

# メタクリロニトリルの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Methacrylonitrile on Bacteria

### 要約

メタクリロニトリルについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537<sup>1)</sup>および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup>の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験はS9 mix無添加試験および添加試験ともに313~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。

その結果、2回の本試験とも用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果からメタクリロニトリルは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

### 方法

#### 1. 被験物質

メタクリロニトリルは、無色透明の液体である。用いた被験物質は、ロット番号P-30A、純度99%、製造 旭化成工業(株)(岡山)であり、旭化成工業(株)から供与された。被験物質は、使用時まで遮光して冷蔵した。本ロットについては、試験期間中安定であることが確認された。

メタクリロニトリルは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:ACQ2095, 和光純薬工業(株))に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

#### 2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌ごとに用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれTable中に示した。

- 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF2, 和光純薬工業(株))  
アジ化ナトリウム (SA, 和光純薬工業(株))  
9-アミノアクリジン (9AA, Sigma Chem. Co.)  
2-アミノアントラセン (2AA, 和光純薬工業(株))

AF2, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを-20℃で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

#### 3. 検定菌

*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

*S. typhimurium*の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA*株は1997年4月9日に日本バイオアッセイ研究センターの松島泰次郎博士から分与された。

検定菌は-80℃で凍結保存したのを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)およびアンピシリン耐性因子pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントプロスNo. 2(Oxoid Ltd.)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

#### 4. 培地およびS9 mixの組成

##### 1) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地1Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
大洋寒天(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

##### 2) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)または(C)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco Lab.)	0.6 w/v %
塩化ナトリウム	0.5 w/v %

##### (B) *Salmonella typhimurium*用

L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L

##### (C) *Escherichia coli*用

L-トリプトファン	0.5 mmol/L
-----------	------------

## 3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたりの組成は下記のとおりである。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol
NADH	4 $\mu$ mol
NADPH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ mol

\*:7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製したS9(キッコマン株)を用いた。

## 5. 試験方法

プレインキュベーション法<sup>3)</sup>により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 mL)、検定菌液0.1 mLを混合し、37℃で20分間プレインキュベーションしたのち、約45℃に保温したトッパアガー2 mLを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。同時に実施した試験については、陰性および陽性対照群を共通とした。

培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈殿の有無は、肉眼により観察した。また、抗菌性の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。

用量設定試験は1回、本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。

## 6. 判定基準

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定することとした。

## 結果および考察

50.0~5000  $\mu$ g/plateの範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した。その結果、すべての検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌

性は認められなかった。また、被験物質に由来する沈殿もすべての用量で認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix無添加試験および添加試験とも5000  $\mu$ g/plateとした。

最高用量を5000  $\mu$ g/plateとして公比2で5用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、メタクリロニトリルは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

なおメタクリロニトリルは、復帰変異試験およびショウジョウバエを用いた伴性劣性致死突然変異試験とともに陰性の結果が得られており<sup>4,5)</sup>、当研究所で本試験と並行して実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では染色体の構造異常および倍数性細胞が誘発され、陽性であった<sup>6)</sup>。また、関連物質であるアクリロニトリルについては、復帰変異試験および染色体異常試験とともに陽性の結果が<sup>7)</sup>、メチルメタクリレートについては、復帰変異試験で陰性、染色体異常試験および培養細胞を用いた突然変異試験で陽性の結果が得られている<sup>8-10)</sup>。

## 文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp. 273-285.
- 4) E. Zeiger, *et al.*, *Environ. Mutagenesis* **9** (Suppl. 9), 1 (1987).
- 5) S. Zimmering, *et al.*, *Environ. Mol. Mutagenesis* **14**, 245 (1989).
- 6) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **8**, 656 (2001).
- 7) 石館基, "<改定>染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 9.
- 8) T. H. J. M. Waegemaekers, M. P. M. Bensink, *Mutat. Res.*, **37**, 95 (1984).
- 9) C. L. Doerr, *et al.*, *Mutat. Res.*, **22**, 191 (1989).
- 10) H. Schweikl, *et al.*, *Mutat. Res.*, **15**, 119 (1998).

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：原 巧, 川上久美子, 山本明子,  
三枝克彦, 加藤初美  
(財)食品薬品安全センター秦野研究所  
〒257-8523 秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)  
Takumi Hara, Kumiko Kawakami,  
Akiko Yamamoto, Katsuhiko Saegusa,  
Hatsumi Kato  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,  
Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Mutagenicity of methacrylonitrile on bacteria (I)

With(+)or without(-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants(number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type						Frameshift type								
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	137	138	138	6	11	12	32	22	19	20	28	23	15	15	12
		( 138 $\pm$ 0.6 )			( 10 $\pm$ 3.2 )			( 24 $\pm$ 6.8 )			( 24 $\pm$ 4.0 )			( 14 $\pm$ 1.7 )		
	313	134	145	143	11	7	15	25	26	19	20	23	22	2	4	12
		( 141 $\pm$ 5.9 )			( 11 $\pm$ 4.0 )			( 23 $\pm$ 3.8 )			( 22 $\pm$ 1.5 )			( 6 $\pm$ 5.3 )		
	625	117	167	155	10	15	8	27	22	33	20	24	31	18	9	12
		( 146 $\pm$ 26.1 )			( 11 $\pm$ 3.6 )			( 27 $\pm$ 5.5 )			( 25 $\pm$ 5.6 )			( 13 $\pm$ 4.6 )		
	1250	122	145	143	12	13	11	19	17	30	19	26	27	10	14	7
	( 137 $\pm$ 12.7 )			( 12 $\pm$ 1.0 )			( 22 $\pm$ 7.0 )			( 24 $\pm$ 4.4 )			( 10 $\pm$ 3.5 )			
2500	145	117	147	7	8	15	15	23	31	20	21	18	17	11	7	
	( 136 $\pm$ 16.8 )			( 10 $\pm$ 4.4 )			( 23 $\pm$ 8.0 )			( 20 $\pm$ 1.5 )			( 12 $\pm$ 5.0 )			
5000	136	148	168	10	10	10	25	24	25	18	27	27	10	11	11	
	( 151 $\pm$ 16.2 )			( 10 $\pm$ 0.0 )			( 25 $\pm$ 0.6 )			( 24 $\pm$ 5.2 )			( 11 $\pm$ 0.6 )			
S9 mix (+)	0	176	146	154	8	10	10	25	28	27	38	29	26	9	14	19
		( 159 $\pm$ 15.5 )			( 9 $\pm$ 1.2 )			( 27 $\pm$ 1.5 )			( 31 $\pm$ 6.2 )			( 14 $\pm$ 5.0 )		
	313	159	168	142	7	13	4	21	27	28	20	28	31	12	17	15
		( 156 $\pm$ 13.2 )			( 8 $\pm$ 4.6 )			( 25 $\pm$ 3.8 )			( 26 $\pm$ 5.7 )			( 15 $\pm$ 2.5 )		
	625	147	170	166	13	7	8	34	29	20	29	26	21	8	14	15
		( 161 $\pm$ 12.3 )			( 9 $\pm$ 3.2 )			( 28 $\pm$ 7.1 )			( 25 $\pm$ 4.0 )			( 12 $\pm$ 3.8 )		
	1250	166	157	130	9	14	9	23	31	22	18	34	28	12	18	20
	( 151 $\pm$ 18.7 )			( 11 $\pm$ 2.9 )			( 25 $\pm$ 4.9 )			( 27 $\pm$ 8.1 )			( 17 $\pm$ 4.2 )			
2500	148	147	154	6	8	12	32	25	32	33	29	30	16	20	16	
	( 150 $\pm$ 3.8 )			( 9 $\pm$ 3.1 )			( 30 $\pm$ 4.0 )			( 31 $\pm$ 2.1 )			( 17 $\pm$ 2.3 )			
5000	148	160	154	7	11	16	35	36	33	28	19	30	13	16	20	
	( 154 $\pm$ 6.0 )			( 11 $\pm$ 4.5 )			( 35 $\pm$ 1.5 )			( 26 $\pm$ 5.9 )			( 16 $\pm$ 3.5 )			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	598	557	565	714	702	739	183	260	252	639	628	651	380	585	453
	( 573 $\pm$ 21.7 )			( 718 $\pm$ 18.9 )			( 232 $\pm$ 42.3 )			( 640 $\pm$ 13.1 )			( 473 $\pm$ 103.9 )			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	980	1121	1117	459	402	408	777	891	969	490	535	485	348	395	364
	( 1073 $\pm$ 80.3 )			( 423 $\pm$ 31.3 )			( 879 $\pm$ 96.6 )			( 503 $\pm$ 27.5 )			( 369 $\pm$ 23.9 )			

The purity of the test substance was 99 %.

