適宜，準備量を変更した．

*：Spi$^-$変異体候補プラークの confirmation の際に使用

13.11.12. ゲノム DNA のパッケージング（*gpt*，Spi$^-$ assay 共通）

Transpack（Stratagene）製品添付の Instruction Manual に従ってパッケージングを実施した．Transpack のチューブ（RED）を解凍した．100～600 µg/mL 程度の濃度に調整したゲノム DNA 溶液のおよそ 10 µL をチューブ（RED）に加え，ピペッティングにより混合した後，30°C の条件で 90 分間インキュベートした．次いで，チューブ（BLUE）を解凍し，その 10 µL をチューブ（RED）に加え，同様に混合した．さらに，30°C の条件で 90 分間インキュベートを続けた．インキュベート終了後，各チューブ内の合計液量が 300 µL になるように SM 緩衝液を加え, 十分に撹拌した（パッケージング溶液）．パッケージング溶液は使用時まで，氷中にて保存した．

13.11.13. パッケージング溶液のプレーティング（*gpt* assay）

大腸菌懸濁液（YG6020 株）を，総プラーク算出用（タイター用）小試験管 2 本および突然変異算出用（セレクション用）小試験管 5 本に 200 µL ずつ分注しておいた．10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を希釈用チューブに 495 µL ずつ分注した．希釈用チューブにパッケージング溶液5 µL を添加し, ボルテックスミキサーで撹拌し，これを希釈液とした．希釈液をタイター用小試験管 2 本に 5 µL ずつ添加し，ボルテックスミキサーで撹拌した．パッケージング溶液をセレクション用小試験管 5 本に約 60 µL ずつ添加し，ボルテックスミキサーで撹拌した（5 本目のセレクション用小試験管には残っているパッケージング溶液全量を添加した）．タイター用小試験管およびセレクション用小試験管を 37°C で 20 分程度静置した．静置後，37°C，120 回／分の振盪条件で 30 分間培養した．タイター用小試験管に，トップアガー2.5 mL を加え，ボルテックスミキサーで撹拌し，M9 + Cm 寒天培地に全量を重層した．これをタイター用プレートとした．セレクション用小試験管に 6TG トップアガー2.5 mL を加え，ボルテックスミキサーで撹拌し，M9 + Cm + 6TG 寒天培地に全量を重層した．これをセレクション用プレートとした．タイター用プレートは 37°C の条件で 2〜3 日間，セレクション用プレートは 37°C の条件で 5 日間培養した．

13.11.14. パッケージング溶液のプレーティング（Spi⁻ assay）

大腸菌懸濁液（XL-1 Blue MRA）を，総プラーク算出用（タイター用）小試験管 2 本に 200 µL ずつ分注しておいた．大腸菌懸濁液［XL-1 Blue MRA（P2）］を，突然変異算出用（セレクション用）小試験管 2 本に 200 µL ずつ分注しておいた．10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を希釈用チューブに 495 µL ずつ分注した．希釈用チューブにパッケージング溶液 5 µL を添加し，ボルテックスミキサーで撹拌し，希釈液とした．希釈液をタイター用チューブ 2 本に 5 µL ずつ添加し，ボルテックスミキサーで撹拌した．パッケージング溶液をセレクション用チューブ 2 本に約 150 µL ずつ添加し，ボルテックスミキサーでゆるやかに撹拌した（2 本目のセレクション用チューブには残っているパッケージング溶液全量を添加した）．タイター用チューブおよびセレクション用チューブを 37°C で 20 分程度静置した. タイター用チューブおよびセレクション用チューブに，λ-trypticase トップアガー2.5 mL を加え，ボルテックスミキサーで撹拌し，λ-trypticase 寒天培地に全量を重層した．これをタイター用プレートおよびセレクション用プレートとした．タイター用およびセレクション用プレートは 37°C で一晩（14〜18 時間）培養した．

13.11.15. コロニーの計数（*gpt* assay）

培養終了後，コロニー数を用手法にて計数した．ただし，セレクション用プレートのコロニーは，培養開始 5 日目で 6TG の析出により，コロニーの識別が困難になるため，3 および 4 日目の時点で候補コロニーを確認した．

13.11.16. プラークの計数（Spi⁻ assay）

培養終了後，プラーク数を用手法にて計数した．

13.11.17. コロニーの confirmation（*gpt* assay）

すべての *gpt* 変異体候補コロニーについて，confirmation を実施した．

未使用の M9 + Cm 寒天培地および M9 + Cm + 6TG 寒天培地に方眼紙を貼り付けた．

セレクション用プレートのコロニーに，ストリーク箇所の通し番号をつけた．セレクション用プレートのコロニー数と同数の滅菌済みマイクロチューブを準備した．準備したマイクロチューブに 1/15 mol/L Na-K buffer を 50 µL ずつ分注した．セレクション用プレートのコロニーを滅菌済み爪楊枝の先で軽く触れた．爪楊枝の先を 1/15 mol/L Na-K buffer でよく洗った．爪楊枝を M9 + Cm 寒天培地，M9 + Cm + 6TG 寒天培地の順にストリークした．37°C の条件で 2～3 日間培養した．M9 + Cm 寒天培地および M9 + Cm + 6TG 寒天培地の両方に，生育が認められたコロニーを変異コロニーとした．変異コロニーの値は，confirmation 後の値を用いた．

13.11.18. プラークの confirmation（Spi⁻ assay）

すべての Spi⁻変異体候補プラークについて WL95（P2）株を含めた confirmation を実施した．

大腸菌 XL-1 Blue MRA，XL-1 Blue MRA（P2）および WL95（P2）を小試験管に 200 µL ずつ分注した．分注した小試験管に，λ-trypticase トップアガーを 2.5 mL ずつ加え，ボルテックスミキサーで撹拌し，未使用の λ-trypticase 寒天培地に全量を重層した．重層後，プレートを約 1 時間乾燥させた．乾燥後，重層したプレートに方眼紙を貼り付けた．

セレクション用プレートのプラークに，スポット箇所の通し番号をつけた．セレクション用プレートのプラーク数と同数の滅菌済みマイクロチューブを準備した．準備したマイクロチューブに SM 緩衝液を 60 µL ずつ分注した．セレクション用プレートのプラークをパスツールピペットあるいは広口チップを用いて寒天ごとくり抜いた．SM 緩衝液 60 µL を分注したマイクロチューブにくり抜いた寒天を入れた．これを confirmation 液とした．大腸菌 XL-1 Blue MRA，XL-1 Blue MRA（P2）および WL95（P2）を重層した λ-trypticase 寒天培地に confirmation 液をそれぞれ 1～2 µL ずつスポットした．37°C の条件で一晩（14～18 時間）培養した．大腸菌 XL-1 Blue MRA，XL-1 Blue MRA（P2）および WL95（P2）の 3 つのプレート上でプラークを形成したものを変異プラークとし

