

最終報告書

表 題：2-ビニルピリジンのラットにおける簡易生殖試験

試験番号：S R 0 8 2 2 3

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

	頁
表紙-----	1
目次-----	5
要約-----	12
緒言-----	14
材料および方法-----	14
成績-----	26
考察-----	31
参考文献-----	35

Figures

1	Body weight of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223) -----	36
2	Body weight of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223) -----	37
3	Food consumption of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223) -----	38
4	Food consumption of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223) -----	39
5	Body weight of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2-vinylpyridine in rats (SR08223) -----	40

Tables

1	General appearance of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	41
2	General appearance of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	42
3	Body weight of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	43
4	Body weight before gestation period of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	44
5	Body weight during gestation period of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	45
6	Body weight during lactation period of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	46
7	Food consumption of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	47
8	Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	48
9	Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	49
10	Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	50
11	Gross findings of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	51
12	Gross findings of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	52
13	Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	53
14	Histopathological findings of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	54
15	Histopathological findings of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	55
16	Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	56
17	Reproduction performance of parental rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	58
18	Pregnancy and litter data of rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)	59

19	General appearance of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2-vinylpyridine in rats (SR08223) -----	60
20	Body weight of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2-vinylpyridine in rats (SR08223) -----	61
21	Gross findings of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2-vinylpyridine in rats (SR08223) -----	62

要 約

2-ビニルピリジンの0(対照、トウモロコシ油)、20、50 および 125 mg/kg を1群雄雌各12匹のCr1:CD(SD)ラットに、雄に対しては交配開始前14日間およびその後の28日間を含む計42日間、雌に対しては交配前14日間および交尾成立までの交配期間、交尾成立例は妊娠期間および哺育3日まで1日1回、連日経口投与して、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩等の生殖に及ぼす毒性および次世代の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

I. 親動物について

一般状態では、50 mg/kg 群の雌および 125 mg/kg 群の雌雄に流涎がみられた。125 mg/kg 群ではこのほか、雌の妊娠末期から分娩終了までの間に肛門、外尿道口、口周囲被毛汚染、軟便、自発運動の低下および振戦が認められ、3 例が死亡し、2 例は難産のため安楽死させた。哺育期間では、振戦、間代性痙攣、自発運動の低下および呼吸促迫がみられ、4 例が死亡した。

体重推移および摂餌量では、125 mg/kg 群において、雄で投与21日以降の体重、投与期間の体重増加量および体重増加率ならびに投与2および5日の摂餌量、雌で妊娠3～20日の体重、妊娠期間の体重増加量および哺育0日の体重ならびに投与5日、妊娠3～7日および妊娠20日の摂餌量に有意な低値が認められた。

剖検所見では、前胃の粘膜肥厚が50 mg/kg 群の雌および 125 mg/kg 群の雄雌に、前胃の粘膜表面顆粒状が125 mg/kg 群の雄雌に、副腎の肥大が50 mg/kg 群の雌および 125 mg/kg 群の雄雌に、脾臓の萎縮が50 mg/kg 以上の群の雌に、胸腺の萎縮が50 mg/kg 群の雌および 125 mg/kg 群の雄雌にみられた。

器官重量測定および精巣の精子形成サイクルのStage分類による検査では、被験物質投与に関連した変化はみられなかった。

病理組織学的検査では、20 mg/kg 以上の群の雄雌に前胃の扁平上皮過形成および過角化、50 mg/kg 以上の群の雌に前胃の潰瘍、粘膜下組織の炎症性細胞浸潤、粘膜下組織の線維化がみられた。副腎では、50 mg/kg 群の雌および 125 mg/kg 群の雄雌で束状帯における皮質細胞の肥大、125 mg/kg 群の雌で束状帯の壊死および鉍質沈着がみられた。脾臓では、50 mg/kg 以上の群の雌で白脾髄の萎縮、125 mg/kg 群の雌で赤脾髄の萎縮がみられた。また、胸腺の皮質の萎縮が、50 mg/kg 群の雌および 125 mg/kg 群の雄雌にみられた。

II. 雄雌動物の生殖および新生児の発生について

雄雌動物の生殖および新生児の発生については、50 mg/kg 以上の群で死産、難産等の異常分娩が散見され、125 mg/kg 群で生存児数および出生率の低値傾向ならびに死亡児数の高値傾向がみられた。50 および 125 mg/kg 群では雄雌の新生児の死亡または消失が多数みられた。さらに、125

mg/kg では母動物の哺育行動に異常がみられ、新生児に母動物に咬まれたことに起因する外傷がみられた。新生児の体重では、20 mg/kg 群で雄の生後 1 および雄雌の生後 4 日、50 mg/kg 群で雄雌の生後 0～4 日、125 mg/kg 群で雄雌の生後 0 日に有意な低値がみられた。

なお、125 mg/kg 群では例数が 3 例以下となったため、哺育 4 日の評価項目、哺育 1 日以降の母動物の体重および摂餌量、生後 1 日以降の生存児の体重の統計学的検定は実施しなかった。

したがって、本試験条件下における 2-ビニルピリジンの親動物における無影響量 (NOEL) ならびに親動物の生殖能および次世代の発生・発育に対する無影響量 (NOEL) はいずれも 20 mg/kg/day 未満であると判断された。

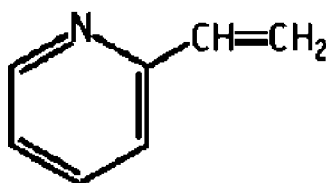
緒 言

2-ビニルピリジンの0(対照、トウモロコシ油)、20、50 および 125 mg/kg を1群雄雌各12匹のCr1:CD(SD)ラットに、雄に対しては交配開始前14日間およびその後の28日間を含む計42日間、雌に対しては交配前14日間および交尾成立までの交配期間、交尾成立例は妊娠期間および哺育3日まで1日1回、連日経口投与して、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩等の生殖に及ぼす毒性および次世代の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

1. 被験物質

名称	: 2-ビニルピリジン ; 2-Vinylpyridine ^{1)~4)}
別名	: 2-エテニルピリジン ; 2-Ethenylpyridine ^{3) 4)}
CAS No.	: 100-69-6 ¹⁾
官報公示整理番号	: 化審法 (5)-716 ^{1) 2) 4)}
構造式	:



分子式	: C ₇ H ₇ N ^{1) ~4)}
分子量	: 105.14 ^{2)~4)}
物理化学的性質	: 外観等 ; 無色から淡黄色液体 ²⁾ 、特異臭 ²⁾ 蒸気圧 ; 1.33kPa (44.5℃) ^{1) 3) 4)} 融点 ; <10℃ ¹⁾ 沸点 ; 158℃ ¹⁾ 、159~160℃ ^{3) 4)} LogPow ; 1.39~1.54 ²⁾ 溶解性 ; 水に微溶、アルコール、エーテル、アセトン、クロロホルム、 多くの有機溶剤に易溶 ¹⁾
純度	: 98.9% (Appendix 1-1) 実験終了後に、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し、安定

であることを確認した(Appendix 1-2)。

不純物の名称およびその濃度：記載なし

入手量 : 500 mL

安定性 : 引火性が強く、燃焼しやすい。蒸気は地面あるいは床に沿って移動することがあり、遠距離引火の可能性がある。熱、光などの影響により、急速に重合する恐れがある¹⁾。

保存条件 : 遮光容器に密栓して冷蔵保管した(実測範囲 3～9℃)。また、酸化剤や強酸から離して保管した。¹⁾

保存場所 : 株式会社 化合物安全性研究所の被験物質保存室

保存期間 : 2010 年 3 月 24 日(受入)～2010 年 9 月 6 日(産業廃棄物として回収)

取扱上の注意 : 手袋、マスクおよび保護メガネを着用し、ドラフト内で取り扱った。

サンプリング : 被験物質サンプルとして、約 10 g を採取し、試験施設の資料保存室に保存した。

残余被験物質の処置 : 試験計画書ではすべての試験操作終了後回収するとしていたが、投与終了後、投与期間中の安定性を確認した後に、焼却処分するために産業廃棄物として回収した。

有害性情報 : 急性毒性 ラット 経口 LD₅₀ 336～951 mg/kg⁴⁾
 マウス 経口 LD₅₀ 420 mg/kg¹⁾
 ラット 吸入 LC₅₀ 610 mg/m³¹⁾
 ウサギ 経皮 LD₅₀ 200～300 mg/kg⁴⁾
 モルモット 経皮 LD₅₀ 160 mg/kg⁴⁾

催涙性がある。皮膚、眼、粘膜を強く刺激し、炎症や薬傷を起こす。眼に入ると失明の恐れがある。吸入及び皮膚接触により感作を引き起こすことがある。変異原性あり。¹⁾

2. 媒体

名称 : トウモロコシ油

ロット番号 : V0A2417

製造者 : ナカライテスク株式会社

保存条件 : 室温

取扱上の注意 : 特になし。

3. 投与液の調製および化学分析

(1) 投与液の調製

- 調製方法 : 被験物質を必要量採取し、所定の濃度となるように媒体を添加後、スターラーを用いて溶解させた。
- 調製頻度 : 7 日に 1 回以上の頻度で調製した。投与液は調製後 9 日以内に投与に用いた。
- 保存条件 : 遮光、冷蔵(実測範囲 2.0～6.3℃)
- 保存場所 : 株式会社 化合物安全性研究所の被験物質保存室
- 保存期間 : 2010 年 6 月 1 日(投与液の調製初回)～2010 年 7 月 19 日(投与液の払出：最終回)
- 調製上の注意 : 調製の際には手袋、マスクおよび保護メガネを着用し、ドラフト内で取り扱った。
- 残余調製液の処置 : 残余の調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

(2) 投与液の化学分析

- 投与液の安定性 : 投与に先駆け、被験物質の 1 および 40 mg/mL の調製液について安定性に関する分析を行い、媒体中における冷蔵保存 9 日(調製日を 0 日として起算) および室温保存 6 時間の安定性を確認した(Appendix 2-1)。
- 投与液の濃度確認 : 初回および最終回の投与に用いる全濃度の被験物質調製液について、被験物質の濃度を分析し、含有率が設定濃度の 101.8～110.0%であることを確認した(Appendix 2-2 および 2-3)。
- 濃度確認方法 : Appendix 2-4 に示す。

4. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター生産の SPF Cr1:CD(SD) ラットを用いた。微生物モニタリングデータは動物生産業者から入手した。ラットは毒性試験等で通常用いられている動物種であり、当研究所での使用経験が豊富であることからこの系統を選定した。

雄雌各 52 匹(発注数 雄雌各 50 匹)を 2010 年 5 月 19 日に 8 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 230～268g、雌で 195～224 g であった。

(2) 検疫および馴化

受入後、個々の動物について雄雌とも馴化 14 日までの 13 日間(受入日を馴化 1 日として起算)、一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を受入時(馴化 1 日)および馴化期間終了日(投与開始前々日)を含め約 1 週に 1 回の頻度で計 3 回測定した。また、雌動物について群分け日までの 9 日間の性周期検査を膣垢スメア塗抹法により行った。検疫および馴化期間中の性周期検査におい

て、雌 2 例に連続非発情がみられた。一般状態および体重推移には、いずれの動物にも異常は認められなかった。

(3) 群分け

検疫および馴化期間中に実施した一般状態観察および体重測定、さらに雌については性周期検査の結果を参考にして、異常の認められない健康な動物を雄雌各 48 匹選抜して、10 週齢で試験に供した。投与開始前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるよう群分けを行った。群分け時の動物の体重範囲は、雄で 320～390 g、雌で 238～293 g であり、平均体重(雄 358.3g、雌 262.4 g)の±20%以内であった。選抜から外れた動物は試験から除外して安楽死させた。なお、選抜された動物について投与開始前日に一般状態に異常がないことを確認した。

(4) 動物およびケージの識別

動物は、群分け前は受入時に油性フェルトペンで尾部に印を付け、群分け後は耳介に動物番号を入墨し、個体識別を行った。新生児については、個体識別を行わなかった。

飼育ケージは、群分け前は性別毎に色分けしたラベルに試験番号および受入時の動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。群分け後は性別毎に色分けしたラベルに試験番号、試験群および群分け後の動物番号を明記し、雌動物には妊娠期間中は交尾成立日毎のグループ名および分娩予定日、哺育期間中は分娩終了日毎のグループ名も明記した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

動物は温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測範囲 20～25℃)、湿度 $50 \pm 20\%$ (実測範囲 47～82%；上限の逸脱は冷凍機の故障による)、換気回数 10～15 回／時間、照明時間 12 時間(8：00～20：00、人工照明)の動物飼育室(310 号室)で飼育した。