This substance contained 51 ppm *p*-methoxyphenol as polymerization inhibitor, and 19 ppm acetone, 59 ppm acrylonitrile, 55 ppm propionitrile, 72 ppm methacrolein, 48 ppm isobutyronitrile, 35 ppm hydrogen cyanide, and trace amount of acetonitrile and *cis*-crotonitrile as impurities.

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

Table 2 Mutagenicity of methacrylonitrile on bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	134	163	129	13	13	11	26	22	31	24	26	19	7	12	7
		( 142 $\pm$ 18.4 )			( 12 $\pm$ 1.2 )			( 26 $\pm$ 4.5 )			( 23 $\pm$ 3.6 )			( 9 $\pm$ 2.9 )		
	313	151	147	128	16	17	12	14	24	19	31	21	21	5	8	9
		( 142 $\pm$ 12.3 )			( 15 $\pm$ 2.6 )			( 19 $\pm$ 5.0 )			( 24 $\pm$ 5.8 )			( 7 $\pm$ 2.1 )		
	625	111	148	138	7	8	20	12	20	10	24	28	29	12	15	4
		( 132 $\pm$ 19.1 )			( 12 $\pm$ 7.2 )			( 14 $\pm$ 5.3 )			( 27 $\pm$ 2.6 )			( 10 $\pm$ 5.7 )		
	1250	144	138	124	17	17	17	21	21	20	26	17	17	9	5	10
		( 135 $\pm$ 10.3 )			( 17 $\pm$ 0.0 )			( 21 $\pm$ 0.6 )			( 20 $\pm$ 5.2 )			( 8 $\pm$ 2.6 )		
2500	140	134	123	6	5	11	20	23	11	30	21	26	9	11	8	
	( 132 $\pm$ 8.6 )			( 7 $\pm$ 3.2 )			( 18 $\pm$ 6.2 )			( 26 $\pm$ 4.5 )			( 9 $\pm$ 1.5 )			
5000	134	132	129	15	8	18	15	18	12	20	36	34	9	10	10	
	( 132 $\pm$ 2.5 )			( 14 $\pm$ 5.1 )			( 15 $\pm$ 3.0 )			( 30 $\pm$ 8.7 )			( 10 $\pm$ 0.6 )			
S9 mix (+)	0	148	144	132	8	12	12	28	19	20	31	34	34	10	18	16
		( 141 $\pm$ 8.3 )			( 11 $\pm$ 2.3 )			( 22 $\pm$ 4.9 )			( 33 $\pm$ 1.7 )			( 15 $\pm$ 4.2 )		
	313	129	150	168	13	16	12	25	18	24	35	38	33	15	12	19
		( 149 $\pm$ 19.5 )			( 14 $\pm$ 2.1 )			( 22 $\pm$ 3.8 )			( 35 $\pm$ 2.5 )			( 15 $\pm$ 3.5 )		
	625	138	166	145	12	16	12	22	32	25	32	34	30	17	18	18
		( 150 $\pm$ 14.6 )			( 13 $\pm$ 2.3 )			( 26 $\pm$ 5.1 )			( 32 $\pm$ 2.0 )			( 18 $\pm$ 0.6 )		
	1250	148	168	154	15	9	11	28	16	27	43	32	42	15	19	9
		( 157 $\pm$ 10.3 )			( 12 $\pm$ 3.1 )			( 24 $\pm$ 6.7 )			( 39 $\pm$ 6.1 )			( 14 $\pm$ 5.0 )		
2500	155	152	167	10	13	11	23	31	29	26	25	34	12	20	13	
	( 158 $\pm$ 7.9 )			( 11 $\pm$ 1.5 )			( 28 $\pm$ 4.2 )			( 28 $\pm$ 4.9 )			( 15 $\pm$ 4.4 )			
5000	160	163	154	15	16	13	34	34	31	33	29	35	11	18	16	
	( 159 $\pm$ 4.6 )			( 15 $\pm$ 1.5 )			( 33 $\pm$ 1.7 )			( 32 $\pm$ 3.1 )			( 15 $\pm$ 3.6 )			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	637	601	526	792	701	662	260	236	212	622	586	637	507	568	625
	( 588 $\pm$ 56.6 )			( 718 $\pm$ 66.7 )			( 236 $\pm$ 24.0 )			( 615 $\pm$ 26.2 )			( 567 $\pm$ 59.0 )			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	939	994	968	324	358	433	825	803	912	478	427	428	386	322	395
	( 967 $\pm$ 27.5 )			( 372 $\pm$ 55.8 )			( 847 $\pm$ 57.6 )			( 444 $\pm$ 29.2 )			( 368 $\pm$ 39.8 )			

The purity of the test substance was 99 %.

This substance contained 51 ppm *p*-methoxyphenol as polymerization inhibitor, and 19 ppm acetone, 59 ppm acrylonitrile, 55 ppm propionitrile, 72 ppm methacrolein, 48 ppm isobutyronitrile, 35 ppm hydrogen cyanide, and trace amount of acetonitrile and *cis*-crotonitrile as impurities.

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*In Vitro* Chromosomal Aberration Test of Methacrylonitrile  
on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

メタクリロニトリルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)およびS9 mix非存在下の短時間処理(6時間)では、0.67 mg/mL(10 mM)の濃度においても50%を越える細胞増殖抑制は認められなかった。S9 mix存在下の短時間処理における50%細胞増殖抑制濃度は、0.27 mg/mLであった。従って、連続処理およびS9 mix非存在下での短時間処理では、0.67 mg/mL(10 mM)を最高濃度とし、公比2で3濃度設定した。S9 mix存在下での短時間処理では、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度設定した。連続処理では、24時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間連続処理およびS9 mix非存在下の短時間処理では0.67 mg/mL(10 mM)、S9 mix存在下での短時間処理では0.27 mg/mLであったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理およびS9 mix非存在下で短時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix存在下の短時間処理では、すべての処理群(0.068-0.27 mg/mL)で染色体異常の誘発作用が認められ、その誘発頻度は7.5-62.0%(gapを除く)であった。倍数性細胞の誘発作用は低濃度群(0.068 mg/mL)および中濃度(0.14 mg/mL)で観察され、出現頻度はそれぞれ3.13%および1.88%であった。傾向性検定では有意差( $p < 0.01$ )が認められなかったが、それは分裂遅延による可能性が考えられた。

以上の結果より、本試験条件下でメタクリロニトリルは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在21代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、仔牛血清(CS, Cansera International)を10 vol%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

メタクリロニトリルはプラスチック底面を溶解し、揮発性があることから、培養にはガラスフラスコ(25 cm<sup>2</sup>, ハリオ)を用いた。2 × 10<sup>4</sup>個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたフラスコに播き、37 °CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. S9

S9(キッコーマン(株))は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

メタクリロニトリル(ロット番号:P-30A, 旭化成工業(株)(岡山))は、無色透明液体で、水に対しては100 mmol/L以上50 mg/mL未満、DMSOでは50 mg/mL以上、アセトンでは50 mg/mL以上で溶解し、凝固点-35.8 °C、沸点90.3 °C、蒸気圧8.7 kPaで、純度99%(不純物としてパラメトキシフェノール51 ppm, アセトン19 ppm, アクリロニトリル59 ppm, プロピオニトリル55 ppm, メタクロレイン72 ppm, イソブチロニトリル48 ppm, 青酸35 ppm, アセトニトリルとシクロトニトリルは痕跡程度を含む)の物質で、冷蔵、遮光で保存した。被験物質原体は、冷蔵、遮光下で安定であった。

6. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に使用した。溶媒は局方注射用水(ロット番号:K8H73, (株)大塚製薬工場)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10 vol%になるように加えた。

## 7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、コールターカウンター(Coulter Electronics Ltd.)を用いて各群の細胞数を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理およびS9 mix非存在下での短時間処理では、最高処理濃度の0.67 mg/mL (10 mM)においても50%を越える細胞増殖抑制作用は認められなかった。S9 mix存在下の短時間処理における50%細胞増殖抑制濃度は0.27 mg/mLであった(Fig. 1)。

