

プロピオニトリルのラットを用いた  
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0535

CAS No. 107-12-0

2007年3月27日

中央労働災害防止協会  
日本バイオアッセイ研究センター

## 標題

プロピオニトリルのラットを用いた吸入によるがん原性試験

## 試験目的

プロピオニトリルをラットに 104 週間全身暴露し、がん原性を検索した。

## 試験法

本試験は、平成 9 年 3 月 11 日付け、基発第 144 号「がん原性試験による調査の基準」及び OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験 1981 年 5 月 12 日採択）に準じて実施した。

## GLP 対応

本試験は、昭和 63 年 9 月 1 日付け、労働省告示第 76 号「試験施設等が具備すべき基準（安衛法 GLP）」（一部改正。平成 12 年 3 月 29 日付け、労働省告示第 13 号）に準拠し、OECD GLP（1997 年 11 月 26 日採択）に準じて実施した。

## 試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課  
東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

## 試験施設及び運営管理者

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター  
山本 静護  
神奈川県秦野市平沢 2445

プロピオノニトリルのラットを用いた  
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0535

本文

## 本文目次

	頁
要約 .....	1
I 試験材料 .....	3
I-1 被験物質の性状等 .....	3
I-1-1 名称等 .....	3
I-1-2 構造式及び分子量 .....	3
I-1-3 物理化学的性状等 .....	3
I-2 被験物質の使用ロット等 .....	3
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性 .....	4
I-3-1 特性・同一性 .....	4
I-3-2 安定性 .....	4
I-4 試験動物 .....	4
II 試験方法 .....	5
II-1 投与 .....	5
II-1-1 投与経路 .....	5
II-1-2 被験物質の投与方法 .....	5
II-1-3 投与期間 .....	5
II-1-4 投与濃度 .....	5
II-1-5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由 .....	5
II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整 .....	6
II-1-7 被験物質濃度の測定 .....	6
II-2 動物管理 .....	6
II-2-1 各群の使用動物数 .....	6
II-2-2 群分け及び個体識別方法 .....	7
II-2-3 飼育条件 .....	7
(1) 飼育環境 .....	7
(2) 飼料 .....	8
(3) 飲水 .....	8

II-3	観察・検査項目及び方法	8
II-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	8
II-3-2	体重測定	8
II-3-3	摂餌量測定	8
II-3-4	血液学的検査	9
II-3-5	血液生化学的検査	9
II-3-6	尿検査	9
II-3-7	病理学的検査	9
	(1) 剖検	9
	(2) 臓器重量	9
	(3) 病理組織学的検査	10
II-4	数値処理と統計方法	10
II-4-1	数値の取り扱いと表示	10
II-4-2	統計処理	10
III	試験成績	12
III-1	生死状況	12
III-2	一般状態	12
III-3	体重	12
III-4	摂餌量	13
III-5	血液学的検査	13
III-6	血液生化学的検査	13
III-7	尿検査	13
III-8	病理学的検査	14
	III-8-1 剖検	14
	III-8-2 臓器重量	14
	III-8-3 病理組織学的検査	14
	III-8-4 死因	15
IV	考察及びまとめ	16
IV-1	生存率、一般状態、体重、摂餌量	16
IV-2	腫瘍性及び腫瘍関連病変	16
IV-3	その他の影響	17
IV-4	無毒性量 (NOAEL)	17

IV-5	他文献との比較等	18
V	結論	19
VI	文献	20

## 要約

プロピオノニトリルのがん原性を検索する目的で F344/DuCr1Cr1j (旧 F344/DuCrj) ラットを用いた吸入による 2 年間 (104 週間) の試験を実施した。

本試験は、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、各群雌雄とも 50 匹とし、合計 400 匹を用いた。被験物質の投与は、プロピオノニトリルを 1 日 6 時間、1 週 5 日間、104 週間、動物に全身暴露することにより行った。投与濃度は、雌雄とも 25、50 及び 100 ppm (公比 2) とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

プロピオノニトリルの暴露の結果、動物の生存率は雄の 100 ppm 群がやや低値であった。雌では変化はみられなかった。体重は雄の 100 ppm 群で軽度な体重増加の抑制 (最終体重 : 対照群の 92%) がみられた。雌の体重にプロピオノニトリルの影響はみられなかった。また、血液学的検査で網赤血球比の増加が雌の 50 ppm 以上の群にみられた。