2) 飼育器材および飼育方法

ブラケット式金属製金網床ケージ(260W×380D×180H, mm)を使用し、交尾成立雌動物については妊娠 17 日から哺育 4 日まで小型受皿と共に実験動物用床敷(ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社)を使用した。検疫および馴化期間中は 2 匹、群分け後は 1 匹、交配期間中は雄雌各 1 匹、妊娠期間中は 1 匹、哺育期間中は 1 腹毎を収容した。ケージおよび給餌器は群分け時に 1 回交換し、その後は 2 週に 1 回の頻度で交換した。ただし、交尾成立雌動物については妊娠 0 日および 14 日に交換した。受皿は週 2 回、小型受皿は妊娠 20 日に洗浄滅菌済みのものと交換した。自動給水装置の水抜きは週 1 回実施した。動物飼育室内の清掃および清拭消毒は、1 日 1 回実施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を 1 週間単位で交互に使用した。

3) 飼料

オリエンタル酵母工業株式会社製固型飼料 CRF-1 を、金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の分析あるいは微生物検査を、使用した各ロット(100203、100302、100406)の飼料について実施した。汚染物質の分析はEurofins Analytics 社または財団法人 日本食品分析センターが、微生物検査は飼料製造業者がそれぞれ行った。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも規定された許容値を超える値は認められなかった(Appendix 3-1-1～3-2-3)。

4) 飲料水

札幌市水道水を、自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の分析を、2010年4月1日、2010年7月1日および2010年10月1日に当該飼育室と同系統配管の最末端(306号室)から試料を採取して実施した。分析は日本衛生株式会社が行った。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも規定された許容値を超える値は認められなかった(Appendix 4-1～4-3)。

(6) 試験群の構成

試験群の構成

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数(動物番号)	
			雄	雌
対照群	0	0	12 (101～112)	12 (151～162)
低用量群	20	4	12 (201～212)	12 (251～262)
中用量群	50	10	12 (301～312)	12 (351～362)
高用量群	125	25	12 (401～412)	12 (451～462)

対照群には、他の群と同様の方法で媒体のみを投与した。

(7) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

投与量 : 0、20、50 および 125 mg/kg/day

設定理由 : 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ならびに92日間反復経口投与毒性試験の結果を参考にして設定した。28日間反復経口投与毒性試験(投与量:12.5、50 および 200 mg/kg)⁵⁾では、50 mg/kg以上の群で流涎、胃の変化(扁平上皮増生、浮腫等)等が認められた。また、200 mg/kg群では雄の体重増加抑制および摂餌量の減少、精巣重量の増加等が認められた。92日間反復経口投与毒性試験(投与量:20、60 および 180 mg/kg)⁶⁾では、60 mg/kg以上の群で胃に粘膜肥厚、角化、水腫等の変化がみられた。180 mg/kg群では痙攣、流涎、雄の体重増加抑制が認められたほか、雄で睪丸相対重量の有意な増加、雌で卵巣相対重量の有意な増加がみられた。一方、180 mg/kgまでの用量に生殖器官の組織に異常は認められなかった。これらの情報および本試験の投与期間を考慮して、雄雌の

親動物に一般毒性学的影響（胃の変化、雄の体重増加抑制）がみられることが予想される 125 mg/kg を高用量とし、以下公比 2.5 で除して 50 および 20 mg/kg を設定した。その他に、媒体のみを同様の方法で投与する対照群を設けた。

2) 投与

投与方法および投与経路：ディスポーザブル胃ゾンデおよびディスポーザブルシリンジを用いて強制的に胃内に経口投与した。

投与回数 : 1 日 1 回、連日投与した。

投与時刻 : 9 : 05～11 : 43 の間（ただし、投与時に分娩中であった母動物は分娩終了後 13 : 02 までの間）に投与した。

投与期間 : 雄；交配開始前 14 日間およびその後の 28 日間、計 42 日間
雌；交配前 14 日間および交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は妊娠期間および哺育 3 日までの期間

投与容量 : 5 mL/kg とした。各個体の投与液量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて算出した。

投与方法、投与経路、投与回数および投与期間の選定理由：試験法ガイドラインを参考にした。

(8) 観察、測定および検査項目

I. 雄動物について

1) 一般状態観察

例数 : 全例

期間 : 投与開始日を投与 1 日として起算し、投与 1 日から投与 42 日の翌日の剖検日まで。

頻度 : 投与前(午前)および投与後(午後)の 1 日 2 回以上。
ただし、剖検日は午前中に 1 回。

観察方法 : 個々の動物の生死、外観、行動等について観察した。異常が認められる場合は、その症状ならびに症状の持続期間を記録した。

2) 体重測定

例数 : 全例

測定日 : 投与開始日を投与 1 日と起算し、投与 1、2、5、7、10、14、その後は 7 日毎の投与前、投与終了日および剖検日に測定した。

測定方法 : 電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて測定し、1 g 単位で記録した。

体重増加量および体重増加率：以下の式により算出した。

$$\begin{aligned}\text{体重増加量(g)} &= \text{投与 42 日体重(g)} - \text{投与 1 日体重(g)} \\ \text{体重増加率(\%)} &= \frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{投与 1 日体重(g)}} \times 100\end{aligned}$$

3) 摂餌量測定

例数 : 全例
測定日 : 交配期間および剖検日を除き、体重測定と同じ日に測定した。
測定方法 : 電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて測定し、1 g 単位で記録した。投与開始前日に適当量を測定してケージ毎に給与し、その後は測定日に残量および給与量を測定した。ただし、剖検前日は残量のみを測定した。
摂餌量の算出 : 以下の式により算出した。

$$\text{摂餌量(g/day)} = \frac{\text{給与量(g)} - \text{残量(g)}}{\text{測定日間の日数(day)}}$$

4) 剖検

例数 : 全例
検査時期 : 投与 42 日の翌日に実施した。
検査方法 : 体外表を観察した後、エーテル麻酔下で放血により安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。また、以下の器官・組織を10%中性緩衝ホルマリンに固定・保存した。なお、精巣および精巣上体はブアン液で固定、70%エタノールに保存した。対の器官は左右とも保存した。

固定・保存した器官または組織：

胃、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、精囊（凝固腺含む）および肉眼的異常部位（正常組織との境界部を含む）。

5) 器官重量測定

例数・時期 : 剖検時に全例について実施した。
測定方法 : 以下の器官・組織について、電子式上皿天秤(ER-180A、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて左右併せて測定した。
検査器官 : 精巣、精巣上体
相対重量の算出 : 以下の式により算出した。

$$\text{相対重量(\%)} = \frac{\text{絶対重量(g)}}{\text{剖検日体重(g)}} \times 100$$

6) 病理組織学的検査

例数 : 全例について標本作製し、対照群および高用量群の全例について

鏡検した。その結果、精巣および精巣上体については被験物質投与の影響と考えられる変化が認められなかったため、その他の投与群については鏡検しなかった。また、雄または雌の剖検で前胃、脾臓および副腎に被験物質投与に関連すると考えられる異常所見がみられたことから、これらの組織についても全例の病理組織学的検査を行った。

さらに、その他の剖検時の肉眼的異常部位についても鏡検した。

検査方法 : パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検した。

器官・組織名 : 左右の精巣(精子形成の Stage 分類を含む)、精巣上体、前胃、脾臓および副腎。剖検時の肉眼的異常部位：胸腺の萎縮（動物番号 403）。

II. 雌動物について

1) 一般状態観察

例数 : 全例

期間 : 投与開始日から剖検日まで

頻度 : I. 雄動物と同じ

観察方法 : I. 雄動物と同じ。なお、死亡した動物は発見後速やかに、衰弱の著しい動物はエーテル麻酔下で放血して安楽死させた後剖検した。

2) 体重測定

例数 : 全例

測定日 : 投与開始日を投与 1 日、交尾成立日を妊娠 0 日、分娩終了日を哺育 0 日と起算し、以下の日に測定した。

投与 1、2、5、7、10、14 日の投与前、

妊娠 0、1、3、5、7、10、14、17 および 20 日の投与前、

哺育 0 および 1 日の投与前、ならびに哺育 4 日の剖検日

交配期間中は投与液量算出のため、相手雄の測定日と同じ日に測定した。

死亡例および安楽死例については、死亡発見時または安楽死させた日の体重も記録した。

測定方法 : I. 雄動物と同じ

体重増加量および体重増加率：以下の式により算出した。

交配前投与期間

体重増加量(g) = 投与 14 日体重(g) - 投与 1 日体重(g)

体重増加率(%) = $\frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{投与 1 日体重(g)}} \times 100$

妊娠期間

$$\text{体重増加量(g)} = \text{妊娠 20 日体重(g)} - \text{妊娠 0 日体重(g)}$$

$$\text{体重増加率(\%)} = \frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{妊娠 0 日体重(g)}} \times 100$$

哺育期間

$$\text{体重増加量(g)} = \text{哺育 4 日体重(g)} - \text{哺育 0 日体重(g)}$$

$$\text{体重増加率(\%)} = \frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{哺育 0 日体重(g)}} \times 100$$

3) 摂餌量測定

例数 : 全例

測定日 : 交配期間を除き、Ⅱ.、2) 体重測定の測定日と同じ。

測定方法 : Ⅰ. 雄動物と同じ。ただし、妊娠 20 日は残量、哺育 0 日は給与量のみ。

4) 剖検

例数 : 全例

検査時期 : 哺育 4 日

ただし、死亡例は発見後速やかに、衰弱例は安楽死させた日に、また異常出産例および哺育児が全て死亡した例は発見後速やかに実施した。

検査方法 : Ⅰ. 雄動物と同様に剖検し、以下の器官・組織を 10% 中性緩衝ホルマリンに固定・保存した。対の器官は左右とも保存した。妊娠黄体数および着床痕数を数えた。

固定・保存した器官または組織 :

胃、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巢、子宮、乳腺および肉眼的異常部位(正常組織との境界部を含む)。

5) 病理組織学的検査

例数 : 全例について標本作製し、対照群および高用量群の全例について鏡検した。その結果、卵巢には被験物質投与の影響と考えられる変化が認められなかったため、その他の投与群については鏡検しなかった。また、剖検で前胃、脾臓および副腎に被験物質投与に関連すると考えられる異常所見がみられたことから、これらの組織についても全例の病理組織学的検査を行った。

さらに、剖検時の肉眼的異常部位についても鏡検した。

検査方法 : パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製して鏡検した。

器官・組織名 : 卵巣、前胃、脾臓および副腎。剖検時の肉眼的異常部位：胸腺の萎縮（動物番号 357、358、362、451、453、455、456、457、458、459、460、461 および 462）、腺胃の粘膜黒色斑（動物番号 456 および 462）、腎盂拡張（動物番号 451）。

Ⅲ. 雄雌動物の生殖および新生児の発生について

1) 性周期検査

例数 : 雌の全例
 期間 : 投与開始日から交尾成立日まで。
 方法 : ギムザ染色による膣垢塗抹標本を作製し、光学顕微鏡下で性周期段階を判定した。
 判定 : 性周期の各段階（発情前期、発情期、発情後期および発情休止期）を4日から6日の間隔で繰り返すものを正常とし、発情期間隔を算出した。また、部分的に3日の発情期間隔が認められた動物が1例みられ（動物番号 452）、この動物の性周期は不規則と判定して発情期間隔を算出した。発情休止期が7日以上継続してみられるものは連続非発情とし、異常と判定した。なお、連続非発情については発情期間隔は計算しなかった。

2) 生殖能検査

例数 : 雄雌の全例
 時期 : 投与 14 日より 8 日間（交配開始日の翌日を交配 1 日とした）。
 交配組合せ : 同一群の動物番号末尾が同一である動物を 1 対とした。
 方法 : 同試験群内の雄雌 1 対を交配開始日の夕刻より交尾が確認されるまで連続同居させた。
 交尾成立の確認方法 : 膣内または受皿上に落下した膣栓、あるいは膣垢スミア標本中の精子により確認した。なお、いずれかが認められた日を妊娠 0 日とした。次式から群毎に交尾率を算出した。

$$\text{交尾率 (Copulation index, \%)} = \frac{\text{交尾した雄雌対の数}}{\text{同居させた雄雌対の数}} \times 100$$

受胎能 : 妊娠の確認を分娩の有無および剖検時に子宮内の着床痕の計数により行った。
 次式から群毎に受胎率を算出した。

$$\text{受胎率 (Fertility index, \%)} = \frac{\text{受胎動物数}}{\text{交尾した雄雌対の数}} \times 100$$

3) 分娩および哺育状態観察

例数 : 受胎した雌の全例

分娩観察 : 交尾が確認された雌動物は全例自然分娩させた。

分娩状態を妊娠 21 日から 25 日の朝まで、毎日 3 回(9 : 00、13 : 00
および 17 : 00)観察した。

分娩終了の確認 : 9 : 00 に母動物が児を巣の中に集めて腹の下に抱え込んでいるのが観察された場合に分娩終了とし、その日を哺育 0 日(生後 0 日)とした。
1 匹以上の生存児を出産したものを正常出産とした。