## 8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、連続処理およびS9 mix非存在下の短時間処理では、0.67 mg/mL (10 mM)を最高濃度とし、公比2で3濃度を設定した(0.17, 0.34, 0.67 mg/mL)。S9 mix存在下の短時間処理では、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(0.034, 0.068, 0.14, 0.27, 0.54 mg/mL)。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC (MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド (CPA, Sigma Chemical Co.)は、局方注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験において、溶媒対照群と処理群では1濃度あたり2フラスコを用い、染色体標本の作製およびコールターカウンターによる細胞増殖率測定を行った。無処理対照群および陽性対照群についてはコールターカウンターによる細胞増殖率測定は行わなかった。

## 9. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1  $\mu$ g/mLになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各フラスコにつき6枚作製した。作製した標本を3 vol%ギムザ溶液で染色した。

## 10. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20%以上の相対増殖率で、かつ2フラスコともに0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2)、連続処理およびS9 mix非存在下での短時間処理では0.67 mg/mL (10 mM)が、S9 mix存在下の短時間処理では0.27 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1つのフラスコから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会(MMS)<sup>11)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型

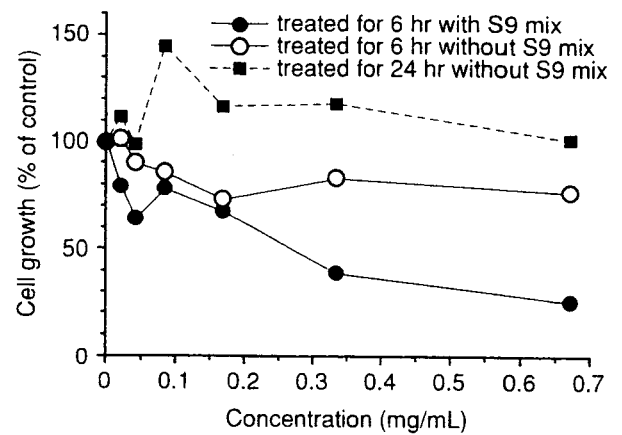


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with methacrylonitrile

あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyplloid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

## 11. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法<sup>12)</sup>により、有意差検定を実施した( $p < 0.01$ )。また、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定<sup>13)</sup>( $p < 0.01$ )を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

## 結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。メタクリロニトリルを加えて24時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。メタクリロニトリルを加え、S9 mix非存在下で処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下で短時間処理したすべての処理群(0.068~0.27 mg/mL)において、染色体の構造異常の誘発が見られ、その出現頻度は7.5~62.0%(gapを除く)であった。また、低濃度群(0.068 mg/mL)および中濃度群(0.14 mg/mL)で倍数性細胞の有意な( $p < 0.01$ )増加が認められ、その出現頻度は3.13%および1.88%であったが、傾向性検定の結果、濃度依存性は認められなかった( $p < 0.01$ )。これは、高濃度群(0.27 mg/mL)では細胞増殖率が57.5%と高い値であったにもかかわらず、分裂指数が低下していることや毒性のため800細胞観察できな

かった(観察細胞数:733細胞)ことから、分裂遅延により倍数性細胞の頻度が濃度依存的に減少した可能性が考えられた。

メタクリロニトリルのメチル基が水素に置換しているアクリロニトリルは、代謝活性化の有無に関係なく染色体の構造異常を誘発するが、倍数性細胞を誘発しないことが報告されている<sup>4)</sup>。また、メタクリロニトリルのニトリル基がメチルエステルに置換しているメチルメタクリラートは染色体の構造異常を誘発するが、その作用は弱い<sup>5)</sup>。これらのことから、化学構造が類似したこれらの3物質は、ともに染色体の構造異常を誘発するがその作用機序が異なる可能性が示唆された。

なお、メタクリロニトリルやメチルメタクリラートについては、復帰変異試験およびショウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験において陰性の結果が報告されている<sup>6-9)</sup>が、アクリロニトリルは、復帰変異試験で陽性の結果が得られている<sup>4)</sup>。

### 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 16-37.
- 2) 吉村功編, “毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ,” サイエンティスト社, 東京, 1987, pp. 76-78.
- 3) 吉村功, 大橋靖夫編, “毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析,” 地人書館, 東京, 1992, pp. 218-223.
- 4) 石館基監修, “改訂増補 染色体異常試験データ集,” 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 9.
- 5) C. L. Doerr *et al.*, *Mutat. Res.*, **222**, 191 (1989).
- 6) E. Zeiger *et al.*, *Environ. Mutagen.*, **9**, 1 (1987).
- 7) S. Zimmering *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.*, **14**, 245 (1989).
- 8) T. H. J. M. Waegemaekers and M. P. M. Bensink, *Mutat. Res.*, **137**, 95 (1984).
- 9) H. Schweikl *et al.*, *Mutat. Res.*, **415**, 119 (1998).

### 連絡先

試験責任者: 田中憲穂  
試験担当者: 山影康次, 日下部博一, 佐々木澄志,  
高橋俊孝, 若栗 忍, 橋本恵子  
(財)食品薬品安全センター秦野研究所  
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

### Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)  
Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,  
Kiyoshi Sasaki, Toshitaka Takahashi,  
Shinobu Wakuri, Keiko Hashimoto  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627



Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with methacrylonitrile (MPN)<sup>a</sup> without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others <sup>d</sup>	No. of cells with aberrations		POL <sup>e</sup> (%)	Trend test <sup>f</sup>		Concurrent cytotoxicity <sup>g</sup> (%)	Mitotic index <sup>h</sup> (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>i</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Solvent <sup>b</sup>	0	24	200	1	0	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00			100.0	-
MPN	0.17	24	200	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			119.6	-
MPN	0.34	24	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.00	-	-	120.7	-
MPN	0.67	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			109.0	10.2, 9.0
MC	0.05 $\mu$ g/mL	24	200	3	19	87	3	2	0	114	0	81*(40.5)	80*(40.0)	0.00			-	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, POL: polyploid, MC: mitomycin C.

a) Purity was 99%. This substance contained impurities as follows: *p*-methoxyphenol as polymerization inhibitor (51 ppm), acetone (19 ppm), acrylonitrile (59 ppm), propionitrile (55 ppm), methacrolein (72 ppm), isobutyronitrile (48 ppm), hydrogen cyanide (35 ppm), and trace amount of acetonitrile and *cis*-crotonitrile.

b) Distilled water was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran · Armitage's trend test was done at  $p < 0.01$ . g) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter<sup>®</sup>. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish.

\*: Significantly different from solvent control at  $p < 0.01$  by Fisher's exact probability test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with methacrylonitrile (MPN)<sup>a</sup> with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others <sup>d</sup>	No. of cells with aberrations		POL <sup>e</sup> (%)	Trend test <sup>f</sup>		Concurrent cytotoxicity <sup>g</sup> (%)	Mitotic index <sup>h</sup> (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>i</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Non-treatment				200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			-	-
Solvent <sup>b</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			100.0	-
MPN	0.17	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			102.9	-
MPN	0.34	-	6-(18)	200	0	0	1	4	0	0	5	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	-	-	104.9	-
MPN	0.67	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25			87.5	12.0, 11.2
MC	0.1 $\mu$ g/mL	-	6-(18)	200	10	59	184	1	3	0	257	4	122*(61.0)	119*(59.5)	0.00			-	-
Solvent <sup>b</sup>	0	+	6-(18)	200	2	3	0	1	0	0	6	0	5 (2.5)	4 (2.0)	0.50			100.0	-
MPN	0.068	+	6-(18)	200	4	10	7	1	0	0	22	0	19*(9.5)	15*(7.5)	3.13*			80.3	-
MPN	0.14	+	6-(18)	200	3	16	27	1	0	0	47	0	31*(15.5)	30*(15.0)	1.88*	+	-	80.7	-
MPN	0.27	+	6-(18)	200	20	146	126	4	0	320	616	0	129*(64.5)	124*(62.0)	0.14 <sup>j</sup>			57.5	0.8, 1.6
MPN	0.54 <sup>k</sup>	+	6-(18)	—														20.0	Tox, Tox
CPA	5 $\mu$ g/mL	+	6-(18)	200	9	47	169	4	0	0	229	1	127*(63.5)	124*(62.0)	0.13			-	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, POL: polyploid, MC: mitomycin C, CPA: cyclophosphamide, Tox: cytotoxic.

a) Purity was 99%. This substance contained impurities as follows: *p*-methoxyphenol as polymerization inhibitor (51 ppm), acetone (19 ppm), acrylonitrile (59 ppm), propionitrile (55 ppm), methacrolein (72 ppm), isobutyronitrile (48 ppm), hydrogen cyanide (35 ppm), and trace amount of acetonitrile and *cis*-crotonitrile. b) Distilled water was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10.

d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran · Armitage's trend test was done at  $p < 0.01$ . g) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter<sup>®</sup>. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish.

i) Chromosome analysis was not performed because there was no metaphase due to cytotoxicity. j) Seven hundred and thirty-three cells were analysed.