た．変異プラークの値は，confirmation 後の値を用いた．

13.11.19. 総コロニー数の算出（*gpt* assay）

タイター用プレートに出現したコロニー数（N）を計数し，下記の式を用いて総コロニー数を求めた．

総コロニー数 = タイター用プレートに出現したコロニー数 × Dilution Factor

$$\text{総コロニー数} = \frac{N \times 100 \times 300\ (\mu L)}{5\ (\mu L)}$$

$$= 6000 \times N$$

13.11.20. 突然変異頻度（Mutant Frequency）の算出（*gpt* assay）

突然変異頻度は，セレクション用プレートのコロニー総数（Confirmation 後の値）を総コロニー数で除して，当該組織での突然変異頻度を求めた．

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{セレクション用プレートのコロニー総数(Confirmation 後の値)}}{\text{総コロニー数}}$$

13.11.21. 総プラーク数の算出（Spi$^-$ assay）

タイター用プレートに出現したプラーク数 (N) を計数し，下記の式を用いて総プラーク数を求めた．

総プラーク数 = タイター用プレートに出現したプラーク数 × Dilution Factor

$$\text{総プラーク数} = \frac{N \times 100 \times 300\ (\mu L)}{5\ (\mu L)}$$

$$= 6000 \times N$$

13.11.22. 突然変異頻度（Mutant Frequency）の算出（Spi$^-$ assay）

突然変異頻度は，セレクション用プレートのプラーク総数（Confirmation 後の値）を総プラーク数で除して，当該組織での突然変異頻度を求めた．

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{セレクション用プレートのプラーク総数(Confirmation 後の値)}}{\text{総プラーク数}}$$

13.12. 結果の解析

陽性対照群を除く各被験物質投与群の突然変異頻度は，最初に Bartlett の等分散検定を実施した．等分散の場合は，Dunnett の多重比較検定で対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定した. Bartlett の等分散検定で不等分散（有意差が認められた）の場合は，Steel の検定で対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定した.

陰性対照群と陽性対照群での突然変異頻度の比較は，最初に F 検定を実施し，有意差が認められない場合には，Student の t 検定を実施した．F 検定で有意差が認められた場合は，Aspin-Welch の t 検定を実施した.

各検定の有意水準は両側 5%とした.

陰性対照群と比較し，被験物質投与群の突然変異頻度において統計学的な有意差が認められた場合に，陽性と判定した．ただし，最終的な判定は，試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った.

14. 試験成立条件

陽性対照群の肝臓における突然変異頻度において，陰性対照値と比較して統計学的に有意な増加が認められた場合に，試験は成立したと判断する.

gpt assay では，陽性対照群の肝臓における突然変異頻度において，陰性対照値と比較して統計学的に有意な増加が認められた．Spi$^-$ assay では，陽性対照群の肝臓における突然変異頻度において，陰性対照値と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった．しかし，陽性対照群の遺伝突然変異頻度の最小値（12.96×10^{-6}）が陰性対照群の最大値（11.82×10^{-6}）より大きく，また陽性対照群の遺伝突然変異頻度の平均値（26.88×10^{-6}）が陰性対照群の平均値（6.05×10^{-6}）の 4 倍以上に増加していることなどから陽性対照群において十分な陽性反応が確認できたと判断した．したがって，試験は成立したと判断した.

15. 結果

15.1. 用量設定試験

結果を Table 1 および 2 ならびに Appendix 1 および 2 に示す.

2-Vinylpyridine 投与の 600 mg/kg 群で Day 1 に全例（3/3 例）の死亡が認められた．200 mg/kg 群以下の投与群では毒性兆候を示す一般状態の変化は認められず，体重の顕著な減少も認められなかった.

また，剖検時の肉眼所見では，200 mg/kg 群以下の投与群では特筆すべき変化は認められなかった.

15.2. 遺伝子突然変異試験

15.2.1. 肝臓

15.2.1.1. *gpt* assay

試験結果を Table 3 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 2.54±2.33 × 10^{-6}（0.97～6.62 × 10^{-6}）であった.

2-Vinylpyridine 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 20.0 mg/kg 群で 1.94±1.89 × 10^{-6}, 中用量の 60.0 mg/kg 群で 2.10±1.19 × 10^{-6}, 高用量の 200 mg/kg 群で 1.55±1.16 × 10^{-6} であり，陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく，同程度であった.

陽性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 10.00±5.90 × 10^{-6} と増加を示し，陰性対照群と比べて統計学的に有意（$p \leq 0.05$）な増加が認められた.

15.2.1.2. Spi^- assay

試験結果を Table 7 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 6.05±3.77 × 10^{-6}（1.40～11.82 × 10^{-6}）であった.

2-Vinylpyridine 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 20.0 mg/kg 群で 2.20±1.13 × 10^{-6}, 中用量の 60.0 mg/kg 群で 5.72±3.39 × 10^{-6}, 高用量の 200 mg/kg 群で 1.32±0.68 × 10^{-6} であり，陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく，同程度であった.

陽性対照サンプルにおける各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 26.88±12.62 × 10^{-6} と増加を示したが，陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなかった.

15.2.2. 骨髄

15.2.2.1. *gpt* assay

試験結果を Table 4 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 2.78±0.72 × 10^{-6}（1.89～3.68 × 10^{-6}）であった.

2-Vinylpyridine 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 20.0 mg/kg 群で 1.75±0.58 × 10^{-6}, 中用量の 60.0 mg/kg 群で 2.07±1.34 × 10^{-6}, 高用量の 200 mg/kg 群で 3.21±0.77 × 10^{-6} であり，陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく，同程度であった.

陽性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 41.40±7.93 × 10^{-6} と増加を示し，陰性対照群と比べて統計学的に有意（$p \leq 0.05$）な増加が認められた.

15.2.2.2. Spi⁻ assay

試験結果を Table 8 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 2.95±2.16 × 10^{-6}（0.00～5.85 × 10^{-6}）であった.