病理学的検査の結果、雌雄ともプロピオノニトリルに関連した腫瘍の発生増加は認められなかった。また、肝臓と脾臓の重量増加が雌の 50 ppm 以上の群にみられたが、肝臓と脾臓を含めプロピオノニトリルの影響と思われる非腫瘍性病変の発生率の増加は認められなかった。

以上のように、F344/DuCr1Cr1j ラットを用いて、プロピオノニトリルの 2 年間 (104 週間) にわたる吸入によるがん原性試験を行った結果、雌雄とも腫瘍の発生増加は認められず、プロピオノニトリルのラットに対するがん原性を示す証拠は得られなかった。

## プロピオノニトリルのがん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雄)

		投与濃度 (ppm)				Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
		0	25	50	100		
		検査動物数					
良性 腫瘍	皮下組織	線維腫	1	8 *	2	3	↑
	肺	細気管支-肺胞上皮腫	6	3	2	4	
	膵臓	島細胞腺腫	3	3	2	0	
	下垂体	腺腫	6	4	7	8	
	甲状腺	C-細胞腺腫	3	6	8	6	
	副腎	褐色細胞腫	2	2	3	3	
	精巣	間細胞腫	47	49	44	48	
	乳腺	線維腺腫	3	0	0	2	
	包皮腺	腺腫	3	1	1	2	
悪性 腫瘍	脾臓	単核球性白血病	5	5	6	4	

## プロピオノニトリルのがん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雌)

		投与濃度 (ppm)				Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
		0	25	50	100		
		検査動物数					
良性 腫瘍	下垂体	腺腫	11	12	10	8	
	甲状腺	C-細胞腺腫	2	2	1	4	
	子宮	内膜間質性ポリープ	11	10	12	14	
	乳腺	線維腺腫	4	8	6	6	
悪性 腫瘍	脾臓	単核球性白血病	8	4	9	9	
	子宮	内膜間質性肉腫	4	0	2	2	

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

\* :  $p \leq 0.05$  で有意

\*\* :  $p \leq 0.01$  で有意

(Fisher 検定)

↑ :  $p \leq 0.05$  で有意増加

↑↑ :  $p \leq 0.01$  で有意増加

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

↓ :  $p \leq 0.05$  で有意減少

↓↓ :  $p \leq 0.01$  で有意減少

(Cochran-Armitage 検定)



## I 試験材料

## I-1 被験物質の性状等

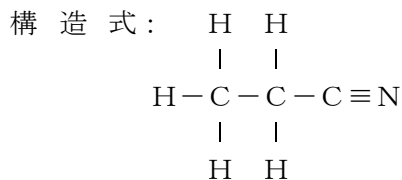
## I-1-1 名称等

名 称： プロピオニトリル (Propionitrile)

別 名： プロピオニトリル

CAS No. : 107 - 12 - 0

## I-1-2 構造式及び分子量 (文献 1)



分子量： 55.08

## I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状： 無色透明の液体

沸 点： 97.2°C

蒸 気 圧： 47.4mmHg (25°C)

比 重： 0.7818 (20°C/4°C)

溶 解 性： アルコール、エーテルに溶解、水に 103g/L (25°C) 溶解

保 管 条 件： 室温で暗所に保管

## I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号： PKK4727 (2003/12/1~2004/11/8)

CEL7045 (2004/11/9~2005/6/21)

SDM0881 (2005/6/22~2005/11/25)

製 造 元： 和光純薬工業(株)

グ レ ー ド： 和光特級

純 度： 99.9% (和光純薬工業(株) 検査成績書データ)

### I-3 被験物質の特性・同一性、安定性

#### I-3-1 特性・同一性

被験物質の同一性は、ロットごとにマススペクトルを質量分析計 (Hitachi M-80B) を用いて測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) を用いて測定し、それぞれの文献値と比較することにより確認した。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値 (文献 2) と同じフラグメントピークを示し、また、赤外吸収スペクトルも文献値 (文献 3) と同じ波数にピークが認められ、被験物質はプロピオノニトリルであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX A 1 に示した。