\*: Significantly different from solvent control at  $p < 0.01$  by Fisher's exact probability test.

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test  
of Methacrylonitrile by Oral Administration in Rats

要約

プラスチック、エラストマー、単重合体、共重合体、被覆剤等の合成に使用され、酸、アミド、アミン、エステル、ニトリル等の合成時には化学反応中間体として、また特殊な用途としては炭酸飲料容器の製造時にアクリロニトリルの置換剤としても使用されているメタクリロニトリルをオリブ油に溶解し、1群あたり雌雄各12匹のCrj:CD(SD)IGSラットに0, 7.5, 15および30 mg/kgの投与量で雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後を含む計46日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育4日までの期間、反復経口投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および新生児の発生に及ぼす影響について検討し、以下の成績を得た。

1. 反復投与毒性

血液学検査では、30 mg/kg群の雄に赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量の低値が認められた。血液生化学検査では、15および30 mg/kg群の雄にカリウムの低値、30 mg/kg群の雄にクレアチニンの高値、雌に総ビリルビンおよびグルコースの高値が認められた。剖検では、7.5および15 mg/kg群の雌各1例、30 mg/kg群の雄1例および雌2例に腺胃粘膜の暗赤色斑がみられ、病理組織学検査でびらんが確認された。器官重量では、肝臓について30 mg/kg群の雄および各投与群の雌に相対重量、雌に絶対重量の高値が認められた。雌では、脾臓の絶対重量および相対重量の高値が30 mg/kg群で、心臓の絶対重量の高値が各投与群で、また、心臓の相対重量の高値が15および30 mg/kg群で認められた。病理組織学検査では、雌の脾臓に髄外造血が15 mg/kg群で3例、30 mg/kg群で7例に認められた。

以上のことから、雄の15 mg/kg以上の群においてカリウムの低値、雌の7.5 mg/kg以上の群において心臓の絶対重量の高値および腺胃粘膜のびらんがそれぞれ認められた。したがって、本試験条件下におけるメタクリロニトリルの無影響量(NOEL)は雄で7.5 mg/kg/dayであり、雌では7.5 mg/kg/day未満と考えられた。

2. 生殖発生毒性

生殖能検査では、各投与群の雌雄ともに異常は認められず、新生児にも変化は認められなかった。

したがって、本試験条件下におけるメタクリロニトリルの反復投与による親動物の生殖ならびに新生児の発

生に対する無影響量(NOEL)はいずれも30 mg/kg/day以上と考えられた。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

メタクリロニトリル(純度:99%, Lot No. P-30A, 旭化成工業(株), 東京)は、常温において刺激臭のある無色透明の液体である。入手後の被験物質は遮光気密容器に入れ、4~10℃の冷暗所で保存し、残余被験物質を製造業者が分析し、投与期間中の被験物質の安定性を確認した。溶媒は日本薬局方オリブ油(ヤクハン製薬(株))を用い、これに被験物質を所定の濃度となるように溶解させた。調製液は、冷暗所保存条件下で8日間安定であることから、調製後直ちに遮光気密容器に入れて冷所保存し、室温に戻して使用した。また、これらの調製液について濃度を確認し、設定値の±5%以内であることを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた8週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS)の雌雄を14日間の検疫および馴化を行い、雌については10日間の性周期検査も併せて行った後、雌雄各48匹を選択して10週齢で試験に供した。投与開始日の体重は雄が354~434 g、雌が210~259 gであった。動物は、温度21~24℃、湿度37~62%、換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(8時から20時まで点灯)に制御されたバリアシステムの飼育室で、ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は1ケージあたり雌雄別に3匹以内を収容し、群分け後は1匹、交配中は雌雄各1匹、妊娠期間中は1母動物を収容した。雌は、妊娠17日から金網床のかわりに実験動物用床敷(ホワイトフレック, 日本チャールス・リバー(株))を敷いたステンレス製受皿を使用して1腹を収容した。飼料は、γ線照射固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて、飲料水は札幌市水道水を自動給水装置を用いてそれぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では雌雄のラットに5, 15および30 mg/kgの3用量を1群5匹に1日1回14日間投与し、30 mg/kg群の雄で体重増加量の低値、雌で投与14日に摂餌量の低値が認められ、その他の検査項目には異常は認

められなかった。このことから、本試験の投与量は高用量を死亡あるいは衰弱例がみられず、体重推移に影響が予測される用量として30 mg/kg/dayを設定し、以下、公比2で15および7.5 mg/kg/dayを雌雄ともに設定し、これに日本薬局方オリブ油を投与する対照群を含めた雌雄各4群を設定した。1群の動物数は雌雄とも12匹とし、投与前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行った。

各個体の投与量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて算出し、5 mL/kgの容量でラット用胃ゾンデを用いて1日1回強制的に胃内に投与した。投与期間は、雄については交配前14日間および交配期間を含む46日間、雌については交配前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4日までの期間、交尾不成立例は交配期間終了後23日までの期間とした。

#### 4. 検査項目

##### 1) 一般状態観察

雌雄全例について、試験期間中1日1回の頻度で、視診および触診により行動、外観などを観察した。

##### 2) 体重測定

全例について、投与1, 2, 5, 7, 10および14日の投与前、その後は雄については7日毎(投与終了日を含む)および剖検日に、雌については妊娠0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 17および20日、哺育0, 1および4日の投与前ならびに哺育4日の翌日(剖検日)に、交尾不成立例については投与28, 35, 42および49日の投与前および51日の翌日(剖検日)に、また交配期間中(雄と同居中)は相手雄の測定日と同じ日に測定した。体重増加量および体重増加率を、雄については投与1から46日、雌については投与1から14日、妊娠0から20日および哺育0から4日について算出した。

##### 3) 摂餌量測定

雄については交配期間を除き、雌については妊娠0日および哺育0日を除き体重測定と同じ日に、測定前日の給与量から翌日の残量を減じて個々の動物の1日分の摂餌量を算出した。

##### 4) 尿検査

雄の各群6例について投与期間の最終週(投与43~44日)に、代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行い、同時に採尿中の飲水量(重量)も測定した。約3時間の蓄尿についてpH、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血反応(以上、マルティスティックス、バイエル・三共)および色調(肉眼観察)ならびに沈渣(鏡検)を検査し、21時間蓄尿について尿量(容量)および比重(屈折計法、アタゴ)を測定した。

##### 5) 血液学検査

雄の全例について投与46日の翌日の剖検時に、雌の

哺育母動物各群6例について分娩後5日(哺育4日の翌日)に、16~22時間絶食させた後、エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、EDTA・2Kで処理した血液を用いて赤血球数、ヘマトクリット値、血小板数、白血球数(以上、電気抵抗法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)、平均赤血球容積(赤血球数、ヘマトクリット値より算出)、平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数、ヘモグロビン量より算出)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(ヘマトクリット値、ヘモグロビン量より算出)(以上、自動血球計数装置F-820、シスメックス)、網赤血球数(Brecher法)および白血球百分比(May-Grünwald-Giemsa染色)を測定した。また、3.8%クエン酸ナトリウムで処理した後、3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いて、プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上、血液凝固自動測定装置アメルングKC-10A、バクスター)を測定した。

##### 6) 血液生化学検査

雄の全例について投与46日の翌日の剖検時に、雌の哺育母動物各群6例について分娩後5日(哺育4日の翌日)に、16~22時間絶食させた後、血液学検査と同時に、腹部大動脈より採血し、ヘパリン処理した後、3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いてGOT(IFCC法)およびグルコース(ヘキソキナーゼ法)を測定し、無処理血液を3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血清を用いてGPT(IFCC法)、アルカリホスファターゼ(Bessey-Lowry法)、 $\gamma$ -GTP(包接L- $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法)、コリンエステラーゼ(ヨウ化ブチリルチオコリン基質法)、総コレステロール、リン脂質(以上、酵素法)、トリグリセリド(遊離グリセロール消去法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法)、クレアチニン(Jaffé法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(Fiske-SubbaRow法)、総蛋白(ビウレット法)(以上、自動分析装置7150形、日立製作所)、ナトリウム、カリウム(以上、炎光度法、自動炎光度計480型、コーニング)、クロール(電量滴定法、クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)、蛋白分画およびA/G比(以上、セルロースアセテート膜電気泳動法、全自動電気泳動装置CTE-150、常光)を測定した。