2-Vinylpyridine 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 20.0 mg/kg 群で 6.38±6.44 × 10^{-6}, 中用量の 60.0 mg/kg 群で 1.92±0.70 × 10^{-6}, 高用量の 200 mg/kg 群で 2.23±1.68 × 10^{-6} であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

15.2.3. 胃（腺胃）

15.2.3.1. *gpt* assay

試験結果を Table 5 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 3.76±3.17 × 10^{-6}（1.05～8.44 × 10^{-6}）であった.

2-Vinylpyridine 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 20.0 mg/kg 群で 3.01±2.31 × 10^{-6}, 中用量の 60.0 mg/kg 群で 1.74±0.36 × 10^{-6}, 高用量の 200 mg/kg 群で 1.00±0.42 × 10^{-6} であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

陽性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 33.25±16.83 × 10^{-6} と増加を示し, 陰性対照群と比べて統計学的に有意（$p \leq 0.05$）な増加が認められた.

15.2.3.2. Spi⁻ assay

試験結果を Table 9 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 4.64±1.93 × 10^{-6}（2.35～6.85 × 10^{-6}）であった.

2-Vinylpyridine 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 20.0 mg/kg 群で 3.98±2.59 × 10^{-6}, 中用量の 60.0 mg/kg 群で 5.73±2.58 × 10^{-6}, 高用量の 200 mg/kg 群で 6.71±2.37 × 10^{-6} であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

15.2.4. 精巣

15.2.4.1. *gpt* assay

試験結果を Table 6 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 2.59±3.49 × 10^{-6}（0.59～8.73 × 10^{-6}）であった.

2-Vinylpyridine 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 20.0 mg/kg

群で 0.82±0.63 × 10^{-6}，中用量の 60.0 mg/kg 群で 0.55±0.38 × 10^{-6}，高用量の 200 mg/kg 群で 0.85±0.61 × 10^{-6} であり，陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく，同程度であった．

陽性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 2.27±1.56 × 10^{-6} であり，陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく，同程度であった．

15.2.4.2. Spi⁻ assay

試験結果を Table 10 に示す．

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は 2.85±2.78 × 10^{-6}（0.00～6.35 × 10^{-6}）であった．

2-Vinylpyridine 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は，低用量の 20.0 mg/kg 群で 2.92±2.96 × 10^{-6}，中用量の 60.0 mg/kg 群で 1.69±0.97 × 10^{-6}，高用量の 200 mg/kg 群で 3.31±2.44 × 10^{-6} であり，陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく，同程度であった．

15.2.5. 体重および一般状態観察

試験結果を Appendix 3 および 4 に示す．

2-Vinylpyridine の 200 mg/kg 群では，Day 8 および Day 9 に各 1 例の死亡が認められた．また，200 mg/kg 群では，Day 1 に流涎，流涙が認められたが，明確な体重減少は観察されなかった．陰性対照群および 2-Vinylpyridine のその他の投与群では，明確な体重減少および一般状態の変化は観察されなかった．

15.2.6. 器官重量および器官重量／体重比

試験結果を Appendix 5 に示す．

いずれの 2-Vinylpyridine 投与群においても，陰性対照群と比較し，明確な器官重量および器官重量／体重比の変化は認められなかった．

15.2.7. 解剖時の肉眼所見

試験結果を Appendix 6 に示す．

2-Vinylpyridine の 60.0 mg/kg 群では，1/6 例の左側の精巣が肥大していた．ただし，同群のその他の動物およびその他の群の動物では，認められていないこと，さらに片側性のものであることから被験物質の影響によるものではないと判断した．その他に 2-Vinylpyridine 投与群で特筆すべき変化は認められなかった．

16. 考察および結論

2-Vinylpyridine の肝臓，骨髄，胃（腺胃：以下胃）および精巣における遺伝子突然変異誘発性を検討するため，トランスジェニックマウス（*gpt* delta）を用いた遺伝子突然変異誘発性（レポーター遺伝子：*gpt* および *red*/*gam*）を実施した.

600，200，60.0 および 20.0 mg/kg の 4 用量について 1 日 1 回，24 時間間隔で 7 日間連続強制経口投与を実施した用量設定試験の結果，600 mg/kg 群では Day 1 に全例（3/3 例）の死亡が認められた．200 mg/kg 群以下の投与群では一般状態の変化も体重の顕著な減少も認められなかった．また，剖検時の肉眼所見においても 200 mg/kg 群以下の投与群では特筆すべき変化は認められなかった．したがって，最大耐量付近と考えられる 200 mg/kg を高用量とし，公比$\sqrt{10}$程度で除した以下 60.0 および 20.0 mg/kg の計 3 用量を被験物質群として設定した.

トランスジェニック試験では 28 日間強制経口投与し，3 日間の遺伝子突然変異発現期間をおいた後，各器官を摘出し，肝臓，骨髄，胃および精巣について *gpt* assay および Spi$^-$ assay により遺伝子突然変異頻度を求めた.

その結果，2-Vinylpyridine 投与群の肝臓，骨髄，胃および精巣のいずれにおいても，*gpt* assay および Spi$^-$ assay による遺伝子突然変異頻度に，陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められなかった. 精巣の *gpt* assay において陰性対照群の 1 匹で高い値（8.73×10^{-6}）がみられたが、当該個体を除いた陰性対照群の平均値は，1.06×10^{-6} であり，この値と被験物質群を比較した場合においても被験物質群で明確な遺伝子突然変異頻度の増加は認められなかった. 200 mg/kg 群では，6 例中 2 例の死亡が認められ，評価匹数が 4 匹しか確保できず，ガイドラインで求められている評価匹数（5 匹）が確保できなかった. 評価匹数が 1 匹欠けたことにより統計学的検出力の低下が考えられるが, 当該用量における肝臓, 骨髄, 胃および精巣いずれの臓器の *gpt* assay および Spi$^-$ assay の遺伝子突然変異頻度の平均値も陰性対照群の平均値の 1.5 倍未満であり明確な増加は認められていないこと，標準偏差も陰性対照群を含む他の群と比較して大きな違いが認められていないこと，さらに明らかな用量相関性も認められていないことから 1 匹欠けなかった場合についても同様な結果が得られたものと考察した.