#### I-3-2 安定性

被験物質の安定性は、ロットごとに使用開始前及び使用終了後にガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 5890A) を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、各ロットとも使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の被験物質は安定であることを確認した。

それらの結果は APPENDIX A 2 に示した。

### I-4 試験動物

動物は、日本チャールス・リバー(株) (厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795) の F344/DuCrIj (旧 F344/DuCrj) ラット (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 227 匹を 4 週齢で導入し、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 200 匹 (群構成時体重範囲、雄：112~131g、雌：88~102g) を選別し、試験に用いた。

なお、F344/DuCrIj ラット (SPF) を選択した理由は、遺伝的に安定していること、腫瘍の自然発生率が低いこと、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られていることによる。

## II 試験方法

### II-1 投与

#### II-1-1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

#### II-1-2 被験物質の投与方法

投与は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行った。

#### II-1-3 投与期間

投与期間は、1日6時間、原則として1週5日の暴露で104週間とし、計486回の暴露を行った。

#### II-1-4 投与濃度

投与濃度は、25、50及び100 ppmの3段階（公比2）に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

#### II-1-5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与経路は、被験物質を生産、使用する作業環境における労働者への主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間は、がん原性試験による調査の基準（安衛法）（文献4）及びOECD化学品テストガイドライン451（発癌性試験）（文献5）に従い、2年間（104週間）とした。

投与濃度は2週間試験（試験番号0446）及び13週間試験（試験番号0455）の結果（文献6、7）をもとに決定した。2週間試験は25～400 ppm（公比2）の濃度で行った。その結果、200 ppm以上の群で動物の死亡がみられたが、100 ppm以下の群では死亡はみられなかった。13週間試験は6～100 ppm（公比2）の濃度で試験を行った。その結果、雌雄とも動物の死亡はみられなかったが、100 ppm群で体重増加の抑制（雄）及び貧血傾向（雌雄）が認められた。しかし、雄の体重増加の抑制は対照群の10%未満（最終体重：対照群の92%）であり、雌雄でみられた貧血も軽度であった。50 ppm以下の群にはプロピオノ

ニトリルの影響は認められなかった。これらの結果より、100 ppm が 2 年間のがん原性試験における最大耐量であると考え、がん原性試験の投与濃度は雌雄とも 最高濃度を 100 ppm とし、以下 50 ppm、25 ppm（公比 2）と決定した。

#### II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質の発生方法は FIGURE 1 に示した。被験物質供給装置（柴田科学(株) 特注）の発生容器内の被験物質を循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のバブリングにより蒸発させた。この被験物質の蒸気を循環式恒温槽で一定温度に冷却した。次に、清浄空気（希釈空気）と混合して、再加熱し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度はガスクロマトグラフで監視し、その濃度データをもとに設定濃度になるように被験物質の吸入チャンバーへの供給量を調節した。

#### II-1-7 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、自動サンプリング装置付ガスクロマトグラフ（Shimadzu GC-14B）により、暴露開始前から暴露終了後まで 15 分ごとに測定した。

濃度測定結果を TABLE 1 に示した。各投与群の被験物質濃度は、その平均値と設定濃度の差（（平均値－設定濃度）／設定濃度×100）が 0.4 %以内、変動係数（標準偏差／平均値×100）が 2.0 %以内であり、高い精度でチャンバー内濃度が管理されていることが示された。

### II-2 動物管理

#### II-2-1 各群の使用動物数

投与群 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群雌雄各 50 匹の動物を用いた。

群 名 称	動物数（動物番号）	
	雄	雌
対 照 群	50 匹（1001～1050）	50 匹（2001～2050）
25 ppm 群	50 匹（1101～1150）	50 匹（2101～2150）
50 ppm 群	50 匹（1201～1250）	50 匹（2201～2250）
100 ppm 群	50 匹（1301～1350）	50 匹（2301～2350）

## II-2-2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めなかった動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）により実施した（文献 8）。

動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室（501 室）に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