##### 7) 剖検および器官重量測定

雄の全例について投与46日の翌日に、体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。雌の分娩例は分娩後5日(哺育4日の翌日)に、交尾不成立例は交配期間終了後24日(投与51日の翌日)に、妊娠25日まで分娩が認められない交尾成立例は妊娠26日に剖検した。また、脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺、精巣、精巣上体および卵巣の重量を測定するとともに、絶対重量を剖検当日の体重で除し100を乗じて相対重量を算出した。

## 8) 病理組織学検査

雌雄の全例について脳(大脳・小脳), 下垂体, 胸腺, 甲状腺(左右), 上皮小体(左右), 副腎(左右), 脾臓, 心臓, 胸部大動脈, 舌, 食道, 胃(前胃および腺胃), 肝臓, 膵臓, 十二指腸, 空腸, 回腸(パイエル板を含む), 盲腸, 結腸, 直腸, 喉頭, 気管, 肺(気管支含む), 腎臓(左右), 膀胱, 精巣(左右), 精巣上体(左右), 前立腺, 精囊(凝固腺含む, 左右), 卵巣(左右), 子宮(角部および頸部), 膣, 眼球(左右), ハーダー腺(左右), 乳腺(右腹部, 雌のみ), 皮膚(右腹部), 胸骨(骨髄含む), 大腿骨(骨髄含む, 右), 脊髄(頸部), 骨格筋(右大腿部), 腸間膜リンパ節, 下顎リンパ節(左右), 顎下腺(左右), 舌下腺(左右), 耳下腺(左右), 坐骨神経(右)を常法に従ってパラフィン包埋後, 薄切してヘマトキシリン・エオジン染色標本, 脾臓のベルリン青染色標本を作製して鏡検した。

## 9) 生殖能検査

雌全例について, 投与開始日の10日前から交尾までの連日, 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(発情前期, 発情期前期, 発情期後期, 発情後期および発情休止期)の判定を行い, 性周期の各段階を4日から6日の間隔で2回以上繰り返すものを正常と判定した。発情休止期あるいは発情期が7日以上継続してみられる場合に性周期の異常と判定した。投与14日の雌雄について, 同試験群内で夕方から1対1(無作為組み合わせ)で14日間を限度として同居させた。交尾の成立は雌の膣内の膣栓あるいは膣垢スミア標本中に精子が確認された場合とし, 交尾日を妊娠0日とした。妊娠の成立は雌の子宮に着床痕が確認された場合とし, 交尾率 $[(交尾雌動物数/同居雌動物数) \times 100]$  および受胎率 $[(受胎動物数/交尾雌動物数) \times 100]$ を算出した。

## 10) 分娩および哺育状態観察

交尾した雌全例について, 妊娠21日から分娩終了日まで, 分娩段階, 哺育状態, 生存児数および死亡児数, 出産児の性別および外表を観察した。朝9時に分娩終了を確認した場合, その日を哺育0日とした。その結果から, 妊娠期間(妊娠0日から哺育0日(分娩終了日)までの日数), 出産率 $[(生児出産雌数/妊娠雌数) \times 100]$ , 分娩率 $[(総出産児数/着床痕数) \times 100]$ , 出生率 $[(出産確認時生存児数/総出産児数) \times 100]$ , 哺育4日時哺育率 $[(哺育4日時に哺育児の認められる雌動物数/正常に分娩した雌動物数) \times 100]$ および性比 $[(雄生児数/雌生児数)]$ を算出した。

## 11) 新生児の一般状態観察および生存率

全例について, 哺育0日から哺育4日まで1日1回, 生存および死亡を確認し, 一般状態および外表について観察した。なお, 哺育日数は分娩終了日を哺育0日とした。

観察結果から新生児の4日の生存率 $[(哺育4日生存児数/出産確認時生存児数) \times 100]$ を1腹を単位として算出し, 喰殺あるいは不明例となった新生児は死亡例として扱った。

## 12) 新生児の体重測定

全例について, 哺育0, 1および4日に個体毎に測定し, 体重値は1腹あたりの生児全例の体重の合計ならびに1腹毎の雌雄別平均体重として取扱った。

## 13) 新生児の剖検

死亡例は直ちに剖検した。その他の例については, 哺育4日に体外表(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。

## 5. 統計解析

性周期の異常の有無, 交尾率, 受胎率, 出産率および哺育4日時哺育率ならびに病理組織学検査結果のうち1段階の陽性グレードがみられた所見については多試料 $\chi^2$ -検定を行い, その結果, 有意差がみられた場合は2試料 $\chi^2$ -検定で解析した。ただし, これらの検定に不適合の場合はFisherの直接確率検定法を用いた。

尿検査の定性的項目ならびに病理組織学検査結果のうち2段階以上の陽性グレードがみられた所見については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-検定法を用いて解析した。

その他の項目について, Bartlettの検定法によって等分散性を解析し, 等分散の場合は, 一元配置分散分析法で解析し, 有意差がみられた場合は, Dunnettの検定法により解析した。不等分散の場合は, Kruskal-Wallis法で解析し, 有意差がみられた場合は, Mann-WhitneyのU-検定法を用いて解析した。なお, 新生児の観察および測定において, 出生率, 性比, 新生児生存率および雌雄別体重ならびに雌雄合計体重について, 1腹を標本単位として統計処理を行った。

これら対照群と被験物質投与群との間の検定においては, いずれも有意水準を5%とした。

## 結果

## 1. 反復投与毒性

## (1) 一般状態

雄では, いずれの群にも異常は認められなかった。

雌では, 15 mg/kg群の1例で妊娠21日以降に, 30 mg/kg群の1例で妊娠17日以降に, 剖検日(分娩後5日)まで皮下腫瘍が認められた以外に異常は認められなかった。この皮下腫瘍は病理組織学検査で乳腺の腺癌と判定されたが, 妊娠を契機に自然発生的にしばしば発現することが知られていること<sup>13)</sup>から, 自然発生腫瘍と判断した。