2-Vinylpyridine は，細菌を用いる復帰突然変異試験 [8]で代謝活性化系の存在下のみで陽性, CHL 細胞を用いる染色体異常試験 [9]で代謝活性化系の存在下および非存在下で陽性であった．当該 *in vivo* 遺伝子突然変異試験で陰性結果が得られたことに関して，*in vitro* の試験で使用されている S9 mix では，第 1 相代謝反応による影響のみしか見ておらず，第 2 相代謝反応は見ることができないこと，また，2-Vinylpyridine は，グルタチオンと反応することから [10), 11)]，生体内に吸収された後，第 2 相での代謝により解毒されたかあるいは速やかに排泄されたためと推測した.

陽性対照物質のエチルニトロソウレア（ENU）経口投与群（100 mg/kg）は，肝臓，骨髄および胃で *gpt* assay による遺伝子突然変異頻度が上昇しており，遺伝子突然変異頻度は陰性対照と比較して統計学的に有意（$p \leq 0.05$）な増加を示した．

Spi$^-$ assay で陽性結果が出ることが確認された別試験の肝臓を陽性対照群の肝臓として用いて Spi$^-$ assay を実施した結果，遺伝子突然変異頻度は陰性対照群に比べて明らかな増加を示した．群内のばらつきのため統計学的有意差はつかなかったが，陽性対照群の遺伝突然変異頻度の最小値（12.96×10^{-6}）が陰性対照群の最大値（11.82×10^{-6}）より大きく，また陽性対照群の遺伝突然変異頻度の平均値（26.88×10^{-6}）が陰性対照群の平均値（6.05×10^{-6}）の 4 倍以上に増加していることなどから陽性対照群において十分な陽性反応が確認できたと判断した．したがって，当該試験が適切な条件下でなされたと判断された．

以上の結果から，当該試験条件下において，2-Vinylpyridine はトランスジェニックマウスに対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの（陰性）と判定された．

17. 参考文献

1) [redacted]：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，（財）食品農医薬品安全性評価センター
2) 能美健彦：変異原性試験で何がわかるか：21 世紀の展望，Environ. Mutagen Res., 24 (2002) 75-80.
3) K. Masumura, K. Matsui, M. Yamada, M. Horiguchi, K. Ishida, M. Watanabe, O. Ueda, H. Suzuki, Y. Kanke, K.R. Tindall, K. Wakabayashi, T. Sofuni and T. Nohmi, Mutagenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine (PhIP) in the new gpt delta transgenic mouse. Cancer Letters 143 (1999) 241-244.
4) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), NIOSH CD-ROM (2001)
5) T. Nohmi, M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni, A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi$^-$ and 6-thioguanine selections, Environmental Molecular Mutagenesis 28 (1996) 465-470.
6) T. Nohmi, T. Suzuki and K. Masumura, Recent advance in the protocols of transgenic mouse mutation assays, Mutation Research 455 (2000) 191-215.
7) V. Thybaud, S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima, In vivo transgenic mutation assays. Mutation Research 540 (2003) 141-151.

8) [redacted]：2-ビニルピリジンの細菌を用いる復帰突然変異試験，（財）食品農医薬品安全性評価センター

9) [redacted]：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，（財）食品農医薬品安全性評価センター

10) Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Analytical Biochemistry 106 (1) (1980) 207-212.

11) Winters RA, Zukowski J, Ercal N, Matthews RH, Spitz DR. Analysis of glutathione, glutathione disulfide, cysteine, homocysteine, and other biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by *N*-(1-pyrenyl) maleimide. Analytical Biochemistry 227 (1) (1995) 14-21.

18. 試験関係資料の保存

当該試験の下記資料は，安評センター資料保存施設にて最終報告書作成後 10 年間保存される. その後の保存については, 試験委託者と安評センターで協議し, 別途定める.

- 試験計画書（原本）
- 被験物質（2 g）
- 被験物質に関する資料（使用記録，調製記録，その他）
- 生データ（投与記録，体重測定記録，症状観察記録，ゲノム DNA 抽出記録，突然変異頻度測定結果，その他）
- 摘出器官
- 最終報告書（原本）
- その他の試験関係資料

19. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかったこと

1) 【内容】

200 mg/kg 群において 6 匹中 2 例の死亡が認められ, 評価数 5 匹が確保できなかった.

【判定】

評価匹数が 1 匹欠けたことにより統計学的検出力の低下が考えられるが，当該用量における肝臓，骨髄，胃および精巣いずれの臓器の *gpt* assay および Spi$^-$ assay の変異頻度の平均値も陰性対照群の平均値の 1.5 倍未満であり明確な増加は認められていないこと，標準偏差も陰性対照群を含む他の群と比較して大きな違いが認められていないこと，さらに明らかな用量相関性も認められていないことから，本事象が，試験に評価に影響することはないと判断した.

Table 1. Mortality in dose-finding study of 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment 1	2	3	4	5	6	7	8	Mortality
2-Vinylpyridine	20.0	1101	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		1102	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		1103	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
	60.0	1201	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		1202	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		1203	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
	200	1301	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		1302	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		1303	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
	600	1401	Dead								3 / 3
		1402	Dead								
		1403	Dead								

Table 2. Gross findings in dose-finding study of 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Sex: Male Group : 2-Vinylpyridine

Group	Animal ID-No.	Classification	Experimental day	Organ	Findings and comments
20.0 mg/kg	1101	Sacrificed	8	Normal	
	1102	Sacrificed	8	Kidney	Cyst, single, left, diameter 1 mm
	1103	Sacrificed	8	Normal	
60.0 mg/kg	1201	Sacrificed	8	Normal	
	1202	Sacrificed	8	Normal	
	1203	Sacrificed	8	Spleen	Black patch, single, 4x3 mm
200 mg/kg	1301	Sacrificed	8	Normal	
	1302	Sacrificed	8	Normal	
	1303	Sacrificed	8	Normal	
600 mg/kg	1401	Dead	1	Spleen	Black patch, single, 5x3 mm
	1402	Dead	1	Normal	
	1403	Dead	1	Lung	Red,focal, multiple, bilateral, 5x2 mm