## II-2-3 飼育条件

### (1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室（517・518 室）で、馴化期間及び投与期間中は、吸入試験室（501 室）の吸入チャンバー内で動物を飼育した。

検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件及び使用したケージを以下に示した。検疫室、吸入試験室の温度、湿度は実測値（平均値±標準偏差）を < > 内に、また、吸入チャンバー内環境の測定結果は APPENDIX B に示した。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温 度 : 検疫室 ;  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  < 517 室 ;  $23.1 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、518 室 ;  $23.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  >

吸入試験室 ;  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  < 501 室 ;  $21.6 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  >

吸入チャンバー内 ;  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$

湿 度 : 検疫室 ;  $55 \pm 15\%$  < 517 室 ;  $52 \pm 1\%$ 、518 室 ;  $50 \pm 1\%$  >

吸入チャンバー内 ;  $55 \pm 15\%$

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

換気回数 : 検疫室・吸入試験室 ; 15~17 回/時

吸入チャンバー内 ;  $12 \pm 1$  回/時

圧 力 : 吸入チャンバー内 ;  $0 \sim -15 \times 10\text{Pa}$

ケージへの動物の収容方法 : 検疫期間 ; 群飼 (5 匹)、馴化・投与期間 ; 単飼

ケージの材質・形状・寸法等 :

検疫期間 ; ステンレス製群飼網ケージ (340(W)×294(D)×176(H) mm/5 匹)

馴化期間 ; ステンレス製 6 連網ケージ (125(W)×216(D)×176(H) mm/匹)

投与期間 ; ステンレス製 5 連網ケージ (150(W)×216(D)×176(H) mm/匹)

## (2) 飼料

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株) (千葉工場：千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1 固型飼料 (30KGγ-線照射滅菌飼料) を固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

なお、試験に使用した飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)から自社分析データを使用ロットごとに入手し、保管した。飼料中の夾雑物については(財)日本食品分析センター (東京都渋谷区元代々木町 52-1) の分析データを使用ロットごとに入手し、試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

## (3) 飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水 (神奈川県秦野市水道局供給) をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(財)食品薬品安全センター秦野研究所 (神奈川県秦野市落合 729-5) に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し、結果を試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

## II-3 観察・検査項目及び方法

### II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死及び瀕死の確認を毎日 1 回、また、一般状態の詳細な観察は週 1 回行った。

### II-3-2 体重測定

体重測定は、投与開始後 13 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回、暴露開始前に行った。ただし、54 週も測定し、以降 4 週に 1 回 (104 週にも測定) 測定した。また、動物の死亡発見時、切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重 (搬出時体重) を測定した。

### II-3-3 摂餌量測定

摂餌量は、投与開始後 13 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から 1 匹 1 日当たりの摂餌量を算出した。ただし、54 週も測定し、以降 4 週に 1 回 (104 週にも測定) 測定した。

#### II-3-4 血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血した血液を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX Q に示した。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、網赤血球比、白血球数、白血球分類

#### II-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX Q に示した。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 $\gamma$ -GTP、CK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

#### II-3-6 尿検査

投与 103 週の検査時まで生存した動物から、新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティステックス、バイエル社製）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン

#### II-3-7 病理学的検査

##### (1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

##### (2) 臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について、下記に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

測定臓器：副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

### (3) 病理組織学的検査

全動物について下記に示した器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

検査器官・組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄（大腿骨）、リンパ節（腋窩、腹壁等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

## II-4 数値処理と統計方法

### II-4-1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は ppm を単位として、小数点以下第 3 位まで測定し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

体重は g を単位とし、整数値の 1 の位まで測定し、表示した。

摂餌量は g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

臓器実重量は g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第 4 位を四捨五入し、小数点以下第 3 位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査は APPENDIX Q に示した単位と精度により表示した。

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

### II-4-2 統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数とした。病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定値は、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平



均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett 型の多重比較を行った。

病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード 0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準にしてグレード 1~4 に分け、 $\chi^2$  検定を行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間との  $\chi^2$  検定を行った。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担腫瘍臓器数について、Peto 検定（文献 9）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また、Peto 検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス(注)を用いて、死亡率法（コンテックス 3, 4 を付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテックス 0, 1, 2 を付与された腫瘍についての検定）、死亡率法+有病率法（コンテックス 0~4 の総計で検定）を行った。