## (2) 体重(Fig. 1)

雌雄とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

## (3) 摂餌量(Fig. 2)

雄では15 mg/kg群で投与14日に低値が認められた。

雌では, 15および30 mg/kg群で妊娠前投与期間の投与2日に, 15 mg/kg群で妊娠5日に, 対照群と比較して

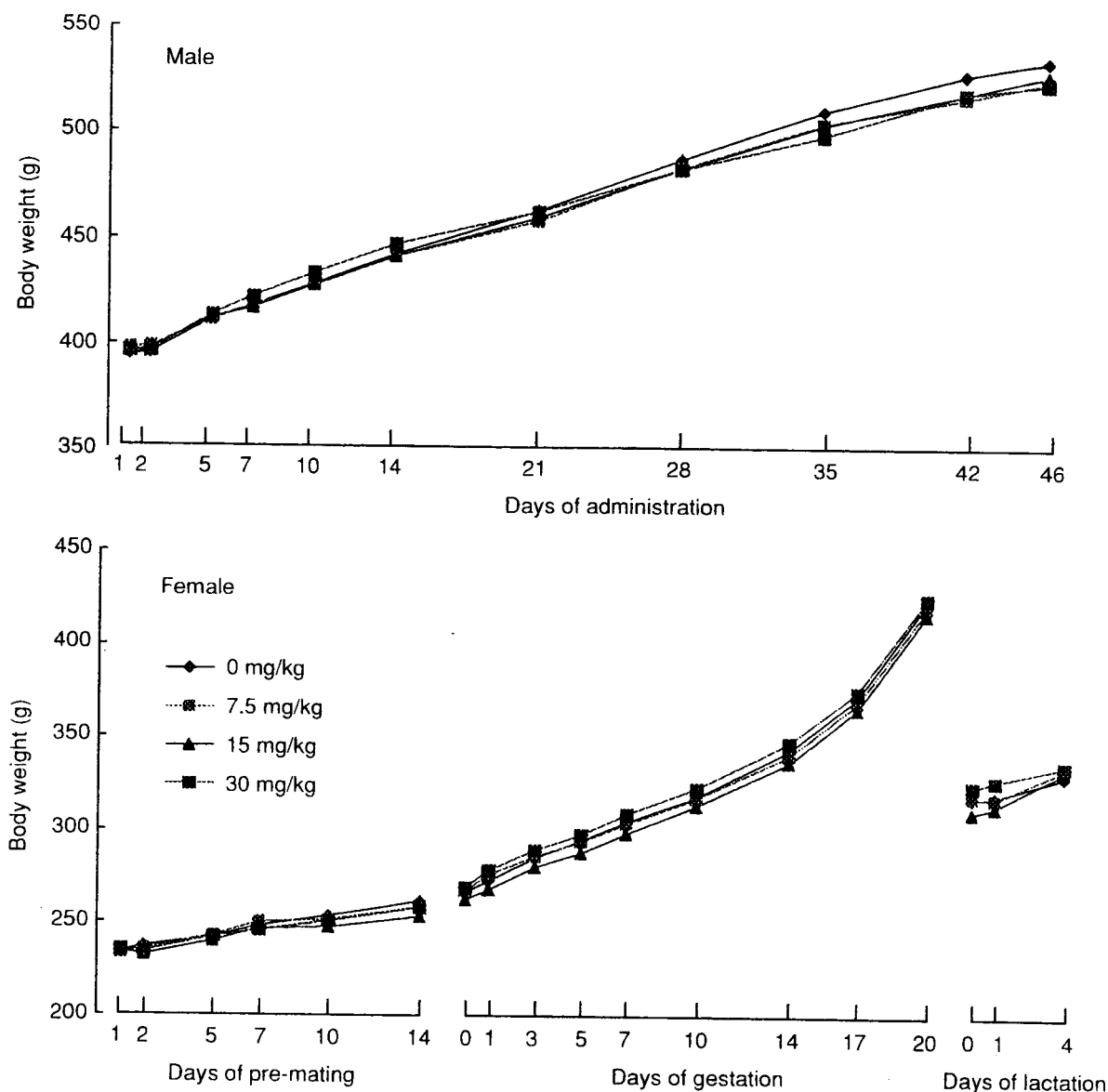


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

低値が認められたが、哺育期間には、各投与群とも有意な差は認められなかった。投与2日には対照群でも前日と比較して摂餌量の低下がみられていること、いずれも一過性的な変化であることから、被験物質による毒性的な変化ではないと考えられた。

#### (4) 尿検査

雄の各投与群とも対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

#### (5) 血液学検査 (Table 1, 2)

雄では30 mg/kg群で赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量に対照群と比較して低値、ならびにプロトロンビン時間に短縮が認められた。プロトロンビン時間の短縮については、軽度な短縮であり、血小板数に変化がみられていないことから、毒性学的意義はないものと考えられた。他に7.5 mg/kg群では分葉核好中球の高値、リンパ球の低値、15 mg/kg群で平均赤血球ヘモグロビン量の低値が認められたが、用量依存的でない

変化であり、被験物質との関連性はないものと考えられた。

雌では30 mg/kg群で平均赤血球ヘモグロビン濃度の低値、7.5および15 mg/kg群で桿状核好中球の低値が認められたが、関連する他の項目に変化がみられないことから、被験物質との関連性はないものと考えられた。

#### (6) 血液生化学検査 (Table 3, 4)

雄では15および30 mg/kg群でアルカリホスファターゼおよびカリウムの低値、30 mg/kg群でクレアチニンの高値が認められた。アルカリホスファターゼの低値については、毒性学的意義がないと考えられた。

雌では30 mg/kg群で総ビリルビンおよびグルコースの高値が認められた。他に7.5 mg/kg群で尿素窒素の高値が認められたが、低用量群のみの変化であり、被験物質との関連性はないものと考えられた。

#### (7) 剖検

雄では、30 mg/kg群の1例に腺胃粘膜の暗赤色斑が認

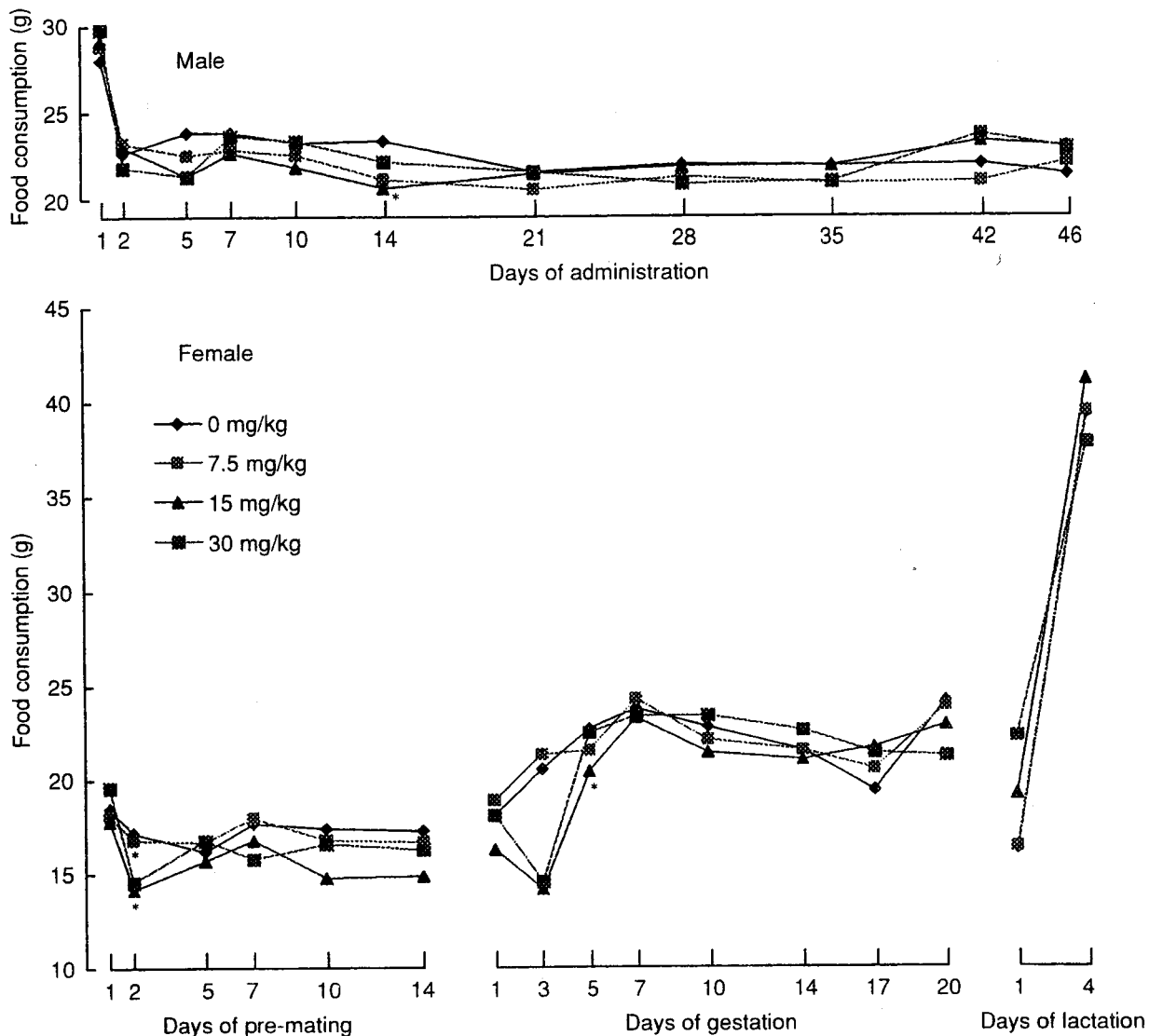


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test  
Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ )

められた。

雌では、7.5および15 mg/kg群の各1例、ならびに30 mg/kg群の2例に腺胃粘膜の暗赤色斑が認められた。

(8) 器官重量 (Table 5, 6)

雄では、30 mg/kg群で対照群と比較して肝臓の相対重量に高値が認められた。

雌では、7.5 mg/kg以上の投与群で心臓の絶対重量、肝臓の相対重量に高値がみられ、15 mg/kg以上の投与群で心臓の相対重量、30 mg/kg群で肝臓の絶対重量に高値が認められた。30 mg/kg群では、脾臓の絶対重量および相対重量にも高値が認められた。

(9) 病理組織学検査 (Table 7)

雌雄とも剖検時に腺胃の暗赤色斑がみられた例には、軽度のびらんが認められた。

雌で、重量増加のみられた脾臓では、軽度の髄外造血が対照群の1例、15 mg/kg群の3例、30 mg/kg群の7例にみられ、有意な発現率増加が認められた。

2. 生殖発生毒性

(1) 生殖能検査 (Table 8)

交尾までの日数、交尾率および受胎率に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。交尾不成立が30 mg/kg群で1組にみられたが、雌の性周期検査、雌雄の剖検および病理組織学検査で生殖器に異常は認められなかった。不妊例は対照群および7.5 mg/kg群で各1例、15 mg/kg群で2例に認められた。