出産児が全て死亡している場合(死産)および難産などの分娩異常がみられる場合は異常出産とした。

次式から群毎に出産率を算出した。

$$\text{出産率(Gestation index、\%)} = \frac{\text{生児出産雌数}}{\text{妊娠雌数}} \times 100$$

出産児の観察 : 生後 0 日に正常に出産した腹毎に生存児数と死亡児数とを計数し、それらの合計を出産児数とした。

次式から腹毎に出生率を算出した。

$$\text{出生率(Live birth index、\%)} = \frac{\text{出産時生存児数}}{\text{出産児数}} \times 100$$

出産児の性比の算出 : 生後 0 および 4 日に個々の児動物の性を肛門と生殖突起の間の長さで判定した。

死亡児も含めた生後 0 日の全出産児、死亡例を含めない生後 0 日の生存児ならびに生後 4 日の生存児を対象として以下を算出した。

$$\text{生後 0 日の全出産児の性比(Sex ratio)} = \frac{\text{雄出産児数}}{\text{雄出産児数} + \text{雌出産児数}}$$

$$\text{生後 0 日の生存児の性比(Sex ratio)} = \frac{\text{雄生存児数}}{\text{雄生存児数} + \text{雌生存児数}}$$

$$\text{生後 4 日の生存児の性比(Sex ratio)} = \frac{\text{雄生存児数}}{\text{雄生存児数} + \text{雌生存児数}}$$

妊娠期間の算出 : 妊娠 0 日から哺育 0 日までの期間の日数を計数した。

分娩率の算出 : 剖検時に各雌の子宮内の着床痕を肉眼的に計数した。

次式から腹毎に分娩率を算出した。

$$\text{分娩率(Delivery index、\%)} = \frac{\text{出産児数}}{\text{着床数}} \times 100$$

着床率の算出 : 剖検時に各雌の卵巢の妊娠黄体数を計数した。

次式から腹毎に着床率を算出した。

$$\text{着床率(Implantation index、\%)} = \frac{\text{着床数}}{\text{黄体数}} \times 100$$

哺育 4 日の哺育率の算出：次式から群毎に算出した。

$$\text{哺育率(Nursing index、\%)} = \frac{\text{哺育 4 日に生存児を持つ雌数}}{\text{生児出産雌数}} \times 100$$

4) 新生児の一般状態観察

- 例数 : 全例
 頻度 : 1 回／日
 期間 : 生後 0 日から生後 4 日までとした。
 観察方法 : 生存または死亡の確認、一般状態および外表について観察した。
 なお、死亡例は剖検し、Whole body を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定・保存した。

新生児生存率の算出 : 生後 4 日の新生児生存率を次式から算出した。

$$\text{新生児生存率(Viability index、\%)} = \frac{\text{生後 4 日の生存児数}}{\text{出産時生存児数}} \times 100$$

5) 新生児の体重測定

- 例数・時期 : 生存児全例について、生後 0、1 および 4 日に実施した。
 測定方法 : 電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて雄雌別に 1 腹まとめて測定し、0.1 g まで記録した。
 雄雌別に 1 腹を標本単位として平均体重を算出した。

6) 新生児の剖検

- 時期・例数 : 生後 4 日に全例について実施した。
 検査方法 : 体外表(口腔内を含む)を観察し、二酸化炭素吸入法により安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。異常例については、Whole body を 10% 中性緩衝ホルマリンに固定・保存した。

5. 統計学的方法

体重、体重増加量および増加率、摂餌量、器官の絶対重量および相対重量、精巣の精子形成、発情期間隔、妊娠黄体数、着床数および着床率、出産児数、出産時の生存児数および死亡児数、分娩率、出生率、性比、妊娠期間、哺育 4 日の生存児数および新生児生存率の成績について群毎の平均値および標準偏差を算出し、Bartlett の検定法を行い、等分散性を解析した。等分散の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差がみられた場合は Dunnett の検定法を用いて対照群との比較を行った。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差がみられた場合は Mann-Whitney の U-検定法を用い対照群との比較を行った。なお、新生児の雄雌別体重は、1 腹を標本単位とした。

病理組織学的検査のうち 2 段階以上のグレードが認められた所見については、群毎の傾向

を Kruskal-Wallis の検定法で解析し、有意差がみられた場合は Mann-Whitney の U-検定法を用いて対照群との比較を行った。

性周期の異常の発現率、交尾率、受胎率、出産率、哺育 4 日の哺育率、ならびに病理組織学的検査のうち 1 段階のグレードが認められた所見については、多試料カイ二乗検定を行い、その結果有意差が認められた場合には 2 試料カイ二乗検定で対照群との比較を行った。ただし、2 試料カイ二乗検定に不適合の場合には Fisher の直接確率検定法を用いた。

対照群との比較検定については、有意水準は 5%とした。統計学的方法に関する表示方法を Appendix 5 に示す。

なお、125 mg/kg 群では哺育 4 日の評価項目、哺育 1 日以降の母動物の体重、摂餌量および生後 1 日以降の生存児の体重のデータについては、母動物の死亡または安楽死により例数が 3 例以下となったため、統計学的検定は実施しなかった。

成 績

I. 親動物について

1. 一般状態

一般状態観察の成績を Table 1 および 2、INDIVIDUAL DATA 1-1-1～1-2-4 に示す。

雄：対照群、20 および 50 mg/kg 群では投与期間中に異常は認められなかった。

125 mg/kg 群では、投与 16 日以降、1 または 2 例に流涎が認められ、投与期間中を通じては 4 例に流涎が認められた。

雌：対照群および 20 mg/kg 群では投与期間中に異常は認められなかった。

50 mg/kg 群では、交配および妊娠期間に 1 例に流涎が認められた。なお、同群には分娩終了時に出産児が全て死亡していた動物が 1 例（動物番号 362）、哺育 1 日までに全ての新生児が死亡した動物が 1 例（動物番号 358）みられたが、これらの動物の一般状態に異常はみられなかった。

125 mg/kg 群では、流涎が交配前および交配期間に 9 例、妊娠期間に 8 例、哺育期間に 3 例みられたほか、妊娠末期から哺育期間にかけて種々の異常がみられた。妊娠期間では、動物番号 451 に自発運動の低下、外尿道口周囲被毛汚染および口周囲被毛汚染が、また動物番号 459 に自発運動の低下および振戦がそれぞれ妊娠 22 日および妊娠 23 日の分娩中に認められた。これらの動物は衰弱が著しく、難産として安楽死させた。また動物番号 456、461 および 462 は妊娠 22 日の分娩開始前に死亡しているのが発見された。このうち動物番号 462 では、妊娠 21 日に肛門周囲被毛汚染および軟便が認められた。死亡した動物または安楽死させた動物では、剖検で子宮内に受胎産物が確認された（動

物番号 451 死亡胎児 1；動物番号 456 死亡胎児 11、胎盤遺残 1；動物番号 459 死亡胎児 1、胎盤 2；動物番号 461 死亡胎児 18；動物番号 462 死亡胎児 19、胎盤遺残 1)。哺育期間中では投与後 5 例に振戦、1 例に間代性痙攣がみられるなど神経症状が認められ、このうち 1 例（動物番号 458）は自発運動の低下および呼吸促迫を示した後死亡し、3 例（動物番号 455、457 および 460）は神経症状がみられた翌日に死亡しているのが発見された。動物番号 458 では、剖検で子宮内に受胎産物が確認された（浸軟胎児 1、胎盤 3）。また、3 例（動物番号 452、453 および 454）では哺育 4 日までに全ての新生児が死亡したため、いずれも安楽死させた。

2. 体重推移

体重測定の結果を Figure 1 および 2、Table 3～6、INDIVIDUAL DATA 2-1-1～2-4-4 に示す。
雄：20 および 50 mg/kg 群では、体重および体重増加量には対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

125 mg/kg 群では、投与期間を通して対照群より低値で推移し、投与 21 日以降の体重、投与期間の体重増加量および体重増加率に有意な差がみられた。

雌：20 および 50 mg/kg 群では、交配前、妊娠および哺育期間ともに体重、体重増加量および体重増加率のいずれにも有意な変化は認められなかった。

125 mg/kg 群では、交配前期間は体重、体重増加量および体重増加率のいずれにも有意な変化は認められなかった。妊娠期間中は対照群より低値で推移し、妊娠 3～20 日までの体重および妊娠期間の体重増加量に有意な差が認められた。哺育期間では哺育 0 日の体重に有意な低値が認められた。

3. 摂餌量

摂餌量測定の結果を Figure 3 および 4、Table 7～10、INDIVIDUAL DATA 3-1-1～3-4-4 に示す。

雄：20 および 50 mg/kg 群では対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

125 mg/kg 群では投与 2 および 5 日に有意な低値が認められた。

雌：20 および 50 mg/kg 群では有意な変化は認められなかった。

125 mg/kg 群では、投与 5 日、妊娠 3～7 日および妊娠 20 日に有意な低値が認められた。

4. 剖検所見

剖検の結果を Table 11 および 12、INDIVIDUAL DATA 4-1-1～4-2-4 に示す。

雄：対照群、20 および 50 mg/kg 群では異常所見は認められなかった。

125 mg/kg 群では、胸腺の萎縮が 1 例、前胃の粘膜肥厚が 6 例、前胃の粘膜表面顆粒状が 1 例、副腎の肥大が 1 例、精巢上体尾部の黄色斑が 2 例に認められた。

雌：対照群および 20 mg/kg 群では異常所見は認められなかった。

50 mg/kg 群では、哺育 4 日の生存例 10 例では胸腺の萎縮が 1 例、前胃の粘膜肥厚が 1 例に認められた。異常出産例または哺育児が全て死亡したため安楽死させた動物では、2 例全てに胸腺の萎縮および副腎の肥大がみられ、このうち 1 例には脾臓の萎縮もみられた。

125 mg/kg 群では、哺育 4 日に生存児を哺育している動物はいなかった。死亡例および異常出産または哺育児が全て死亡したため安楽死させた動物では、胸腺の萎縮が 10 例、脾臓の萎縮が 9 例、前胃の粘膜肥厚および粘膜表面顆粒状が各 4 例、腺胃の粘膜黒色斑が 2 例、副腎の肥大が 4 例、腎盂拡張が 1 例にみられた。

5. 器官重量

器官重量測定の結果を Table 13、INDIVIDUAL DATA 5-1～5-4 に示す。

雄：125 mg/kg 群で剖検時の体重に対照群と比較して有意な低値がみられたが、器官重量にはいずれの被験物質投与群にも有意な変化は認められなかった。

6. 病理組織学的検査

病理組織学的所見を Table 14 および 15、INDIVIDUAL DATA 6-1-1～6-4-4 に示す。

雄：対照群では、精巣の精細管の萎縮(軽度)および精巣上体の管腔内細胞残屑(軽度)が 1 例に、精巣上体の精子肉芽腫(軽度)が 1 例にみられた。前胃、脾臓および副腎には異常所見はみられなかった。

20 mg/kg 群では、前胃の扁平上皮過形成および過角化(軽度)が 2 例にみられた。脾臓および副腎には異常所見はみられなかった。

50 mg/kg 群では、前胃の扁平上皮過形成(軽度)が 8 例、過角化(軽度)が 3 例にみられた。脾臓および副腎には異常所見はみられなかった。

125 mg/kg 群では、前胃の扁平上皮過形成が 12 例(軽度 3 例、中等度 7 例、重度 2 例)、過角化が 11 例(軽度 7 例、中等度 4 例)にみられた。また、精巣の精細管の萎縮(軽度)が 2 例に、精巣上体の管腔内細胞残屑(軽度)が 1 例に、精巣上体の精子肉芽腫(軽度)が 2 例に、副腎の束状帯における皮質細胞の肥大(軽度)が 1 例にみられた。脾臓には異常所見はみられなかった。

これらの異常所見のうち、50 および 125 mg/kg 群における前胃の扁平上皮過形成および 125 mg/kg 群における前胃の過角化に、グレードの有意な増強が認められた。

剖検時の肉眼的異常所見については、125 mg/kg 群で胸腺の皮質の萎縮(軽度)が 1 例にみられた。

雌：対照群では、脾臓の髄外造血の亢進が 1 例にみられた。前胃、副腎および卵巣には異常所見はみられなかった。

20 mg/kg 群では、前胃の扁平上皮過形成および過角化(軽度)が2例にみられた。脾臓および副腎には異常所見はみられなかった。

50 mg/kg 群では、前胃において扁平上皮過形成が7例(軽度6例、中等度1例)、過角化(軽度)が8例、潰瘍(軽度)、粘膜下組織の炎症性細胞浸潤(軽度)および粘膜下組織の線維化が1例にみられた。また、脾臓の白脾髄の萎縮(軽度)が1例、副腎の束状帯における皮質細胞の肥大(軽度)が2例にみられた。