Table 3. Induction of mutation (*gpt* assay) in liver of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times10^{-6}$)	Group Mean ± S.D. ($\times10^{-6}$)
D.W.	0	2001	5,664,000	10	1.77	
		2002	3,279,000	7	2.13	
		2003	1,209,000	8	6.62	2.54 ± 2.33
		2004	4,182,000	5	1.20	
		2005	2,070,000	2	0.97	
2-Vinylpyridine	20.0	2101	4,107,000	3	0.73	
		2102	1,398,000	7	5.01	
		2103	3,129,000	8	2.56	1.94 ± 1.89
		2104	1,551,000	1	0.64	
		2105	3,852,000	3	0.78	
	60.0	2201	3,024,000	4	1.32	
		2202	2,958,000	6	2.03	
		2203	2,004,000	3	1.50	2.10 ± 1.19
		2204	1,917,000	8	4.17	
		2205	2,019,000	3	1.49	
	200	2301	2,520,000	8	3.17	
		2303	2,244,000	2	0.89	
		2305	2,523,000	4	1.59	1.55 ± 1.16
		2306	1,794,000	1	0.56	
ENU	100	2401	1,518,000	11	7.25	
		2402	1,236,000	10	8.09	
		2403	1,461,000	12	8.21	10.00 ± 5.90 *(S)
		2404	1,992,000	12	6.02	
		2405	2,154,000	44	20.43	

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)
ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)
(S): Student t test
*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

Table 4. Induction of mutation (*gpt* assay) in bone marrow of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times10^{-6}$)	Group Mean ± S.D. ($\times10^{-6}$)
D.W.	0	2001	1,587,000	3	1.89	
		2002	1,200,000	4	3.33	
		2003	1,524,000	4	2.62	2.78 ± 0.72
		2004	1,902,000	7	3.68	
		2005	843,000	2	2.37	
2-Vinylpyridine	20.0	2101	1,779,000	4	2.25	
		2102	1,776,000	2	1.13	
		2103	807,000	2	2.48	1.75 ± 0.58
		2104	2,094,000	3	1.43	
		2105	1,377,000	2	1.45	
	60.0	2201	1,539,000	1	0.65	
		2202	2,409,000	2	0.83	
		2203	1,329,000	5	3.76	2.07 ± 1.34
		2204	1,353,000	4	2.96	
		2205	1,842,000	4	2.17	
	200	2301	1,575,000	4	2.54	
		2303	1,536,000	4	2.60	
		2305	1,464,000	6	4.10	3.21 ± 0.77
		2306	1,386,000	5	3.61	
ENU	100	2401	957,000	28	29.26	
		2402	1,842,000	86	46.69	
		2403	1,587,000	64	40.33	41.40 ± 7.93 *(A)
		2404	1,302,000	53	40.71	
		2405	1,479,000	74	50.03	

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)
ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)
(A): Aspin-Welch t test
*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

Table 5. Induction of mutation (*gpt* assay) in stomach of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times10^{-6}$)	Group Mean ± S.D. ($\times10^{-6}$)
D.W.	0	2001	948,000	8	8.44	
		2002	1,908,000	2	1.05	
		2003	1,863,000	2	1.07	3.76 ± 3.17
		2004	1,287,000	7	5.44	
		2005	1,068,000	3	2.81	
2-Vinylpyridine	20.0	2101	1,257,000	6	4.77	
		2102	2,205,000	11	4.99	
		2103	2,085,000	1	0.48	3.01 ± 2.31
		2104	2,010,000	1	0.50	
		2105	1,395,000	6	4.30	
	60.0	2201	2,145,000	3	1.40	
		2202	960,000	2	2.08	
		2203	1,257,000	2	1.59	1.74 ± 0.36
		2204	3,429,000	5	1.46	
		2205	924,000	2	2.16	
	200	2301	2,250,000	2	0.89	
		2303	2,175,000	3	1.38	
		2305	2,223,000	1	0.45	1.00 ± 0.42
		2306	1,587,000	2	1.26	
ENU	100	2401	1,761,000	27	15.33	
		2402	1,020,000	41	40.20	
		2403	1,281,000	28	21.86	33.25 ± 16.83 *(A)
		2404	1,308,000	40	30.58	
		2405	1,218,000	71	58.29	

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)
ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)
(A): Aspin-Welch t test
*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

Table 6. Induction of mutation (*gpt* assay) in testis of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times10^{-6}$)	Group Mean ± S.D. ($\times10^{-6}$)
D.W.	0	2001	1,428,000	3	2.10	
		2002	1,374,000	12	8.73	
		2003	3,387,000	2	0.59	2.59 ± 3.49
		2004	2,220,000	2	0.90	
		2005	3,111,000	2	0.64	
2-Vinylpyridine	20.0	2101	2,571,000	4	1.56	
		2102	2,061,000	0	0.00	
		2103	3,015,000	4	1.33	0.82 ± 0.63
		2104	2,796,000	2	0.72	
		2105	1,992,000	1	0.50	
	60.0	2201	2,994,000	1	0.33	
		2202	2,859,000	2	0.70	
		2203	2,127,000	0	0.00	0.55 ± 0.38
		2204	2,424,000	2	0.83	
		2205	2,205,000	2	0.91	
	200	2301	2,370,000	0	0.00	
		2303	2,688,000	3	1.12	
		2305	2,115,000	3	1.42	0.85 ± 0.61
		2306	2,355,000	2	0.85	
ENU	100	2401	3,183,000	2	0.63	
		2402	2,931,000	3	1.02	
		2403	3,054,000	14	4.58	2.27 ± 1.56
		2404	2,754,000	7	2.54	
		2405	2,715,000	7	2.58	

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)
ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

Table 7. Induction of mutation (Spi^- assay) in liver of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times10^{-6}$)	Group Mean ± S.D. ($\times10^{-6}$)
D.W.	0	2001	423,000	5	11.82	
		2002	1,200,000	6	5.00	
		2003	369,000	2	5.42	6.05 ± 3.77
		2004	4,287,000	6	1.40	
		2005	759,000	5	6.59	
2-Vinylpyridine	20.0	2101	3,954,000	6	1.52	
		2102	1,005,000	2	1.99	
		2103	618,000	2	3.24	2.20 ± 1.13
		2104	870,000	3	3.45	
		2105	3,738,000	3	0.80	
	60.0	2201	783,000	4	5.11	
		2202	1,791,000	7	3.91	
		2203	1,044,000	3	2.87	5.72 ± 3.39
		2204	963,000	5	5.19	
		2205	780,000	9	11.54	
	200	2301	5,274,000	6	1.14	
		2303	1,149,000	1	0.87	
		2305	4,260,000	4	0.94	1.32 ± 0.68
		2306	1,716,000	4	2.33	
PhIP #	400 ppm	4-1	4,011,000	52	12.96	
		4-2	612,000	23	37.58	26.88 ± 12.62
		4-3	2,094,000	63	30.09	

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)
PhIP: Positive control (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, dietary administration)
#: The samples stored for other experiment were used in this study.