性周期検査では交配中に発情休止期の連続が30 mg/kg群で1例にみられたが、この例は交尾および妊娠が成立した。

(2) 分娩および哺育状態観察 (Table 9)

妊娠期間、哺育率、出産率、着床数、出産児数、分娩率、出産確認時生存児数および出生率に、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。

なお、分娩終了確認時の死亡児が7.5 mg/kg群で雌1例、30 mg/kg群で雄3例および雌7例に認められた。30

mg/kg群の死亡児のうち雄3例および雌6例は1腹の児であったが、この母動物は雌雄各1例の新生児を哺育し、哺育行動に異常はみられなかった。

#### (3) 新生児の生存率(Table 9)

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。

#### (4) 新生児の一般状態

死亡あるいは不明例が対照群で雌1例、7.5 mg/kg群で雌2例、15 mg/kg群で雄3例にみられたが、30 mg/kg群では死亡あるいは不明例はみられず、被験物質による影響はないものと考えられた。

生存例では30 mg/kg群の雌1例に外傷が認められたのみであった。

#### (5) 新生児の体重推移(Table 9)

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。

#### (6) 新生児の剖検

死亡例には異常は認められなかった。

哺育4日剖検例には、7.5 mg/kg群の雄1例に肝臓の黄白色斑が、30 mg/kg群の雌1例に外傷がみられたが、他に異常はみられなかった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

血液学検査では、30 mg/kg群の雄に赤血球数、ハマトクリット値およびヘモグロビン量の低値が認められた。この変化は、メタクリロニトリル投与により赤血球およびヘモグロビンの減少などの溶血性貧血が報告されていること<sup>4)</sup>から、被験物質による影響と考えられた。

血液生化学検査では、雄について15および30 mg/kg群にカリウムの低値、30 mg/kg群にクレアチニンの高値が認められた。被験物質の影響と推察されたが、病理組織学検査で腎臓に異常が認められないことから、その機序については明らかでなかった。雌について30 mg/kg群に総ビリルビンおよびグルコースの高値が認められた。肝臓については、30 mg/kg群の雄に相対重量、雌に絶対重量、また各投与群の雌に相対重量の高値が認められていることから、病理組織学的に肝臓の異常は認められなかったが、この変化は肝臓の機能亢進によるものと推察された。

剖検では、7.5および15 mg/kg群の雌各1例、30 mg/kg群の雄1例および雌2例に腺胃粘膜の暗赤色斑がみられ、病理組織学的にはびらんが確認された。この変化は、メタクリロニトリルに皮膚腐食性があることが報告されていること<sup>5)</sup>、また、メタクリロニトリルの急性経口投与毒性試験<sup>6)</sup>でも腺胃粘膜の暗赤色斑がみられたことから、被験物質による影響と考えられた。

器官重量では雌の30 mg/kg群に前述の肝臓の他、脾臓の絶対重量および相対重量の高値がみられ、病理組織学検査では15 mg/kg群で雌3例、30 mg/kg群で雌7例に髄外造血が認められた。この変化は、メタクリロニ

トリルによる溶血性貧血が報告されていること<sup>4)</sup>から、メタクリロニトリル投与による貧血に対する代償性の変化と考えられた。雌では、各投与群に心臓の絶対重量の高値がみられ、15および30 mg/kg群には相対重量の高値も認められた。心臓に病理組織学検査で異常はみられなかったが、げっ歯類では心肥大が心臓重量増加として認められ、組織学的変化は顕著でないと報告されており<sup>7)</sup>、心肥大の原因の一つに貧血が挙げられている<sup>7)</sup>。一方、メタクリロニトリルの急性経口投与毒性試験<sup>6)</sup>の死亡例では右心房の拡張および肺の明橙色化がみられ、メタクリロニトリルによる溶血との関連が考えられる。したがって、本試験でみられた心臓の絶対重量および相対重量の変化も被験物質による溶血性貧血の影響と推察された。

以上のことから、雄の15 mg/kg以上の投与群においてカリウムの低値、雌の7.5 mg/kg以上の投与群において心臓の相対重量の高値および腺胃粘膜のびらんがそれぞれ認められた。したがって、本試験条件下におけるメタクリロニトリルの無影響量(NOEL)は雄で7.5 mg/kg/dayであり、雌では7.5 mg/kg/day未満と考えられた。

### 2. 生殖発生毒性

生殖能検査では、各投与群とも雌雄の交尾率、雌の性周期および受胎率、また、生殖器(精巣、精巣上体および卵巣)および内分泌器官(副腎)の重量ならびに剖検に変化はみられず、30 mg/kg群の生殖器の病理組織学検査においても異常は認められなかった。

母動物の剖検、妊娠期間、着床数、出産率、分娩率、出産児数、出産確認時生存児数および出生率に、メタクリロニトリル投与による影響は認められなかった。なお、30 mg/kg群の母動物1例で分娩終了確認時に雄3例および雌6例の死亡児みられたが、この母動物の一般状態および剖検で異常はみられず、同例は雌雄各1例の新生児を哺育し、新生児の発育にも異常はみられなかったことから、死亡児と被験物質との関連性については明らかではなかった。

新生児の一般状態、新生児生存率、体重および剖検では、各投与群とも影響は認められなかった。

以上のことから、雌雄の生殖および新生児の発生に各投与群とも被験物質の影響は認められなかった。したがって、本試験条件下におけるメタクリロニトリルの反復投与による親動物の生殖ならびに新生児の発生に対する無影響量(NOEL)はいずれも30 mg/kg/day以上と考えられた。

## 文献

- 1) 村岡義博他, *Exp. Anim.*, **26**, 13(1977).
- 2) 森井外吉他, *Exp. Anim.*, **33**, 47(1984).
- 3) 今井清, 吉村慎介, *J. Toxicol. Pathol.*, **1**, 7(1988).
- 4) T. Samikkannu, V. Vasanthakumari, and S. N. Devaraj, *Toxicol. Letters*, **92**, 15(1997).
- 5) 製品安全データシート(未公刊).

- 6) 須永昌男他, 化学物質毒性試験報告, 8, 635(2001).  
7) 伊東信行編著, “最新 毒性病理学,” 中山書店, 東京, 1994, pp. 179-187.

連絡先

試験責任者: 須永昌男  
試験担当者: 堀川裕尚, 咲間正志, 山本美代子,  
平田真理子, 古川正敏, 吉村浩幸  
(株)化合物安全性研究所  
〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24  
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors: Masao Sunaga (Study director)  
Hironao Horikawa, Masashi Sakuma,  
Miyoko Yamamoto, Mariko Hirata,  
Masatoshi Furukawa,  
Hiroyuki Yoshimura  
Safety Research Institute for Chemical  
Compounds Co., Ltd.  
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,  
004-0839, Japan  
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313



Table 1 Hematological findings of male rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	12	12	12	12
RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )	904.7 $\pm$ 39.7	915.3 $\pm$ 29.8	910.5 $\pm$ 26.9	856.7 $\pm$ 38.6**
Hematocrit (%)	48.68 $\pm$ 2.65	48.39 $\pm$ 2.42	48.01 $\pm$ 2.01	46.23 $\pm$ 1.61*
Hemoglobin (g/dL)	16.38 $\pm$ 0.63	16.22 $\pm$ 0.72	15.88 $\pm$ 0.52	15.52 $\pm$ 0.62**
MCV (fL)	53.81 $\pm$ 1.65	52.87 $\pm$ 1.81	52.73 $\pm$ 1.40	53.99 $\pm$ 1.48
MCH (pg)	18.11 $\pm$ 0.55	17.71 $\pm$ 0.48	17.43 $\pm$ 0.39**	18.12 $\pm$ 0.56
MCHC (g/dL)	33.68 $\pm$ 1.03	33.54 $\pm$ 0.86	33.07 $\pm$ 0.77	33.57 $\pm$ 0.52
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	107.1 $\pm$ 27.9	113.8 $\pm$ 24.1	117.3 $\pm$ 28.0	114.0 $\pm$ 23.4
Platelet ( $10^3/\mu\text{L}$ )	113.95 $\pm$ 11.09	116.83 $\pm$ 8.70	109.61 $\pm$ 13.75	107.32 $\pm$ 14.73
Reticulocyte (%)	21.3 $\pm$ 3.8	19.8 $\pm$ 3.5	18.8 $\pm$ 4.0	23.3 $\pm$ 4.6
PT (sec)	15.75 $\pm$ 1.62	15.28 $\pm$ 1.47	15.33 $\pm$ 1.70	14.13 $\pm$ 0.61**
APTT (sec)	26.21 $\pm$ 2.24	25.65 $\pm$ 2.60	26.01 $\pm$ 2.45	24.66 $\pm$ 2.55
Differential leukocyte counts (%)				
Neutrophils				
Stab form	1.5 $\pm$ 1.6	1.9 $\pm$ 1.3	1.6 $\pm$ 1.8	2.3 $\pm$ 1.2
Segmented	7.8 $\pm$ 2.9	11.9 $\pm$ 5.2*	9.1 $\pm$ 3.9	10.3 $\pm$ 3.2
Eosinophils	1.6 $\pm$ 1.2	1.1 $\pm$ 1.2	1.1 $\pm$ 1.7	0.8 $\pm$ 0.7
Basophils	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocytes	0.4 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 1.0	0.8 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.9
Lymphocytes	88.8 $\pm$ 3.9	84.1 $\pm$ 4.4*	87.4 $\pm$ 6.1	85.7 $\pm$ 3.0