125 mg/kg 群では、前胃において扁平上皮過形成が12例(軽度7例、中等度5例)、過角化が12例(軽度7例、中等度5例)、潰瘍(軽度)が4例、粘膜下組織の炎症性細胞浸潤(軽度)が3例、粘膜下組織の線維化(軽度)が2例にみられた。また、脾臓では白脾髄の萎縮が9例(軽度7例、中等度2例)、赤脾髄の萎縮(軽度)が2例、副腎では束状帯における皮質細胞の肥大(軽度)が8例、束状帯の壊死(軽度)および束状帯の鉍質沈着(軽度)が1例にみられた。卵巣には異常所見はみられなかった。

これらの異常所見のうち、50 および 125 mg/kg 群における前胃の扁平上皮過形成および過角化ならびに 125 mg/kg 群における白脾髄の萎縮にグレードの有意な増強が、125 mg/kg 群における副腎の束状帯における皮質細胞の肥大に発生頻度の有意な増加が認められた。剖検時の肉眼的異常所見については、50 および 125 mg/kg 群で胸腺の皮質の萎縮(中等度)がそれぞれ3および10例みられたほか、125 mg/kg 群で腎盂拡張(軽度)が1例にみられた。

7. 精巣の精子形成

精巣の精子形成サイクルの成績を Table 16、INDIVIDUAL DATA 7-1～7-2 に示す。

125 mg/kg 群では、Stage I-VI の精細管単位およびセルトリ細胞単位あたりの精粗細胞数に対照群と比較して有意な高値、Stage IX-XI の精細管単位およびセルトリ細胞単位あたりの精粗細胞数ならびに精細管単位あたりのレプトテン期精母細胞数に有意な低値、Stage XII-XIV の精細管単位あたりのパキテン期/ディプロテン期精母細胞数に有意な低値がみられた。Stage VII-VIII では変化はみられなかった。

II. 雄雌動物の生殖および新生児の発生について

1. 性周期

性周期検査の成績を Table 17、INDIVIDUAL DATA 8-1～8-4 および 9-1～9-4 に示す。

125 mg/kg 群の2例に連続非発情がみられたほか、1例に部分的に3日の発情期間隔がみられ、性周期の不規則と判定した。性周期異常の発現率および発情期間隔には各投与群とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

2. 生殖能

生殖能検査の成績を Table 17、INDIVIDUAL DATA 9-1～9-4 に示す。

全ての投与群において 12 例中全例に交尾成立および妊娠が確認された。

3. 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態の成績を Table 17 および 18、INDIVIDUAL DATA 9-1～9-4 および 10-1～10-4 に示す。

黄体数、着床数、着床率、分娩率、出産児数および生後 0 日の性比には、いずれの被験物質投与群においても対照群と比較して有意な差は認められなかった。妊娠期間では、50 mg/kg 群に有意な短縮がみられたが、20 および 125 mg/kg 群には変化はみられなかった。出産率にはいずれの被験物質投与群にも有意な差は認められなかったが、50 mg/kg 群の 1 例で分娩終了時に生存児が認められなかった。また、125 mg/kg 群では分娩前に死亡した 3 例を除く 9 例に分娩が認められたが、このうち 2 例は妊娠 22 および 23 日の分娩中に難産のため安楽死させた。出産時の生存児数および死亡児数ならびに出生率については、20 および 50 mg/kg 群では変化はみられなかった。125 mg/kg 群では有意な差は認められなかったが、生存児数および出生率の低値傾向ならびに死亡児数の高値傾向がみられた。哺育 4 日の哺育率、生後 4 日の生存児数および新生児の生存率には、20 および 50 mg/kg 群では有意な差は認められなかったが、50 mg/kg 群の 1 例において哺育期間中に全ての新生児が死亡した。125 mg/kg 群では、分娩の終了が確認された 7 例全例で巣作り、授乳等が認められず、さらに 3 例で生存児に咬傷が認められるなど、哺育行動の異常がみられた。また、哺育期間中に死亡した 4 例を除く 3 例全例において、生後 4 日までに全ての新生児が死亡した。生後 4 日の生存児の性比では、50 mg/kg 群において有意な高値がみられた。

4. 新生児の一般状態

新生児の一般状態観察の成績を Table 19、INDIVIDUAL DATA 11-1～11-4 に示す。

生後 0 日から 4 日の間に死亡または消失した新生児は、対照群で雄 2 例、20 mg/kg 群で雄 1 例、雌 1 例であった。50 mg/kg 群では、全ての出産児が死亡していた腹も含めると、死亡または消失した新生児は雄 22 例、雌 20 例であった。125 mg/kg 群では、生後 0 日から 4 日の間に全ての新生児が死亡し、難産のため安楽死させた動物の出産児も含めると死亡例数は雄 65 例、雌 59 例であった。

生後 0 日から 4 日の生存例では、20 mg/kg 群で雌 1 例に無尾および鎖肛がみられた。50 mg/kg 群では雄 1 例に、臍帯が後肢に絡みついた事に起因する後肢の腫脹がみられた。125 mg/kg 群では、生後 0 日に雌雄各 3 例、生後 3 日に雌 1 例に母動物に咬まれた事による外傷がみられた。

5. 新生児の体重

新生児の体重測定の結果を Figure 5 Table 20、INDIVIDUAL DATA 12-1～12-4 に示す。

20 mg/kg 群では、雄で生後 1 および 4 日、雌で生後 4 日に対照群と比較して有意な低値が認められた。

50 mg/kg 群では、雄雌とも生後 0 日以降に対照群と比較して有意な低値が認められた。

125 mg/kg 群では、雄雌とも生後 0 日に対照群と比較して有意な低値が認められた。

6. 新生児の剖検所見

新生児の剖検の結果を Table 21、INDIVIDUAL DATA 13 および 14-1～14-4 に示す。

生後 0 日から 4 日の間の死亡例には、50 mg/kg 群で雄 5 例、雌 4 例、125 mg/kg 群で雄 29 例、雌 24 例に母動物に咬まれたことによる外傷がみられた以外には、いずれの投与群にも異常所見はみられなかった。

生後 4 日の生存例では、対照群では異常所見は認められなかった。20 mg/kg 群では、肝臓の暗褐色化および肝臓の萎縮が雄 1 例、無尾および鎖肛が雌 1 例、50 mg/kg 群で後肢の腫脹が雄 1 例、肝臓の黄白色斑が雌 1 例に認められた。

考 察

2-ビニルピリジンの 0 (対照、トウモロコシ油)、20、50 および 125 mg/kg を 1 群雄雌各 12 匹の Cr1:CD (SD) ラットに、雄に対しては交配開始前 14 日間およびその後の 28 日間を含む計 42 日間、雌に対しては交配前 14 日間および交尾成立までの交配期間、交尾成立例は妊娠期間および哺育 3 日まで 1 日 1 回、連日経口投与して、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩等の生殖に及ぼす毒性および次世代の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

I. 親動物について

一般状態では、20 mg/kg 群では被験物質投与に関連する異常所見はみられなかった。50 mg/kg 以上の投与群では雄または雌に流涎がみられ、用量が高くなるにつれて発生頻度の増加がみられた。この変化は被験物質の刺激性によるものと推察された。加えて、125 mg/kg 群では妊娠末期に肛門周囲被毛汚染および軟便が 1 例にみられ、この例を含む 3 例に死亡がみられた。分娩中に自発運動の低下および外尿道口、口周囲被毛汚染または振戦が認められた 2 例については、難産であったため安楽死させた。哺育期間では、6 例で投与後に振戦または間代性痙攣などの神経症状が認められ、4 例が死亡した。このうち 1 例には死亡する前に自発運動の低下および呼吸促進がみられた。これらの症状は周産期における被験物質投与の影響と考えられた。

体重推移および摂餌量では、125 mg/kg 群において、雄で投与 21 日以降の体重、投与期間の体重増加量および体重増加率ならびに投与 2 および 5 日の摂餌量、雌で妊娠 3～20 日の体重、妊娠期間の体重増加量および哺育 0 日の体重ならびに投与 5 日、妊娠 3～7 日および妊娠 20 日の摂餌量に有意な低値が認められ、被験物質投与に関連した変化と考えられた。

剖検所見では、試験途中で死亡または安楽死させた動物も含めて、前胃では粘膜肥厚が 50 mg/kg 群の雌および 125 mg/kg 群の雄雌に、粘膜表面顆粒状が 125 mg/kg 群の雄雌にみられた。前胃の病理組織学的検査では、50 および 125 mg/kg 群の雄雌において扁平上皮過形成および過角化がみられ、このうち 50 および 125 mg/kg 群の雄雌における前胃の扁平上皮過形成ならびに 50 mg/kg 群の雌および 125 mg/kg 群の雄雌における前胃の過角化にはグレードの有意な増強がみられた。同様の変化は既存の実験⁵⁾においても報告されており、被験物質の刺激性に起因する変化と考えられた。なお、これらの前胃の病理組織学的変化は、20 mg/kg 群においても軽度なものが雄雌各 2 例にみられた。このほか、50 および 125 mg/kg 群の雌では一部の動物に潰瘍、粘膜下組織の炎症性細胞浸潤、粘膜下組織の線維化がみられ、これらの所見も被験物質の刺激性による変化と考えられた。また、副腎の肥大が 50 mg/kg 群の雌および 125 mg/kg 群の雄雌にみられ、病理組織学的検査では 50 mg/kg 群の雌および 125 mg/kg 群の雄雌で副腎の束状帯における皮質細胞の肥大、125 mg/kg 群の雌で束状帯の壊死および束状帯の鉍質沈着がみられた。このうち 125 mg/kg 群の雌の副腎の束状帯における皮質細胞の肥大の発生頻度が有意に増加した。脾臓の萎縮が 50 および 125 mg/kg 群の雌にみられ、特に 125 mg/kg 群では出現頻度が高く 12 例中 9 例にみられた。脾臓の病理組織学的検査では、50 および 125 mg/kg 群の雌で白脾髄の萎縮、125 mg/kg 群の雌で赤脾髄の萎縮がみられ、このうち 125 mg/kg 群の雌における白脾髄の萎縮にグレードの有意な増強がみられた。これら副腎および脾臓の変化は被験物質投与の影響と考えられた。胸腺の萎縮が 50 mg/kg 群の雌および 125 mg/kg 群の雄雌に認められ、特に 125 mg/kg 群の雌で出現頻度が高く 12 例中 10 例にみられた。胸腺の病理組織学的検査では、胸腺の皮質の萎縮がみられた。胸腺の萎縮は消耗性の所見であり、これは被験物質投与による全身状態の悪化に伴う変化と考えられた。なお、125 mg/kg 群の死亡した雌に腺胃の粘膜黒色斑がみられたが、病理組織学的検査において自己融解がみられており、死後変化と考えられた。また 125 mg/kg 群では精巣上体尾部の黄色斑およびこれに対応する病理組織学的所見として精子肉芽腫が認められたほか、精巣上体の管腔内細胞残屑および精巣の精細管の萎縮が 1～2 例にみられた。しかし、これらの所見は対照群にもみられる変化であり、被験物質投与とは関連のない変化と考えられた。125 mg/kg 群の雌で腎盂拡張が 1 例にみられたが、出現頻度が低いことから毒性学的意味のない変化と考えられた。

器官重量測定では精巣および精巣上体には変化はみられなかった。

精巣の精子形成サイクルの Stage 分類による検査では、125 mg/kg 群で、Stage I-VI の精粗細胞数に対照群と比較して有意な高値、Stage IX-XI の精粗細胞数ならびにレプトテン期精母細胞数および Stage XII-XIV のパキテン期/ディプロテン期精母細胞数に有意な低値がみられた。し

かし、前後のステージに影響がみられないなど変化に一貫性がみられないこと、セルトリ細胞数に変化がみられないことから被験物質投与とは関連のない偶発的な変化と考えられた。