Table 8. Induction of mutation (Spi^- assay) in bone marrow of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times10^{-6}$)	Group Mean ± S.D. ($\times10^{-6}$)
D.W.	0	2001	711,000	2	2.81	
		2002	630,000	0	0.00	
		2003	1,023,000	4	3.91	2.95 ± 2.16
		2004	909,000	2	2.20	
		2005	513,000	3	5.85	
2-Vinylpyridine	20.0	2101	906,000	4	4.42	
		2102	912,000	3	3.29	
		2103	522,000	1	1.92	6.38 ± 6.44
		2104	879,000	4	4.55	
		2105	789,000	14	17.74	
	60.0	2201	1,263,000	2	1.58	
		2202	897,000	1	1.11	
		2203	684,000	2	2.92	1.92 ± 0.70
		2204	879,000	2	2.28	
		2205	1,179,000	2	1.70	
	200	2301	810,000	2	2.47	
		2303	840,000	2	2.38	
		2305	1,005,000	0	0.00	2.23 ± 1.68
		2306	1,224,000	5	4.08	

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)

Table 9. Induction of mutation (Spi^- assay) in stomach of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times10^{-6}$)	Group Mean ± S.D. ($\times10^{-6}$)
D.W.	0	2001	648,000	4	6.17	
		2002	1,050,000	5	4.76	
		2003	438,000	3	6.85	4.64 ± 1.93
		2004	1,704,000	4	2.35	
		2005	324,000	1	3.09	
2-Vinylpyridine	20.0	2101	540,000	3	5.56	
		2102	912,000	5	5.48	
		2103	309,000	0	0.00	3.98 ± 2.59
		2104	975,000	6	6.15	
		2105	1,473,000	4	2.72	
	60.0	2201	924,000	4	4.33	
		2202	843,000	3	3.56	
		2203	942,000	9	9.55	5.73 ± 2.58
		2204	693,000	5	7.22	
		2205	504,000	2	3.97	
	200	2301	495,000	5	10.10	
		2303	408,000	2	4.90	
		2305	609,000	4	6.57	6.71 ± 2.37
		2306	762,000	4	5.25	

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)

Table 10. Induction of mutation (Spi^- assay) in testis of transgenic mice treated with 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times10^{-6}$)	Group Mean ± S.D. ($\times10^{-6}$)
D.W.	0	2001	708,000	1	1.41	
		2002	819,000	1	1.22	
		2003	3,861,000	0	0.00	2.85 ± 2.78
		2004	762,000	4	5.25	
		2005	945,000	6	6.35	
2-Vinylpyridine	20.0	2101	768,000	5	6.51	
		2102	1,131,000	2	1.77	
		2103	1,479,000	1	0.68	2.92 ± 2.96
		2104	888,000	5	5.63	
		2105	981,000	0	0.00	
	60.0	2201	1,215,000	4	3.29	
		2202	1,155,000	1	0.87	
		2203	747,000	1	1.34	1.69 ± 0.97
		2204	948,000	1	1.05	
		2205	1,062,000	2	1.88	
	200	2301	1,200,000	3	2.50	
		2303	1,542,000	3	1.95	
		2305	1,080,000	2	1.85	3.31 ± 2.44
		2306	864,000	6	6.94	

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)

Appendix 1. Body weight in dose-finding study of 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g) Day -8 (Received)	Day -1 (Allocated)	Day 8 (Sacrificed)	Dead (Day 1)	Gain (g)
2-Vinylpyridine	20.0	1101	21.4	24.0	24.4		0.4
		1102	22.5	24.9	24.6		-0.3
		1103	21.7	24.7	24.5		-0.2
		Mean±S.D.	21.9±0.6	24.5±0.5	24.5±0.1		0.0±0.4
	60.0	1201	23.0	25.8	25.2		-0.6
		1202	22.0	24.2	23.9		-0.3
		1203	22.6	24.6	24.7		0.1
		Mean±S.D.	22.5±0.5	24.9±0.8	24.6±0.7		-0.3±0.4
	200	1301	22.4	24.1	24.6		0.5
		1302	23.6	25.4	25.1		-0.3
		1303	22.7	24.5	24.9		0.4
		Mean±S.D.	22.9±0.6	24.7±0.7	24.9±0.3		0.2±0.4
	600	1401	22.6	24.6		24.4	
		1402	23.3	26.0		25.0	
		1403	21.2	23.5		23.2	
		Mean±S.D.	22.4±1.1	24.7±1.3		24.2±0.9	

Gain= Day 8(Sacrificed)-Day -1(Allocated)

Appendix 2. Clinical observations in dose-finding study of 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment 1	2	3	4	5	6	7	8
2-Vinylpyridine	20.0	1101	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N
	60.0	1201	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N
	200	1301	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N
	600	1401	Dla,St,Ir, Pt,La,D							
		1402	Dla,St,Ir, Pt,La,D							
		1403	Dla,St,Ir, Pt,La,D							

N: Normal, D: Dead, Dla: Decrease in locomotor activity, St: Staggering,
Ir: Irregular respiration, Pt: Ptosis (ocular region), La: Lacrimation