各検定は 5%の有意水準で、Peto 検定、Fisher 検定は片側検定、その他の検定は両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5%及び 1%の有意水準の表示を行った。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

0：定期解剖動物にみつかった腫瘍

1：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍

2：多分 1 だと思うが、確かでない腫瘍

3：多分 4 だと思うが、確かでない腫瘍

4：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

### Ⅲ 試験成績

#### Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE 2, 3、FIGURE 2, 3 及び APPENDIX C 1, 2 に示した。

—雄—

100 ppm 群の生存率が対照群に比べやや低値であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：44 匹（88%）、25 ppm 群：44 匹（88%）、50 ppm 群：42 匹（84%）、100 ppm 群：36 匹（72%）であった。

—雌—

投与群の生存率に被験物質の影響はみられなかった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：37 匹（74%）、25 ppm 群：45 匹（90%）、50 ppm 群：36 匹（72%）、100 ppm 群：39 匹（78%）であった。

#### Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX C 1, 2 に示した。

—雄—

皮膚の潰瘍が 100 ppm 群に多く（対照群 1 匹、25 ppm 群 0 匹、50 ppm 群 1 匹、100 ppm 群 6 匹）みられた。

—雌—

貧血が 100 ppm 群に多く（対照群 4 匹、25 ppm 群 1 匹、50 ppm 群 4 匹、100 ppm 群 8 匹）みられた。

#### Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE 2, 3、FIGURE 4, 5 及び APPENDIX D 1, 2 に示した。

—雄—

100 ppm 群で投与期間を通じて、軽度な体重増加の抑制がみられた。

最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 25 ppm 群：100%、50 ppm 群：97%、100 ppm 群：92%であった。

—雌—

変化はみられなかった。

最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 25 ppm 群：105%、50 ppm 群：100%、100 ppm 群：99%であった。

### Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE 4, 5、FIGURE 6, 7 及び APPENDIX E 1, 2 に示した。

—雄—

100 ppm 群の摂餌量が対照群に比べやや低値であった。

—雌—

変化はみられなかった。

### Ⅲ-5 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 6 と APPENDIX F 1, 2 に示した。

—雄—

変化はみられなかった。

—雌—

網赤血球比の増加が 50 ppm 以上の群で、MCV、MCH の増加及び MCHC の減少が 100 ppm 群でみられた。

### Ⅲ-6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 7 と APPENDIX G 1, 2 に示した。

—雄—

変化はみられなかった。

—雌—

リン脂質の増加が 100 ppm 群でみられた。

### Ⅲ-7 尿検査

尿検査の結果を APPENDIX H 1, 2 に示した。

—雌雄—

変化はみられなかった。

### Ⅲ-8 病理学的検査

#### Ⅲ-8-1 剖検

剖検所見を APPENDIX I 1~6 に示した。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

#### Ⅲ-8-2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を TABLE 8, 9 と APPENDIX J 1, 2, APPENDIX K 1, 2 に示した。

—雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、100 ppm 群では腎臓、肝臓、脳の体重比の高値がみられたが、これらの変化は同群の搬出時体重の低値によるものと思われる。

—雌—

肝臓の実重量と体重比の高値及び脾臓の実重量の高値が 50 ppm 以上の群でみられた。

その他、心臓の実重量の高値が 25 ppm 群と 50 ppm 群で、体重比の高値が 50 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなく、被験物質の暴露による影響ではないと判断した。

#### Ⅲ-8-3 病理組織学的検査

腫瘍性病変のうち統計学的に有意差が認められた腫瘍を TABLE 10, 11 に示した。また、非腫瘍性病変を APPENDIX L 1~6 に示した。腫瘍性病変の結果は、担腫瘍動物数と腫瘍数を APPENDIX M 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を APPENDIX N 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を APPENDIX O 1, 2 に、転移性病変を APPENDIX P 1, 2 に示した。また、腫瘍のうち統計学的に有意差が認められた腫瘍について、日本バイオアッセイ研究センターにおけるヒストリカルコントロールデータ (試験ごとの発生率 (最小%~最大%) と平均発生率(%), 発生匹数/総匹数) を雌雄別にそれぞれ TABLE 12 と 13 に示した。