以上のように、被験物質投与に関連した変化として、50 mg/kg 群では雌に流涎がみられ、剖検では雌に前胃の粘膜肥厚、副腎の肥大、脾臓および胸腺の萎縮が、また病理組織学的検査では雄雌に前胃の扁平上皮過形成および過角化、雌に副腎の束状帯における皮質細胞の肥大、白脾髄および胸腺の皮質の萎縮、前胃の潰瘍等の所見がみられた。125 mg/kg 群では雄雌に流涎がみられ、雌に自発運動の低下、振戦、間代性痙攣、呼吸促迫および周産期の死亡等の変化が認められた。加えて、雄雌に体重増加抑制、摂餌量の低下がみられ、剖検では雄雌に前胃の粘膜表面顆粒状、前胃の粘膜肥厚、副腎の肥大および胸腺の萎縮が、また病理組織学的検査では雄雌に副腎の束状帯における皮質細胞の肥大および胸腺の皮質の萎縮、雌に副腎の束状帯の壊死等の所見がみられた。なお、20 mg/kg 群では、雄雌 2 例の前胃に軽度の扁平上皮過形成および過角化がみられたが、その他のいずれの検査項目にも変化はみられなかった。

II. 雄雌動物の生殖および新生児の発生について

親動物の生殖能、分娩および哺育状態では、雌の性周期異常の発現率、発情期間隔、雄雌の交尾率、雌の受胎率、黄体数、着床数、着床率、分娩率、出産児数および生後 0 日の性比には被験物質投与に関連した変化はみられなかった。妊娠期間では、50 mg/kg 群において有意な短縮(妊娠期間 22.2 日)がみられたが、当該施設における背景データ(22.1~23.0 日、平均 22.6 日)の範囲であることに加え、125 mg/kg 群では有意な変化がみられないことから被験物質投与に関連する変化とは考えられなかった。

出産率にはいずれの被験物質投与群にも有意な差はなかったが、50 mg/kg 群の 1 例で分娩終了時に生存児が認められなかった。この変化は、125 mg/kg 群で生存児数および出生率の低値傾向ならびに死亡児数の高値傾向がみられていることから、被験物質投与の影響である可能性が考えられた。また 125 mg/kg 群の 2 例に難産が認められており、これらの変化は、妊娠末期には死亡も 3 例みられていることから被験物質投与の影響と考えられた。

哺育 4 日の哺育率、生後 4 日の生存児数および新生児の生存率では、20 mg/kg 群では変化はみられなかった。一方、50 mg/kg 群では対照群と比較して有意な差は認められなかったが、1 例において哺育期間中に全ての新生児が死亡した。また、125 mg/kg 群では哺育期間中に死亡した 4 例を除く 3 例全例において、生後 4 日までに全ての新生児が死亡した。新生児の一般状態観察でも 50 mg/kg 群で雄 22 例、雌 20 例、125 mg/kg 群では雄 65 例、雌 59 例の死亡または消失がみられ、被験物質投与の影響と考えられた。さらに、125 mg/kg 群では分娩の終了が確認された 7 例全例で巣作り、授乳等が認められず、このうち 3 例では生存児に咬傷が認められるなど、母動物の哺育行動に異常がみられた。これらのことから、被験物質投与による母動物の哺育障害が新生児の死亡増加の一因であると考えられた。なお、生後 4 日の生存児の性比に 50 mg/kg 群で有意

な高値がみられたが、新生児の一般状態において雄雌の死亡児数がほぼ同数であることから、この変化は雌に特異的な新生児の死亡を示すものではなく、生後 0 日における性比の高値傾向を反映したものと考えられた。生後 0 日の性比については、125 mg/kg 群における性比は対照群より低い値であることから、50 mg/kg 群での変化は被験物質投与とは関連のないものと考えられた。

新生児の一般状態観察では死亡、消失および外傷のほかには 20 mg/kg 群で 1 例に無尾および鎖肛がみられたが、より高い用量群ではみられていないことから被験物質投与とは関係のない自然発生性の変化と考えられた。新生児の体重では、20 mg/kg 群で雄の生後 1 および雄雌の生後 4 日、50 mg/kg 群で雄雌の生後 0～4 日、125 mg/kg 群で雄雌の生後 0 日に有意な低値がみられており、被験物質投与に関連する変化と考えられた。生後 4 日の生存児の剖検所見では、20 および 50 mg/kg 群の雄雌で肝臓の暗褐色化、黄白色斑、萎縮等の所見が散見されたが、いずれも 1 例のみの出現であり、出現頻度が低いことから被験物質投与とは関連のない変化と考えられた。死亡例の剖検では、50 および 125 mg/kg 群で母動物に咬まれたことによる外傷がみられた以外にはいずれの被験物質投与群にも変化はみられなかった。なお、50 mg/kg 群では喰殺は観察されなかったことから、外傷は新生児の死後母動物が咬んだことによるものと推察された。

以上のように、被験物質投与に関連した変化として、20 mg/kg 以上の群では新生児の体重の低値、50 mg/kg 以上の群では分娩の異常および新生児の死亡の増加がみられ、125 mg/kg 群ではさらに母動物の哺育行動の異常が認められた。

したがって、本試験条件下における 2-ビニルピリジンの親動物における無影響量(NOEL)ならびに親動物の生殖能および次世代の発生・発育に対する無影響量(NOEL)はいずれも 20 mg/kg/day 未満であると判断された。

参考文献

- 1) 製品安全データシート. 東京化成工業株式会社.
- 2) 個別物質全項目表示. 神奈川県環境科学センター.
- 3) 国際化学物質安全性カード. 国立医薬品食品衛生研究所.
- 4) 化学物質の初期リスク評価書 (Ver. 1.0, No. 18) . 財団法人 化学物質評価研究機構、独立行政法人 製品評価技術基盤機構.
- 5) 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.
- 6) 化学物質環境リスク評価 第 4 巻、3、(2). 環境省環境保健部環境リスク評価室.