Appendix 3. Body weight in the gene mutation assay of 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g) Day -9 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 31 (Sacrificed)	Gain
D.W.	0	2001	26.2	26.7	26.6	26.9	27.1	27.3	27.7	1.0
		2002	25.8	27.5	27.5	26.9	27.5	27.6	27.9	0.4
		2003	24.5	25.6	25.7	25.3	25.7	25.5	25.2	-0.4
		2004	24.0	26.1	26.1	26.1	27.6	27.2	27.6	1.5
		2005	24.9	26.0	25.7	26.3	26.3	26.7	26.6	0.6
		2006	24.0	25.0	25.5	26.1	27.6	28.2	27.6	2.6
		Mean±S.D.	24.9±0.9	26.2±0.9	26.2±0.8	26.3±0.6	27.0±0.8	27.1±0.9	27.1±1.0	1.0±1.0
2-Vinylpyridine	20.0	2101	25.5	27.2	27.6	27.3	27.6	27.5	27.3	0.1
		2102	26.2	25.9	26.1	25.1	26.0	26.8	26.9	1.0
		2103	24.8	25.7	25.6	25.2	25.7	26.5	26.6	0.9
		2104	23.4	26.4	25.5	25.4	26.2	26.1	26.4	0.0
		2105	24.1	25.0	24.7	25.6	26.2	26.2	26.1	1.1
		2106	24.5	26.7	26.8	26.2	27.0	26.8	26.9	0.2
		Mean±S.D.	24.8±1.0	26.2±0.8	26.1±1.0	25.8±0.8	26.5±0.7	26.7±0.5	26.7±0.4	0.6±0.5
	60.0	2201	25.7	25.3	26.6	26.4	26.5	26.3	27.0	1.7
		2202	26.8	27.5	27.8	27.8	28.4	27.7	27.3	-0.2
		2203	26.7	26.4	27.9	27.2	27.8	27.4	27.3	0.9
		2204	26.0	26.7	26.6	26.7	27.2	26.8	26.8	0.1
		2205	24.5	25.1	24.9	25.1	25.1	24.5	24.7	-0.4
		2206	24.5	25.7	25.7	25.6	25.9	25.6	25.4	-0.3
		Mean±S.D.	25.7±1.0	26.1±0.9	26.6±1.2	26.5±1.0	26.8±1.2	26.4±1.2	26.4±1.1	0.3±0.8
	200	2301	24.6	26.1	25.2	24.7	25.1	24.4	24.1	-2.0
		2302	25.1	26.6	18.4	18.5 D*				
		2303	24.8	25.7	24.8	25.3	24.7	24.3	23.4	-2.3
		2304	25.6	27.0	21.6	19.4 D**				
		2305	24.0	25.1	23.7	25.3	25.7	25.5	25.1	0.0
		2306	25.7	27.8	26.5	26.3	27.1	26.3	26.4	-1.4
		Mean±S.D.	25.0±0.6	26.4±1.0	24.4±1.8	25.4±0.7	25.7±1.1	25.1±1.0	24.8±1.3	-1.4±1.0

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)
Gain= Sacrificed-Day 1(Allocated)
D: Dead, *: Dead at Day 8, **: Dead at Day 9

Appendix 3. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Body weight (g) Day -9 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 14 (Sacrificed)	Gain
ENU	100	2401	25.8	26.4	25.2	-1.2
		2402	25.0	25.1	25.4	0.3
		2403	24.5	25.4	24.3	-1.1
		2404	25.1	26.7	25.8	-0.9
		2405	25.1	25.8	26.0	0.2
		2406	25.4	27.0	26.5	-0.5
		Mean±S.D.	25.2±0.4	26.1±0.8	25.5±0.8	-0.5±0.7

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)
Gain= Sacrificed-Day 1(Allocated)

Appendix 4. Clinical observations in the gene mutation assay of 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment 1	2	3	4	5	6	7
D.W.	0	2001	N	N	N	N	N	N	N
		2002	N	N	N	N	N	N	N
		2003	N	N	N	N	N	N	N
		2004	N	N	N	N	N	N	N
		2005	N	N	N	N	N	N	N
		2006	N	N	N	N	N	N	N
2-Vinylpyridine	20.0	2101	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N
		2106	N	N	N	N	N	N	N
	60.0	2201	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N
		2204	N	N	N	N	N	N	N
		2205	N	N	N	N	N	N	N
		2206	N	N	N	N	N	N	N
	200	2301	La, Sa	N	N	N	N	N	N
		2302	La, Sa	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N
		2304	La, Sa	N	N	N	N	N	N
		2305	Sa	N	N	N	N	N	N
		2306	Sa	N	N	N	N	N	N

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)
N: Normal La: Lacrimation Sa: Salivation

Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment 1	2	3	4	5	6	7
ENU	100	2401	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N
		2404	N	N	N	N	N	N	N
		2405	N	N	N	N	N	N	N
		2406	N	N	N	N	N	N	N

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)
N: Normal

Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment 8	9	10	11	12	13	14
D.W.	0	2001	N	N	N	N	N	N	N
		2002	N	N	N	N	N	N	N
		2003	N	N	N	N	N	N	N
		2004	N	N	N	N	N	N	N
		2005	N	N	N	N	N	N	N
		2006	N	N	N	N	N	N	N
2-Vinylpyridine	20.0	2101	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N
		2106	N	N	N	N	N	N	N
	60.0	2201	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N
		2204	N	N	N	N	N	N	N
		2205	N	N	N	N	N	N	N
		2206	N	N	N	N	N	N	N
	200	2301	N	N	N	N	N	N	N
		2302	Ir,SoF,SoA,D						
		2303	N	N	N	N	N	N	N
		2304	SoA	D					
		2305	N	N	N	N	N	N	N
		2306	N	N	N	N	N	N	N

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)
N: Normal Ir: Irregular respiration SoF: Soiled fur (face) SoA: Soiled fur (anogenital region) D: Dead

Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment 8	9	10	11	12	13	14
ENU	100	2401	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N
		2404	N	N	N	N	N	N	N
		2405	N	N	N	N	N	N	N
		2406	N	N	N	N	N	N	N

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)
N: Normal

Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment 15	16	17	18	19	20	21
D.W.	0	2001	N	N	N	N	N	N	N
		2002	N	N	N	N	N	N	N
		2003	N	N	N	N	N	N	N
		2004	N	N	N	N	N	N	N
		2005	N	N	N	N	N	N	N
		2006	N	N	N	N	N	N	N
2-Vinylpyridine	20.0	2101	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N
		2106	N	N	N	N	N	N	N
	60.0	2201	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N
		2204	N	N	N	N	N	N	N
		2205	N	N	N	N	N	N	N
		2206	N	N	N	N	N	N	N
	200	2301	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N
		2305	N	N	N	N	N	N	N
		2306	N	N	N	N	N	N	N

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)
N: Normal

Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment 22	23	24	25	26	27	28
D.W.	0	2001	N	N	N	N	N	N	N
		2002	N	N	N	N	N	N	N
		2003	N	N	N	N	N	N	N
		2004	N	N	N	N	N	N	N
		2005	N	N	N	N	N	N	N
		2006	N	N	N	N	N	N	N
2-Vinylpyridine	20.0	2101	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N
		2106	N	N	N	N	N	N	N
	60.0	2201	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N
		2204	N	N	N	N	N	N	N
		2205	N	N	N	N	N	N	N
		2206	N	N	N	N	N	N	N
	200	2301	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N
		2305	N	N	N	N	N	N	N
		2306	N	N	N	N	N	N	N