—雄—

##### 1) 腫瘍性病変

被験物質の暴露による腫瘍の発生増加はみられなかった。

なお、皮下組織の線維腫の発生は Fisher 検定で 25 ppm 群に増加がみられた。しかし、有意な発生増加は低濃度群のみであり、また、その発生 (25 ppm 群 : 8 匹、16%) は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内 (最小 2%~最大 20%、平均発生率 7.6%) であることから、25 ppm 群の発生増加は被験物質の暴露によるものではないと判断した。また、下垂体の腺腫の発生 (対照群 : 6 匹、12%、25 ppm 群 : 4 匹、8%、50 ppm 群 : 7 匹、14%、100 ppm 群 : 8 匹、16%) は、Peto 検定 (死亡率法) で増加傾向を示した。しかし、いずれの投与群の発生も当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内 (最小 14%~最大 66%、平均発生率 32.6%) であることから、下垂体の腺腫の発生増加は被験物質の暴露による影響とは考えられなかった。

## 2) 非腫瘍性病変

統計的に有意な非腫瘍性病変の増加及び減少はみられなかった。

—雌—

### 1) 腫瘍性病変

被験物質の暴露による腫瘍の発生増加はみられなかった。

なお、子宮の子宮内膜間質性肉腫の発生 (対照群 : 4 匹、8%、25 ppm 群 : 0 匹、0%、50 ppm 群 : 2 匹、4%、100 ppm 群 : 2 匹、4%) は、Peto 検定の有病率法で増加傾向を示した。しかし、いずれの投与群においても、その発生率は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内 (最小 0%~最大 8%、平均発生率 1.2%) であり、また、対照群に比較して低値であることから、Peto 検定の有病率法での子宮内膜間質性肉腫の発生増加は生物学的意義のないものと判断した。

### 2) 非腫瘍性病変

被験物質の暴露による有意な非腫瘍性病変の増加はみられなかった。

なお、脾臓の萎縮と網膜萎縮が 100 ppm 群で減弱した。

## III-8-4 死因

病理学的にみた死亡/瀕死の原因を TABLE 14 に示した。

—雌雄—

投与群に特定の病変あるいは腫瘍による死亡の増加はみられなかった。

#### IV 考察及びまとめ

プロピオニトリルのラットを用いた2年間の全身暴露による吸入試験（投与濃度：25、50及び100 ppm）を行ったが、腫瘍性病変の発生にプロピオニトリルの影響は認められなかった。

##### IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

生存率は雄の100 ppm群がやや低値であった。雌では変化はみられなかった。

一般状態の観察では、雄で皮膚の潰瘍が100 ppm群に多くみられた。雌では貧血が100 ppm群に多くみられた。

体重は雄の100 ppm群で軽度な体重増加の抑制（最終体重：対照群の92%）がみられた。雌ではプロピオニトリルの影響はみられなかった。

摂餌量は雄の100 ppm群がやや低値であった。

##### IV-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

最高濃度の100 ppm群においても、雌雄ともプロピオニトリルに関連した腫瘍の発生増加は認められなかった。

IARC（文献10）は、最高投与濃度を、腫瘍発生の結果以外で動物の寿命の長さを短縮させず、対照群と比較して10%以上の体重増加の抑制を引き起こす毒性兆候を惹起させない濃度と定義した。米国国立がん研究所（NCI）小動物発がん性試験ガイドラインでは（文献11）、小動物を用いるがん原性試験の最高投与濃度は、対照群と比較して10%以下の体重抑制を引き起こす濃度で、かつ発がん性に関する反応以外に、毒性的兆候、病理学的傷害による死亡率の上昇を引き起こさないと推定される最高濃度、即ち、最大耐量（Maximum Tolerated Dose (MTD)）を最高投与濃度として用いると定義した。また、体重増加の抑制に関する勧告は経験的なものであり、結果として超過した場合でも試験を無効にするものではないともいわれている（文献12）。