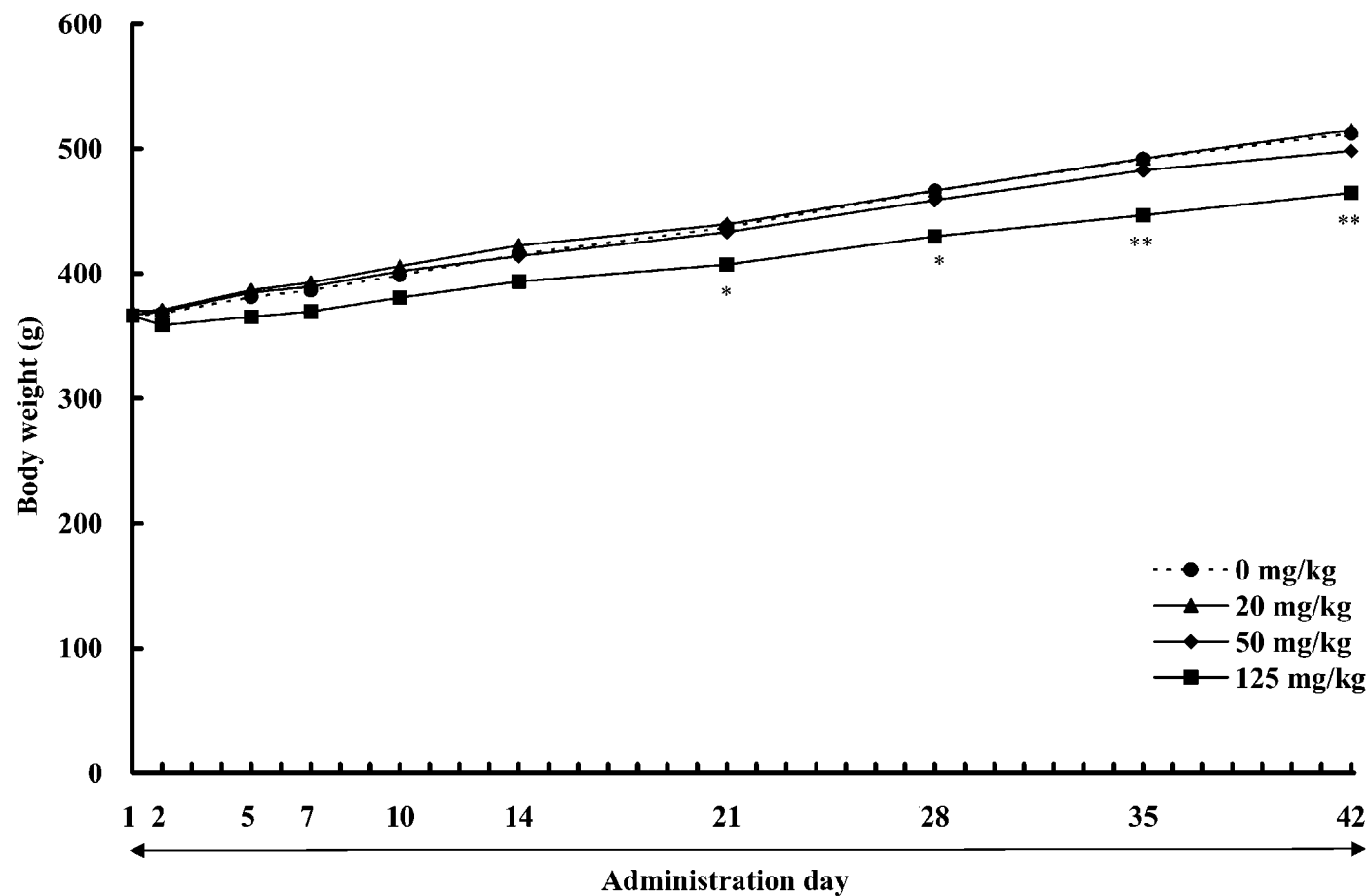


Figure 1 Body weight of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

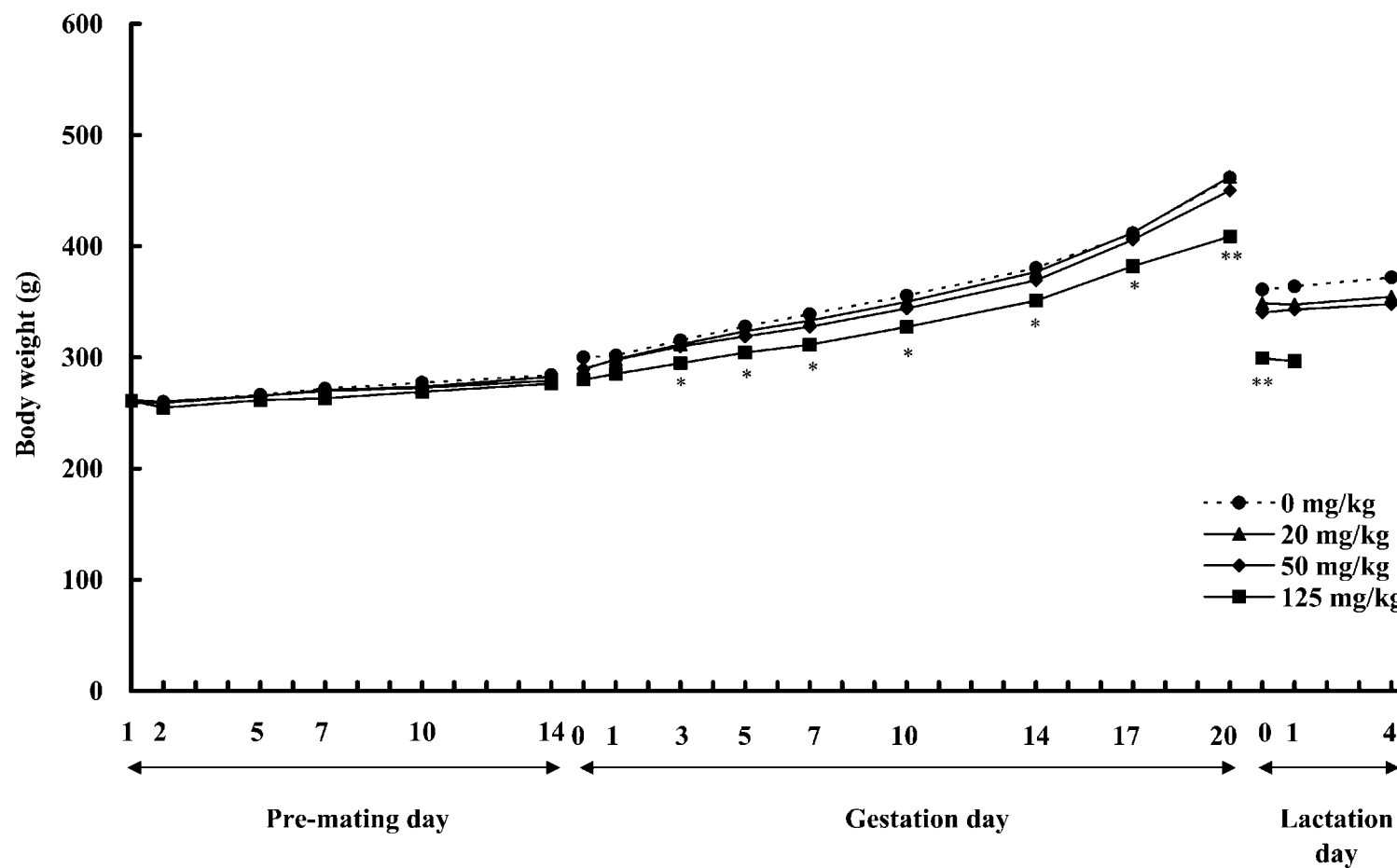


Figure 2 Body weight of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

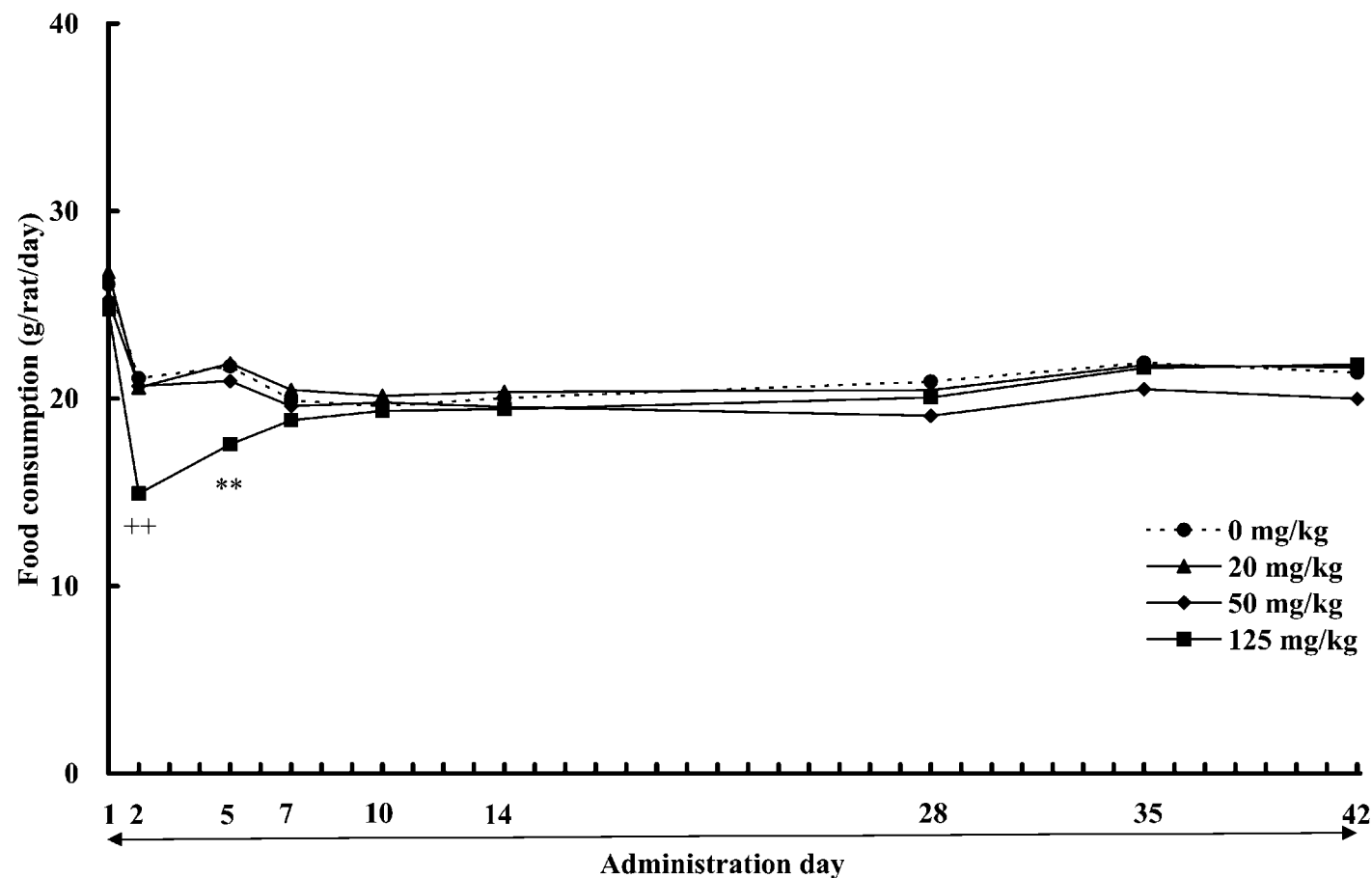


Figure 3 Food consumption of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

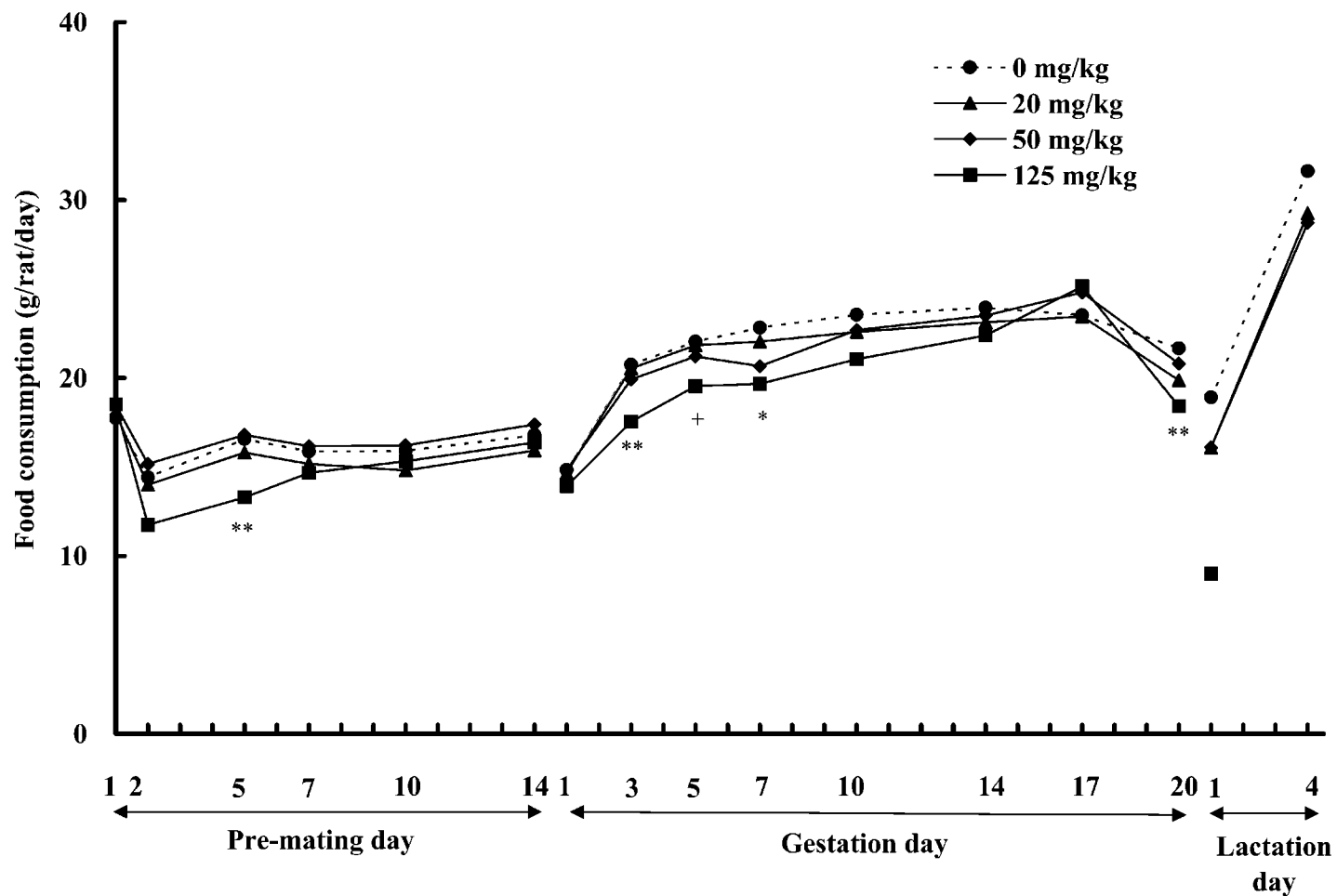


Figure 4 Food consumption of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

- * : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).
- ** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).
- + : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).

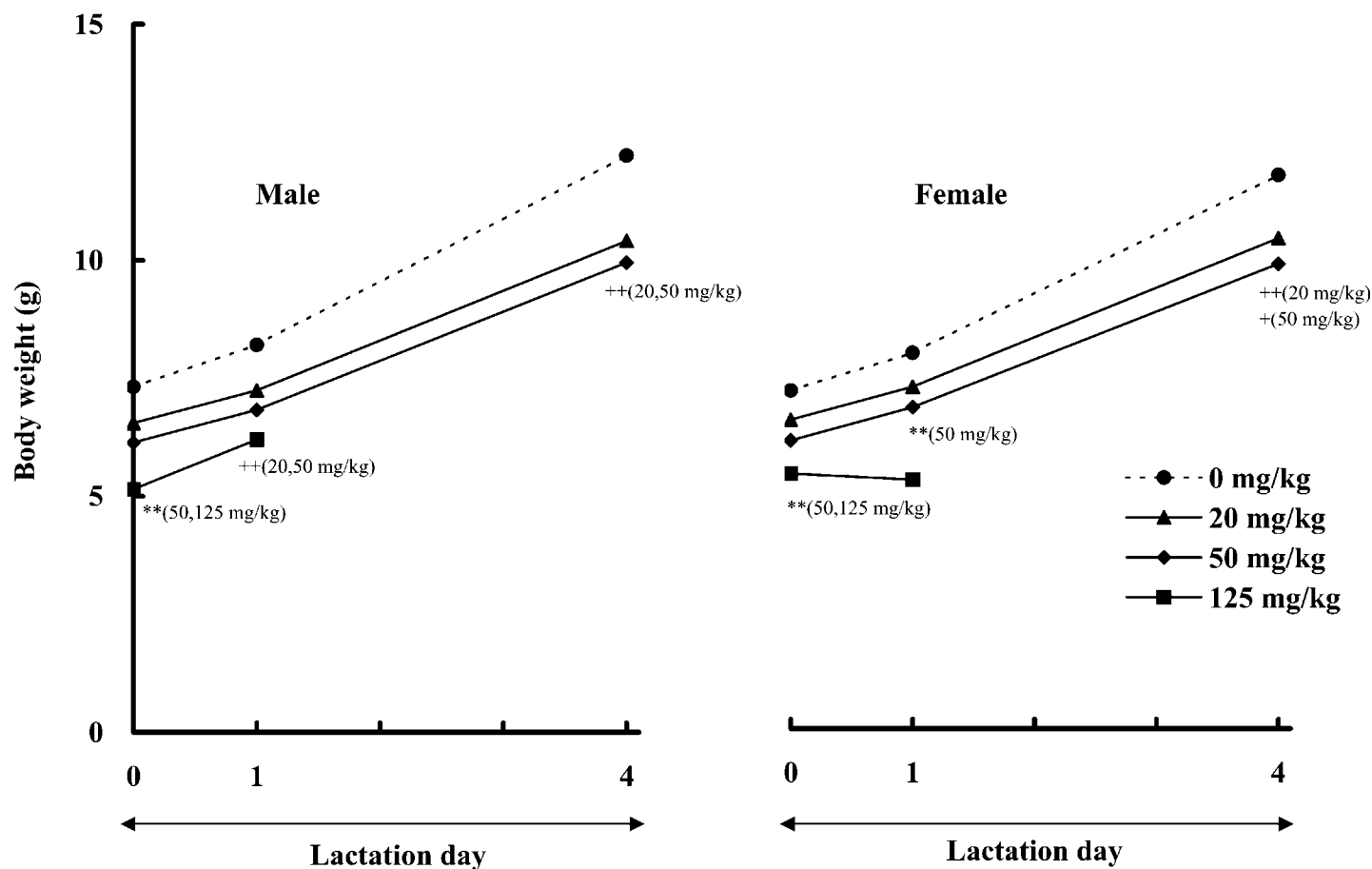


Figure 5 Body weight of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2-vinylpyridine in rats (SR08223)

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).
 + : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).
 ++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 1 General appearance of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group	Findings	Administration day												Autopsy day
		1-15	16	17-19	20	21-24	25-26	27	28	29-30	31	32	33-42	
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
50 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
125 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	11	12	10	11	12	11	12	11	12	10	12	12
	Salivation	0	1	0	2	1	0	1	0	1	0	2	0	0

Values are the number of animals with findings.