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)
N: Normal

Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment 29	30	31
D.W.	0	2001	N	N	N
		2002	N	N	N
		2003	N	N	N
		2004	N	N	N
		2005	N	N	N
		2006	N	N	N
2-Vinylpyridine	20.0	2101	N	N	N
		2102	N	N	N
		2103	N	N	N
		2104	N	N	N
		2105	N	N	N
		2106	N	N	N
	60.0	2201	N	N	N
		2202	N	N	N
		2203	N	N	N
		2204	N	N	N
		2205	N	N	N
		2206	N	N	N
	200	2301	N	N	N
		2303	N	N	N
		2305	N	N	N
		2306	N	N	N

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)
N: Normal

Appendix 5. Organ weight in the gene mutation assay of 2-vinylpyridine
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)	Organ weight(g) and organ weight per body weight(%)			
				Liver		Testis	
				(g)	(%)	(g)	(%)
D.W.	0	2001	27.7	1.45	5.23	0.20	0.72
		2002	27.9	1.46	5.23	0.21	0.75
		2003	25.2	1.19	4.72	0.20	0.79
		2004	27.6	1.40	5.07	0.22	0.80
		2005	26.6	1.38	5.19	0.21	0.79
		2006	27.6	1.09	3.95	0.20	0.72
		Mean±S.D.	27.1±1.04	1.3±0.15	4.9±0.49	0.2±0.01	0.8±0.04
2-Vinylpyridine	20.0	2101	27.3	1.36	4.98	0.21	0.77
		2102	26.9	1.28	4.76	0.20	0.74
		2103	26.6	1.32	4.96	0.18	0.68
		2104	26.4	1.28	4.85	0.20	0.76
		2105	26.1	1.30	4.98	0.20	0.77
		2106	26.9	1.39	5.17	0.20	0.74
		Mean±S.D.	26.7±0.42	1.3±0.04	5.0±0.14	0.2±0.01	0.7±0.03
	60.0	2201	27.0	1.48	5.48	0.27	1.00
		2202	27.3	1.03	3.77	0.21	0.77
		2203	27.3	1.34	4.91	0.21	0.77
		2204	26.8	1.36	5.07	0.22	0.82
		2205	24.7	1.25	5.06	0.19	0.77
		2206	25.4	1.18	4.65	0.19	0.75
		Mean±S.D.	26.4±1.1	1.3±0.16	4.8±0.58	0.2±0.03	0.8±0.09

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)

Appendix 5. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)	Organ weight(g) and organ weight per body weight(%)			
				Liver		Testis	
				(g)	(%)	(g)	(%)
2-Vinylpyridine	200	2301	24.1	1.26	5.23	0.21	0.87
		2303	23.4	1.21	5.17	0.20	0.85
		2305	25.1	1.45	5.78	0.20	0.80
		2306	26.4	1.44	5.45	0.21	0.80
		Mean±S.D.	24.8±1.3	1.3±0.12	5.4±0.28	0.2±0.01	0.8±0.04
ENU	100	2401	25.2	1.29	5.12	0.21	0.83
		2402	25.4	1.34	5.28	0.14	0.55
		2403	24.3	1.32	5.43	0.16	0.66
		2404	25.8	1.35	5.23	0.16	0.62
		2405	26.0	1.40	5.38	0.14	0.54
		2406	26.5	1.44	5.43	0.17	0.64
		Mean±S.D.	25.5±0.76	1.4±0.05	5.3±0.13	0.2±0.03	0.6±0.10

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

Appendix 6. Individual gross findings on 2-vinylpyridine-treated transgenic mice for the gene mutation assay
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
D.W.	0	2001	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2002	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2003	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2004	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2005	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2006	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

D.W.: Negative control (Water for injection, 20 mL/kg)
-: No remarkable change

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
2-Vinylpyridine	20.0	2101	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2102	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2103	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2104	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2105	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2106	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

-: No remarkable change

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
2-Vinylpyridine	60.0	2201	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	Hypertrophic, left
		2202	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2203	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2204	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2205	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2206	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

-: No remarkable change

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
2-Vinylpyridine	200	2301	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2303	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2305	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2306	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

-: No remarkable change

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Organs	Findings
ENU	100	2401	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2402	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2403	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2404	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2405	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2406	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

ENU: Positive control (N-ethyl-N-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)
-: No remarkable change

信 頼 性 保 証 書

表　　題：　トランスジェニックマウスを用いる 2-Vinylpyridine の遺伝子突然変異試験

試験番号：　D849（ 115－224 ）

本試験は，新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について（平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 8 号，平成 23・03・29 製局第 6 号，環保企発第 110331010 号）に従って実施され，本最終報告書に記載された成績は，試験の生データを正確に反映していることを保証する．

なお，本試験の信頼性保証部門による調査記録を次頁に示す．

平成25 年3 月21 日

所属：　公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
信頼性保証部門責任者

氏名：　[redacted]

調 査 記 録

調査項目	調査実施日	試験責任者および 運営管理者への報告日	調査 担当者
試験計画書	平成 24 年 2 月 13 日	平成 24 年 2 月 13 日	[redacted]
試験計画書の変更書（#1）	平成 24 年 2 月 21 日	平成 24 年 2 月 21 日	
試験計画書の変更書（#2）	平成 24 年 3 月 23 日	平成 24 年 3 月 23 日	
コンピュータプロトコール（LATOX-F/V5）	平成 24 年 4 月 9 日	平成 24 年 4 月 9 日	
動物搬入	平成 24 年 4 月 9 日	平成 24 年 4 月 9 日	
試験計画書の変更書（#3）	平成 24 年 4 月 10 日	平成 24 年 4 月 10 日	
被験物質液の調製，群分けおよび投与開始	平成 24 年 4 月 18 日	平成 24 年 4 月 18 日	
試験計画書の変更書（#4）	平成 24 年 5 月 7 日	平成 24 年 5 月 7 日	
標的器官摘出	平成 24 年 5 月 18 日	平成 24 年 5 月 21 日	
ゲノム DNA の抽出	平成 24 年 7 月 2 日	平成 24 年 7 月 3 日	
ゲノム DNA のパッケージング，プレーティング（Spi⁻ assay）	平成 24 年 7 月 24 日	平成 24 年 7 月 24 日	
プラークの計数	平成 24 年 7 月 25 日	平成 24 年 7 月 25 日	
生データおよび最終報告書草案	平成 24 年 11 月 16，19 日	平成 24 年 11 月 19 日	
生データおよび最終報告書	平成 25 年 3 月 21 日	平成 25 年 3 月 21 日	