本がん原性試験の投与濃度は、II-1-5に示したように、2週間と13週間の予備試験の結果から100 ppmを最高濃度として設定した。すなわち、2週間試験（投与濃度25～400 ppm）では、雄は200 ppm以上、雌は400 ppmで死亡がみられた（文献6）。13週間試験（投与濃度6～100 ppm）では雌雄とも死亡はみられなかったが、雄は100 ppmで体重増加の抑制が認められた（文献7）。雄の体重抑制は対照群の10%未満（最終体重：対照群の92%）であったことから、雄ラットのがん原性試験におけるMTDは100 ppmであると推定した。さらに、当センターの吸入チャンバーは各群とも一つのチャンバーに雌雄各50匹を収容し、雌雄同一濃度で暴露するタイプであることから、本試験の最高濃度は雄ラットのがん原性試験におけるMTDであ

ると推定した 100 ppm とした。

本がん原性試験においても、最高濃度群の 100 ppm 群では生存率に大きな低下はみられず、雄の体重抑制が対照群に比べ 8%であったことから、100 ppm が雄ラットのがん原性試験における MTD として適切であったことを確認した。

#### IV-3 その他の影響

血液学的検査では、網赤血球比の増加が雌の 50 ppm 以上の群で、MCV、MCH の増加及び MCHC の減少が雌の 100 ppm 群でみられた。赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値には変化はみられなかったが、一般状態の観察では貧血が雌の 100 ppm 群に多くみられた。予備試験として行った 2 週間試験では、網赤血球比の増加が 100 ppm 群の雌にみられ(文献 6)、また、同じく 13 週間試験では、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少及び網赤血球比の増加が 100 ppm 群の雄に、赤血球数、ヘモグロビン濃度の減少及び網赤血球比の増加が 100 ppm 群の雌にみられた(文献 7)。これらのことから、本試験でみられた網赤血球比の増加もプロピオニトリルの血液系への影響を示唆するものと考えられる。血液生化学的検査では、リン脂質の増加が雌の 100 ppm 群でみられたのみで、尿検査では雌雄とも変化はみられなかった。

また、病理学的検査では、臓器重量の測定で肝臓と脾臓の重量増加が雌の 50 ppm 以上の群にみられた。しかし、病理組織学的検査では、肝臓と脾臓を含めプロピオニトリルの影響と思われる非腫瘍性病変の増加は認められなかった。

#### IV-4 無毒性量 (NOAEL)

プロピオニトリルのラットの 13 週間吸入試験では、100 ppm 群で体重増加の抑制(雄)及び貧血傾向(雌雄)が認められ、50 ppm 以下の群にはプロピオニトリルの影響は認められなかったことから、プロピオニトリルのラットに対する 13 週間吸入暴露による無毒性量 (NOAEL) は、体重と血液系への影響をエンドポイントとして 50 ppm であると考えられた(文献 7)。

本がん原性試験では、雄の 100 ppm 群で体重増加の抑制(最終体重:対照群の 92%)がみられ、雌の 50 ppm 以上の群に網赤血球比の増加及び肝臓と脾臓の重量増加がみられた。従って、本試験におけるプロピオニトリルのラットに対する 2 年間吸入暴露による無毒性量 (NOAEL) は、血液系及び肝臓と脾臓の重量への影響をエンドポイントとして 25 ppm であると考えられた。

## IV-5 他文献との比較等

① がん原性：プロピオノニトリルのラットを用いたがん原性試験、または長期試験の文献はみつからなかった。また、IARC ではプロピオノニトリルのがん原性について評価していない。

② 変異原性：プロピオノニトリルの微生物を用いた変異原性試験は、ネズミチフス菌 TA97、TA98、TA100、TA1535 の 4 菌株を使用し、プレインキュベーション法により代謝活性化系の存在下と非存在下で実施されている。代謝活性化系は、ラット肝 S9 及びハムスター肝 S9 を 10% 及び 30% の S9 mix に調整して使用している。プロピオノニトリルの微生物を用いた変異原性試験の結果は、使用した全ての菌株で陰性を示した（文献 13）。

また、プロピオノニトリルの培養細胞を用いた変異原性試験は、染色体異常試験及び姉妹染色分体交換（SCE）試験が実施されている。両試験ともチャイニーズハムスター卵巣由来の CHO 細胞を使用し、代謝活性化系（ラット肝 S9）の存在下と非存在下で実施されている。ここでの染色体異常試験は染色体の構造異常のみを評価の対象としており、数的異常については評価していない。プロピオノニトリルの染色体異常試験及び SCE 試験の結果は、それぞれ陰性を示した（文献 13）。