Table 2 General appearance of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group	Findings	Before gestation period	Gestation period	Lactation period ^a
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12
20 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12
50 mg/kg	Number of animals examined	12	12 ^b	11 ^c
	No abnormal findings	11	11	11
	Salivation	1	1	0
125 mg/kg	Number of animals examined	12	12 ^d	7 ^e
	No abnormal findings	3	3	1
	Salivation	9	8	3
	Soil of perigenital fur	0	1	0
	Soil of perianal fur	0	1	0
	Soil of perioral fur	0	1	0
	Soft feces	0	1	0
	Tachypnea	0	0	1
	Decrease in locomotor activity	0	2	1
	Tremor	0	1	5
	Clonic convulsion	0	0	1
	Found dead	0	3	4

Values are the number of animals with findings.

a: Including autopsy day.

b: One animal was euthanized because of abnormal delivery.

c: One animal was euthanized because of total litter loss.

d: Two animals were euthanized because of abnormal delivery.

e: Three animals were euthanized because of total litter loss.

Table 3 Body weight of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group	Number of animals		Body weight (g) on administration day										Body weight gain	
			1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	Days 1-42 (g)	(%)
0 mg/kg	12	Mean	366.3	368.1	381.6	386.7	398.8	415.6	437.1	466.3	491.7	512.3	145.9	39.866
		S.D.	18.6	19.2	21.3	21.6	23.2	25.6	26.4	26.5	30.6	31.7	21.2	5.807
20 mg/kg	12	Mean	369.6	371.0	386.8	392.8	406.0	422.6	439.5	466.7	492.3	514.9	145.3	39.189
		S.D.	17.0	16.5	20.5	22.3	21.6	24.4	28.6	33.1	37.6	38.6	24.3	5.392
50 mg/kg	12	Mean	367.1	369.5	384.9	389.5	401.9	414.1	433.3	458.8	482.8	498.3	131.2	35.777
		S.D.	19.4	19.9	22.0	23.5	22.9	27.9	22.6	25.8	25.2	27.2	14.8	4.029
125 mg/kg	12	Mean	366.2	358.6	365.5	369.7	380.8	393.7	407.3 *	429.8 *	446.8 **	464.8 **	98.6 **	26.837 **
		S.D.	17.9	23.6	25.1	25.4	28.0	28.8	30.1	30.6	33.6	33.2	19.0	4.528

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on administration day 1) x 100.

*: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

**: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 4 Body weight before gestation period of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group	Number of animals		Body weight (g) on administration day						Body weight gain	
			1	2	5	7	10	14	Days 1-14	
									(g)	(%)
0 mg/kg	12	Mean	260.1	260.0	266.3	271.9	277.3	284.2	24.1	9.288
		S.D.	16.3	14.3	17.5	17.2	17.4	20.0	11.2	4.407
20 mg/kg	12	Mean	261.4	260.3	265.3	269.8	272.6	279.1	17.7	6.742
		S.D.	10.9	14.1	11.1	14.1	14.7	17.1	11.2	4.314
50 mg/kg	12	Mean	258.8	259.2	265.2	270.6	273.6	282.5	23.7	9.156
		S.D.	15.2	14.5	15.8	17.1	16.8	18.5	9.7	3.712
125 mg/kg	12	Mean	260.9	254.8	261.4	263.2	268.9	276.4	15.5	6.073
		S.D.	11.3	8.8	10.9	11.5	12.4	15.1	16.7	6.647

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on administration day 1) x 100.

Table 5 Body weight during gestation period of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group	Number of animals		Body weight (g) on gestation day									Body weight gain Days 0-20	
			0	1	3	5	7	10	14	17	20	(g)	(%)
0 mg/kg	12	Mean	300.2	301.8	315.5	327.9	339.0	355.6	380.4	411.6	461.7	161.5	54.043
		S.D.	25.6	23.1	24.1	26.2	28.6	28.3	31.5	33.2	38.3	25.0	8.460
20 mg/kg	12	Mean	289.3	298.3	311.7	323.5	333.1	349.9	376.8	412.2	462.4	173.1	60.024
		S.D.	23.1	18.3	21.3	22.7	25.8	27.2	31.3	34.5	39.2	26.2	9.385
50 mg/kg	12	Mean	289.8	297.9	309.8	318.9	327.6	344.1	369.3	405.8	450.1	160.3	55.873
		S.D.	24.2	17.1	18.8	19.9	21.8	23.6	24.5	24.2	25.0	20.1	10.590
125 mg/kg	12	Mean	279.9	285.3	294.8 *	304.3 *	311.4 *	327.4 *	351.1 *	382.0 *	408.6 **	128.7 **	46.239
		S.D.	14.2	11.9	10.7	12.6	12.1	13.2	15.4	20.1	25.7	27.2	10.821

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on gestation day 0) x 100.

*: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

**: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 6 Body weight during lactation period of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group	Number of animals		Body weight (g) on lactation day			Body weight gain	
			0	1	4	Days 0-4 (g)	(%)
0 mg/kg	12	Mean	361.1	363.9	371.9	10.8	3.118
		S.D.	31.2	30.4	27.7	7.2	2.272
20 mg/kg	12	Mean	348.6	347.5	354.5	5.9	1.761
		S.D.	26.8	26.6	28.4	14.4	4.429
50 mg/kg	11	Mean	340.5	(10) 343.0	(10) 347.9	(10) 5.5	(10) 1.606
		S.D.	19.8	17.6	21.6	7.9	2.356
125 mg/kg	7	Mean	299.1 **	(2) 296.5	(0) #	(0) #	(0) #
		S.D.	22.5	14.8	#	#	#

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on lactation day 0) x 100.

Values in parentheses are the number of animals examined.

Values in curly brackets are excluded from statistical evaluation because of insufficient sample numbers.

#: Blank.

**: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 7 Food consumption of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group		Number of animals	Food consumption (g/rat/day) on administration day								
			1	2	5	7	10	14	28	35	42
0 mg/kg	12	Mean	26.08	21.08	21.72	19.92	19.58	20.03	20.90	21.91	21.38
		S.D.	1.73	2.81	1.69	1.65	2.22	1.91	1.61	1.90	1.86
20 mg/kg	12	Mean	26.75	20.58	21.87	20.46	20.13	20.35	20.44	21.78	21.65
		S.D.	2.56	2.64	2.05	1.90	1.71	1.95	2.55	2.78	2.83
50 mg/kg	12	Mean	25.25	20.67	20.93	19.58	19.79	19.54	(11) 19.07	20.49	19.98
		S.D.	2.67	1.72	1.61	1.74	1.37	1.45	1.44	1.69	1.77
125 mg/kg	12	Mean	24.75	14.92 ++	17.55 **	18.83	19.33	19.43	20.04	21.63	21.80
		S.D.	2.56	4.74	3.30	3.43	2.15	2.01	1.77	2.12	2.36

Values in parentheses are the number of animals examined.

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 8 Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group		Number of animals	Food consumption (g/rat/day) on administration day					
			1	2	5	7	10	14
0 mg/kg	12	Mean	17.75	14.42	16.58	15.88	15.91	16.79
		S.D.	3.72	3.65	1.75	2.66	1.69	2.05
20 mg/kg	12	Mean	18.00	14.00	15.81	15.17	14.80	15.93
		S.D.	2.56	2.95	1.73	2.12	1.34	1.82
50 mg/kg	12	Mean	18.50	15.17	16.80	16.17	16.22	17.38
		S.D.	4.60	2.66	2.21	2.11	1.62	1.81
125 mg/kg	12	Mean	18.50	11.75	13.28 **	14.67	15.32	16.38
		S.D.	2.50	3.17	2.09	2.44	2.09	2.25

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 9 Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group	Number of animals		Food consumption (g/rat/day) on gestation day							
			1	3	5	7	10	14	17	20
0 mg/kg	12	Mean	14.83	20.75	22.04	22.83	23.56	23.95	23.53	21.67
		S.D.	2.89	2.13	3.42	3.63	3.50	3.00	2.30	2.06
20 mg/kg	12	Mean	14.67	20.54	21.83	22.04	22.59	23.13	23.46	19.87
		S.D.	2.39	1.74	2.28	2.32	2.84	3.45	3.15	2.04
50 mg/kg	12	Mean	14.83	19.92	21.21	20.67	22.69	23.51	24.81	20.81
		S.D.	2.21	2.02	2.12	2.77	2.05	1.86	2.15	1.99
125 mg/kg	12	Mean	13.92	17.54 **	19.54 +	19.67 *	21.06	22.39	25.14	18.41 **
		S.D.	1.08	1.60	1.27	1.53	1.55	1.37	1.28	3.68

*: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

**: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

+: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 10 Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group	Number of animals		Food consumption (g/rat/day) on lactation day	
			1	4
0 mg/kg	12	Mean	18.92	31.63
		S.D.	4.06	4.35
20 mg/kg	12	Mean	16.08	29.26
		S.D.	3.32	4.51
50 mg/kg	10	Mean	16.10	28.72
		S.D.	3.84	4.83
125 mg/kg	2			(0)
		Mean	9.00	#
		S.D.	2.83	#

Values in parentheses are the number of animals examined.

Values in the 125 mg/kg group are excluded from statistical evaluation because of insufficient sample numbers.

#: Blank.

Table 11 Gross findings of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Item	Group	0 mg/kg	20 mg/kg	50 mg/kg	125 mg/kg
Number of animals examined		12	12	12	12
Number of dead animals		0	0	0	0
No abnormal findings		-	-	-	-
Number of surviving animals		12	12	12	12
No abnormal findings		12	12	12	5
Organ: Findings					
Thymus: Atrophy		0	0	0	1
Forestomach: Thickening, mucosa		0	0	0	6
Granular surface, mucosa		0	0	0	1
Adrenal: Hypertrophy		0	0	0	1
Epididymis: Yellow patch, cauda		0	0	0	2

Values are the number of animals with findings.

-: Blank.

Table 12 Gross findings of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Item	Group	0 mg/kg	20 mg/kg	50 mg/kg	125 mg/kg
Number of animals examined		12	12	12	12
Number of pregnant animals		12	12	12	12
Number of dead or euthanized animals during the study		0	0	2	12 ^a
No abnormal findings		-	-	0	0
Organ: Findings					
Thymus: Atrophy		-	-	2	10
Spleen: Atrophy		-	-	1	9
Forestomach: Thickening, mucosa		-	-	0	4
Granular surface, mucosa		-	-	0	4
Glandular stomach: Black patch, mucosa		-	-	0	2
Adrenal: Hypertrophy		-	-	2	4
Kidney: Dilatation, renal pelvis		-	-	0	1
Number of surviving animals at lactation day 4		12	12	10	0
No abnormal findings		12	12	8	-
Organ: Findings					
Thymus: Atrophy		0	0	1	-
Forestomach: Thickening, mucosa		0	0	1	-

Values are the number of animals with findings.

a: Including 1 animal that showed total litter loss on lactation day 4.

-: Blank.

Table 13 Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group	Number of animals		Body weight g	Testis		Epididymis	
				g	%	g	%
0 mg/kg	12	Mean	514.7	3.364	0.657	1.339	0.261
		S.D.	31.9	0.228	0.066	0.082	0.025
20 mg/kg	12	Mean	517.3	3.270	0.633	1.331	0.259
		S.D.	40.1	0.257	0.040	0.065	0.023
50 mg/kg	12	Mean	501.6	3.233	0.646	1.307	0.262
		S.D.	26.6	0.227	0.043	0.086	0.015
125 mg/kg	12	Mean	469.5 **	3.268	0.697	1.311	0.280
		S.D.	34.5	0.255	0.054	0.131	0.034

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table14 Histopathological findings of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Item		0 mg/kg	20 mg/kg	50 mg/kg	125 mg/kg
Number of animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings	Grade				
Forestomach: Hyperplasia, squamous cell	+	0	2	$\begin{bmatrix} 8 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}^{**}$	$\begin{bmatrix} 3 \\ 7 \\ 2 \end{bmatrix}^{**}$
	++	0	0		
	+++	0	0		
Hyperkeratosis	+	0	2	3	$\begin{bmatrix} 7 \\ 4 \end{bmatrix}^{**}$
	++	0	0	0	
Testis: Atrophy, seminiferous tubule	+	1	-	-	2
Epididymis: Cell debris, lumen	+	1	-	-	1
Spermatic granuloma	+	1	-	-	2
Thymus: Atrophy, cortex	+	-	-	-	1 (1)
Adrenal: Hypertrophy, cortical cell, zona fasciculata	+	0	0	0	1

Values are the number of animals with findings.

Values in parentheses are the number of animals examined.

-: Blank.

Grade: +, slight change; ++, moderate change; +++, severe change.