③ 代謝：プロピオノニトリルは速やかに代謝され、シアン化物イオンになると考えられている（文献 14）。 $C^{14}$  でラベルされたプロピオノニトリルをラット静脈内に投与し代謝物について分析した試験では、プロピオノニトリルは体内でシアン化物に代謝され、中でも肝ミクロゾーム分画での代謝速度が速いと述べられている（文献 15）。また、シアン化合物は、体内でシアンイオン（ $CN^-$ ）を遊離することにより毒性を発現すると考えられており、その機序はシアンイオンが細胞呼吸にかかわる細胞内電子伝達系のシトクロム酸化酵素中のヘム鉄（ $Fe^{3+}$ ）と結合することで酵素活性を阻害し、その結果、細胞呼吸が停止するとされている。さらに、シアン化物は  $Fe^{3+}$  を含むメトヘモグロビンとただちに結合する。シアンイオン濃度が致死量ほど高くなければ、シトクロム酸化酵素の鉄（III）イオンまたはメトヘモグロビンの結合から遊離し、チオシアン酸塩イオン（ $SCN^-$ ）に転換され、尿中のチオシアン酸塩として排泄される（文献 14）。



## V 結論

F344/DuCr1Cr1j ラットを用いて、プロピオノニトリルの2年間（104週間）にわたる吸入によるがん原性試験を行った結果、雌雄とも腫瘍の発生増加は認められず、プロピオノニトリルのラットに対するがん原性を示す証拠は得られなかった。

## VI 文献

1. U.S. National Library of Medicine. 2007. Propionitrile, Chemical/Physical Properties. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>. [accessed 14 February 2007].
2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY : John Wiley and Sons.
3. 和光純薬工業(株). 2002. プロピオノニトリル, 赤外吸収スペクトル.
4. 労働省労働基準局長. 1997. がん原性試験による調査の基準. 基発 第 144 号, 平成 9 年 3 月 11 日
5. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451 "Carcinogenicity Studies". Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
6. 日本バイオアッセイ研究センター. 2004. プロピオノニトリルのラットを用いた吸入による 2 週間毒性試験報告書. 神奈川 : 中央労働災害防止協会, 日本バイオアッセイ研究センター.
7. 日本バイオアッセイ研究センター. 2004. プロピオノニトリルのラットを用いた吸入による 13 週間毒性試験報告書. 神奈川 : 中央労働災害防止協会, 日本バイオアッセイ研究センター.
8. 阿部正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療 14:7285-7302.
9. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S, et al. 1980. Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. Lyon: IARC. IARC Monographs Suppl 2:311-426.

10. Bannasch P, Griesemer RA, Anders F, Becker R, Cabral JR, Della Porta G, et al. 1986. Long-term assays for carcinogenicity in animals. In: Long-Term and Short-Term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. (Montesano R, Bartsch H, Vainio H, Wilbourn J, Yamasaki H. eds.). Lyon: IARC. IARC Scientific Publications No. 83:13-83.
11. Sontag JM, Page NP, Saffiotti U. 1976. Guidelines for carcinogene bioassay in small rodents. NCI-CG-TR-1. DHEW Publication No.(NIH)76-801. Bethesda,MD: National Cancer Institute. 13-15.
12. Haseman JK. 1985. Issues in carcinogenicity testing: dose selection. *Fundam Appl Toxicol* 5:66-78.
13. National Toxicology Program. 2007. Database Search Application. Propionitrile, Genetic Toxicity Studies. Available: [http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp\\_tox/index.cfm](http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp_tox/index.cfm). [accessed 15 February 2007].
14. Hartung R. 1982. Cyanides and Nitriles. In: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, 3th ed. (Clayton GD, Clayton FE. eds.). New York, NY : John Wiley and Sons. 4845-4850,4871-4872.
15. Mumtaz MM, Farooqui MYH, Cannon-Cooke EP, Ahmed AE. 1997. Propionitrile: Whole body autoradiography, conventional toxicokinetic and metabolism studies in rats. *Toxicol Ind Health* 13:27-41.