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table15 Histopathological findings of female rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Item		0 mg/kg	20 mg/kg	50 mg/kg	125 mg/kg
Number of animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings	Grade				
Forestomach: Hyperplasia, squamous cell	+	0	2	$\begin{bmatrix} 6 \\ 1 \end{bmatrix}^*$	$\begin{bmatrix} 7 \\ 5 \end{bmatrix}^{**}$
	++	0	0		
Hyperkeratosis	+	0	2	$\begin{bmatrix} 8 \\ 0 \end{bmatrix}^{**}$	$\begin{bmatrix} 7 \\ 5 \end{bmatrix}^{**}$
	++	0	0		
Ulcer	+	0	0	1	4
Cellular infiltration, inflammatory cell, submucosa	+	0	0	1	3
Fibrosis, submucosa	+	0	0	1	2
Kidney: Dilatation, renal pelvis	+	-	-	-	1 (1)
Spleen: Atrophy, white pulp	+	0	0	1	$\begin{bmatrix} 7 \\ 2 \end{bmatrix}^{**}$
	++	0	0	0	
Atrophy, red pulp	+	0	0	0	2
Increase, extra-medullary hematopoiesis	+	1	0	0	0
Thymus: Atrophy, cortex	++	-	-	3 (3)	10 (10)
Adrenal: Hypertrophy, cortical cell, zona fasciculata	+	0	0	2	8 ^{\$\$}
Necrosis, zona fasciculata	+	0	0	0	1
Mineralization, zona fasciculata	+	0	0	0	1

Values are the number of animals with findings.

Values in parentheses are the number of animals examined.

-: Blank.

Grade: +, slight change; ++, moderate change.

*: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).

**: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

\$\$: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Fisher's exact probability test).

Table 16 Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Stage I- VI											
Group	Number of animals		Number of sertoli cells /ST	Number of spermatogonia		Number of pachytene spermatocytes		Number of round spermatids			
				/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC		
0 mg/kg	12	Mean	22.87	20.12	0.879	54.07	2.371	139.43	6.111		
		S.D.	1.76	3.29	0.125	4.21	0.202	8.72	0.366		
125 mg/kg	12	Mean	22.93	23.08 *	1.021 *	53.03	2.329	133.05	5.851		
		S.D.	2.68	2.73	0.181	4.93	0.230	15.65	0.832		
Stage VII-VIII											
Group	Number of animals		Number of sertoli cells /ST	Number of spermatogonia		Number of preleptotene spermatocytes		Number of pachytene spermatocytes		Number of round spermatids	
				/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC
0 mg/kg	12	Mean	22.02	1.78	0.080	44.38	2.040	61.27	2.818	133.25	6.098
		S.D.	2.61	0.54	0.023	4.30	0.287	5.01	0.384	11.63	0.588
125 mg/kg	12	Mean	22.72	1.80	0.079	45.63	2.023	59.77	2.638	137.43	6.069
		S.D.	1.86	0.36	0.018	3.73	0.241	3.95	0.142	11.09	0.499

ST: Seminiferous tubule.

SC: Sertoli cell per seminiferous tubule.

*: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

(to be continued)

Table 16 Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223) (continued)

Group	Number of animals		Stage IX-XI						
			Number of sertoli cells /ST	Number of spermatogonia		Number of leptotene spermatocytes		Number of pachytene spermatocytes	
				/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC
0 mg/kg	12	Mean	24.08	4.75	0.200	52.35	2.188	65.53	2.734
		S.D.	2.29	1.29	0.060	3.77	0.225	5.07	0.240
125 mg/kg	12	Mean	23.73	3.52 *	0.148 *	48.37 *	2.050	61.25	2.594
		S.D.	2.20	0.85	0.033	4.70	0.238	6.91	0.298
Group	Number of animals		Stage XII-XIV						
			Number of sertoli cells /ST	Number of spermatogonia		Number of spermatocytes 1		Number of spermatocytes 2	
				/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC
0 mg/kg	12	Mean	23.90	4.22	0.177	54.58	2.288	70.10	2.938
		S.D.	1.62	0.85	0.037	3.23	0.137	4.83	0.192
125 mg/kg	12	Mean	23.30	3.92	0.168	51.53	2.217	64.35 *	2.770
		S.D.	1.70	0.49	0.025	5.23	0.229	5.46	0.258

ST: Seminiferous tubule.

SC: Sertoli cell per seminiferous tubule.

Spermatocytes 1: Zygotene or pachytene spermatocytes.

Spermatocytes 2: Pachytene or diplotene spermatocytes.

*: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

Table 17 Reproduction performance of parental rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group	Estrous cycle		Copulation index		Fertility	Gestation	Gestation length (days) ^a	Nursing
	Abnormality	Length (days) ^a	Male	Female	index	index		index
	Incidence (%)		Incidence (%)	Incidence (%)	Incidence (%)	Incidence (%)		Incidence (%)
0 mg/kg	0/12 (0.0)	4.11 0.22	12/12 (100.0)	12/12 (100.0)	12/12 (100.0)	12/12 (100.0)	22.8 0.5	12/12 (100.0)
20 mg/kg	0/12 (0.0)	4.05 0.12	12/12 (100.0)	12/12 (100.0)	12/12 (100.0)	12/12 (100.0)	22.3 0.5	12/12 (100.0)
50 mg/kg	0/12 (0.0)	4.03 0.09	12/12 (100.0)	12/12 (100.0)	12/12 (100.0)	11/12 (91.7)	22.2* 0.4	10/11 (90.9)
125 mg/kg	3/12 (25.0)	[10] 4.08 0.33	12/12 (100.0)	12/12 (100.0)	12/12 (100.0)	7/9 (77.8)	22.6 0.8	$\left\{ \begin{array}{c} 0/3 \\ (0.0) \end{array} \right\}$

Abnormal estrous cycle = (number of female with abnormal estrous cycle / number of females examined) x 100.

Copulation index = (number of animals with successful copulation / number of animals mated) x 100.

Fertility index = (number of pregnant females / number of pairs with successful copulation) x 100.

Gestation index = (number of females with live pups / number of pregnant females) x 100.

Nursing index = (number of females nursing live pups on lactation day 4 / number of females with live pups delivered) x 100.

Values in square brackets are the number of animals examined.

Values in curly brackets are excluded from statistical evaluation because of insufficient sample numbers.

a: Values are means and S.D.

*: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

Table 18 Pregnancy and litter data of rats dosed orally with 2-vinylpyridine in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08223)

Group		Number of pregnant animals	Number of corpora lutea	Number of implantation sites	Implantation index (%)	Delivery index (%)	Lactation day 0							Lactation day 4				
							Number of pups delivered					Sex ratio		Live birth index (%)	Number of live pups	Sex ratio All pups	Viability index (%)	
							Total	Male	Female	Alive	Dead	All pups	Live pups					
0 mg/kg	12	Mean	15.3	15.1	97.989	94.926	14.3	6.6	7.7	14.3	0.0	0.454	0.454	100.000	14.1	0.449	99.028	
		S.D.	3.0	3.2	3.819	5.964	3.0	2.7	2.2	3.0	0.0	0.155	0.155	0.000	2.8	0.154	2.299	
20 mg/kg	12	Mean	17.9	17.4	97.336	93.089	16.2	8.0	8.2	16.1	0.1	0.492	0.490	99.510	16.0	0.492	99.479	
		S.D.	2.4	2.2	4.238	7.056	2.1	2.6	1.9	2.1	0.3	0.123	0.121	1.697	2.1	0.120	1.804	
50 mg/kg	12	Mean	17.1	17.0	99.537	93.209	15.8	9.2	6.7	13.8	2.1	0.580	0.602	88.235	13.5	0.591 *	87.166	
		S.D.	1.7	1.7	1.605	6.193	1.8	2.4	2.3	4.9	5.4	0.136	0.130	30.204	4.8	0.137	30.318	
125 mg/kg	12	Mean	17.2	15.8	87.725	94.120	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	{	(3)	(0)	(3)
		S.D.	4.3	5.3	22.282	6.922	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)		0.0	#	0.000

Implantation index = (number of implantation sites / number of corpora lutea) x 100.

Delivery index = (number of pups born / number of implantation sites) x 100.

Sex ratio on lactation day 0 = (number of male pups born / number of pups born) or (number of live male pups / number of live pups).

Sex ratio on lactation day 4 = number of live male pups / number of live pups.

Live birth index = (number of live pups on lactation day 0 / number of pups born) x 100.

Viability index on lactation day 4 = (number of live pups on lactation day 4 / number of live pups on lactation day 0) x 100.

Values in parentheses are the number of animals examined.

Values in curly brackets are excluded from statistical evaluation because of insufficient sample numbers.

#: Blank.

*: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

Table 19 General appearance of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2-vinylpyridine in rats (SR08223)

Group	Findings	Male					Female				
		Day of lactation					Day of lactation				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
0 mg/kg	Number of pups examined	79	79	79	79	78	92	92	92	92	92
	No abnormal findings	79	79	78	78	77	92	92	92	92	92
	Milk-band negative	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Death	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
20 mg/kg	Number of pups examined	96	95	95	95	95	98	98	97	97	97
	No abnormal findings	95	95	95	95	95	97	96	96	96	96
	Anury and anal atresia	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	Death or missing	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
50 mg/kg	Number of pups examined	110 ^a	99	89	88	88	80 ^b	66	61	60	60
	No abnormal findings	91	88	87	87	86	63	61	60	60	60
	Milk-band negative	7	0	0	0	1	3	0	0	0	0
	Swelling of hindlimb	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	Death or missing	11	10	1	0	0	14	5	1	0	0
125 mg/kg	Number of pups examined	66 ^{c,d,e}	31	6	6	1	62 ^{f,g}	35	10	8	3
	No abnormal findings	6	6	6	0	0	8	8	8	0	0
	Milk-band negative	26	0	0	1	0	30	2	0	3	0
	Trauma	3	0	0	0	0	3	0	0	1	0
	Death or missing	34	25	0	5	1	24	25	2	5	3

Values are the number of pups with findings.

a: Including 7 pups from dams that showed abnormal delivery.

b: Including 11 pups from dams that showed abnormal delivery.

c: Including 3 pups that were not distinguished their sex because of maternal cannibalism.

d: Including 24 pups from dams that showed abnormal delivery.

e: Including 1 pup that was euthanized on lactation day 0 because of maternal death.

f: Including 9 pups from dams that showed abnormal delivery.

g: Including 3 pups that were euthanized on lactation day 0 because of maternal death.

Table 20 Body weight of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2-vinylpyridine in rats (SR08223)

Group	Number of animals		Male			Female		
			Body weight (g) on lactation day			Body weight (g) on lactation day		
			0	1	4	0	1	4
0 mg/kg	12	Mean	7.32	8.21	12.22	6.86	7.63	11.23
		S.D.	0.86	0.95	1.73	0.72	0.91	1.58
20 mg/kg	12	Mean	6.55	7.24 ++	10.41 ++	6.27	6.93	9.95 ++
		S.D.	0.43	0.47	0.78	0.43	0.50	0.72
50 mg/kg	11	Mean		(10)	(10)		(10)	(10)
		S.D.	6.14 **	6.83 ++	9.95 ++	5.85 **	6.52 **	9.43 +
125 mg/kg	7	Mean	(6)	{ (1)	{ (0)		{ (2)	{ (0)
		S.D.	5.15 **	{ 6.20 #	{ #	5.17 **	{ 5.05 #	{ #

Values in parentheses are the number of animals examined.

Values in curly brackets are excluded from statistical evaluation because of insufficient sample numbers.

#: Blank.

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

+ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).

++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 21 Gross findings of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2-vinylpyridine in rats (SR08223)

Item	Group	Male				Female			
		0 mg/kg	20 mg/kg	50 mg/kg	125 mg/kg	0 mg/kg	20 mg/kg	50 mg/kg	125 mg/kg
Findings of dead pups during lactation days 0-4									
Number of pups examined		2	1	19 ^a	61 ^{b,c,d}	0	0	17 ^c	54 ^{f,g}
No abnormal findings		2	1	19	61	-	-	17	54
Findings of pups euthanized on lactation day 4									
Number of pups examined		77	95	88	0	92	97	60	0
No abnormal findings		77	94	87	-	92	96	59	-
Organ: Findings									
Liver: Dark brown discoloration		0	1	0	-	0	0	0	-
Yellowish white patch		0	0	0	-	0	0	1	-
Atrophy		0	1	0	-	0	0	0	-
Hindlimb: Swelling		0	0	1	-	0	0	0	-
External: Anal atresia		0	0	0	-	0	1	0	-
Anury		0	0	0	-	0	1	0	-

Values are the number of pups with findings.

a: Including 7 pups from dams that showed abnormal delivery.

b: Including 3 pups that were not distinguished their sex because of maternal cannibalism.

c: Including 24 pups from dams that showed abnormal delivery.

d: Including 1 pup that was euthanized on lactation day 0 because of maternal death.

e: Including 11 pups from dams that showed abnormal delivery.

f: Including 9 pups from dams that showed abnormal delivery.

g: Including 3 pups that were euthanized on lactation day 0 because of maternal death.

-: Blank.