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01)

Table 2 Hematological findings of female rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	6	6	6	6
RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )	682.8 $\pm$ 51.9	688.0 $\pm$ 28.7	651.8 $\pm$ 31.0	678.2 $\pm$ 32.1
Hematocrit (%)	41.05 $\pm$ 1.52	41.28 $\pm$ 2.34	40.62 $\pm$ 2.73	42.53 $\pm$ 1.53
Hemoglobin (g/dL)	13.57 $\pm$ 0.67	13.55 $\pm$ 0.43	13.27 $\pm$ 0.80	13.50 $\pm$ 0.56
MCV (fL)	60.28 $\pm$ 3.02	60.02 $\pm$ 2.73	62.27 $\pm$ 2.10	62.77 $\pm$ 1.65
MCH (pg)	19.92 $\pm$ 0.82	19.72 $\pm$ 0.80	20.37 $\pm$ 0.73	19.90 $\pm$ 0.46
MCHC (g/dL)	33.05 $\pm$ 0.73	32.87 $\pm$ 1.23	32.70 $\pm$ 0.64	31.77 $\pm$ 0.57*
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	122.7 $\pm$ 25.3	139.7 $\pm$ 26.8	128.2 $\pm$ 15.9	123.2 $\pm$ 31.4
Platelet ( $10^3/\mu\text{L}$ )	114.18 $\pm$ 9.81	113.38 $\pm$ 16.29	122.58 $\pm$ 16.71	123.28 $\pm$ 9.72
Reticulocyte (%)	57.5 $\pm$ 21.5	44.3 $\pm$ 17.5	71.3 $\pm$ 17.6	68.7 $\pm$ 20.6
PT (sec)	13.85 $\pm$ 0.27	13.90 $\pm$ 0.27	14.13 $\pm$ 0.43	14.07 $\pm$ 0.18
APTT (sec)	19.38 $\pm$ 1.10	18.38 $\pm$ 1.25	19.42 $\pm$ 1.15	19.13 $\pm$ 0.94
Differential leukocyte counts (%)				
Neutrophils				
Stab form	4.0 $\pm$ 2.4	1.3 $\pm$ 1.2*	0.7 $\pm$ 0.8**	2.3 $\pm$ 1.5
Segmented	26.5 $\pm$ 9.9	22.8 $\pm$ 7.3	25.0 $\pm$ 8.7	23.7 $\pm$ 7.9
Eosinophils	0.7 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 1.3	0.0 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 1.2
Basophils	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocytes	1.2 $\pm$ 1.5	0.7 $\pm$ 0.8	0.2 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.6
Lymphocytes	67.7 $\pm$ 11.4	74.2 $\pm$ 8.0	74.2 $\pm$ 8.3	72.5 $\pm$ 7.5

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01)

Table 3 Blood chemical findings of male rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	12	12	12	12
Total protein (g/dL)	5.88 ± 0.24	6.00 ± 0.24	6.03 ± 0.18	5.93 ± 0.34
A/G	1.092 ± 0.089	1.063 ± 0.067	1.107 ± 0.100	1.076 ± 0.097
Protein fraction (%)				
Albumin	52.23 ± 2.03	51.63 ± 1.56	52.53 ± 2.23	51.87 ± 2.20
$\alpha_1$ -globulin	21.89 ± 2.41	22.96 ± 1.36	22.23 ± 2.45	22.14 ± 2.28
$\alpha_2$ -globulin	9.17 ± 0.62	8.99 ± 0.64	8.74 ± 0.52	9.35 ± 0.89
$\beta$ -globulin	13.93 ± 0.82	13.85 ± 0.99	14.03 ± 0.68	13.98 ± 1.24
$\gamma$ -globulin	2.78 ± 0.87	2.58 ± 0.87	2.47 ± 0.54	2.66 ± 0.56
GOT (IU/L)	59.3 ± 6.0	72.5 ± 19.6	62.0 ± 14.7	73.8 ± 35.5
GPT (IU/L)	24.3 ± 5.8	34.0 ± 17.3	25.6 ± 5.5	30.3 ± 15.7
ALP (IU/L)	273.9 ± 59.8	235.2 ± 41.0	217.6 ± 63.4*	198.8 ± 41.8**
ChE (IU/L)	61.8 ± 28.6	69.7 ± 28.3	60.3 ± 15.7	55.2 ± 14.0
$\gamma$ -GTP (IU/L)	0.37 ± 0.13	0.48 ± 0.24	0.40 ± 0.14	0.43 ± 0.17
Total bilirubin (mg/dL)	0.059 ± 0.010	0.068 ± 0.022	0.062 ± 0.006	0.070 ± 0.015
Glucose (mg/dL)	172.6 ± 19.2	176.6 ± 48.2	182.3 ± 18.6	184.3 ± 32.5
Total cholesterol (mg/dL)	60.4 ± 13.8	62.5 ± 12.9	60.8 ± 8.5	59.6 ± 9.3
Triglyceride (mg/dL)	51.1 ± 20.1	43.8 ± 24.8	66.6 ± 37.1	61.8 ± 38.1
Phospholipids (mg/dL)	101.9 ± 19.3	104.9 ± 17.1	109.4 ± 14.2	106.3 ± 19.8
Urea nitrogen (mg/dL)	15.38 ± 1.40	14.90 ± 1.30	15.27 ± 1.56	14.67 ± 2.42
Creatinine (mg/dL)	0.458 ± 0.033	0.475 ± 0.068	0.492 ± 0.042	0.513 ± 0.084**
Sodium (mEq/L)	141.42 ± 0.87	141.67 ± 1.30	141.29 ± 1.37	141.04 ± 1.03
Potassium (mEq/L)	4.861 ± 0.253	4.709 ± 0.212	4.522 ± 0.178**	4.613 ± 0.208*
Chlorine (mEq/L)	105.6 ± 1.6	105.9 ± 1.2	105.8 ± 1.3	105.4 ± 1.2
Calcium (mg/dL)	9.65 ± 0.33	9.54 ± 0.33	9.58 ± 0.15	9.56 ± 0.26
Inorganic phosphorous (mg/dL)	7.13 ± 0.43	6.93 ± 0.46	6.73 ± 0.44	7.07 ± 0.55

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table 4 Blood chemical findings of female rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	6	6	6	6
Total protein (g/dL)	5.60 ± 0.44	5.53 ± 0.21	5.55 ± 0.15	5.48 ± 0.26
A/G	1.180 ± 0.114	1.152 ± 0.059	1.120 ± 0.038	1.175 ± 0.046
Protein fraction (%)				
Albumin	54.17 ± 2.46	53.57 ± 1.29	52.92 ± 0.84	54.07 ± 0.97
$\alpha_1$ -globulin	21.13 ± 1.85	20.08 ± 1.54	21.65 ± 1.78	21.37 ± 2.87
$\alpha_2$ -globulin	8.45 ± 1.33	10.00 ± 1.55	9.62 ± 0.88	8.87 ± 1.80
$\beta$ -globulin	13.83 ± 1.15	14.17 ± 0.73	14.02 ± 1.11	13.52 ± 1.36
$\gamma$ -globulin	2.42 ± 0.89	2.18 ± 0.66	1.80 ± 0.46	2.18 ± 0.67
GOT (IU/L)	80.2 ± 19.0	87.5 ± 15.2	83.8 ± 15.0	73.2 ± 11.7
GPT (IU/L)	38.5 ± 9.8	33.3 ± 4.7	38.5 ± 7.6	28.0 ± 7.2
ALP (IU/L)	127.5 ± 64.4	147.2 ± 30.1	117.2 ± 21.3	151.8 ± 57.4
ChE (IU/L)	246.0 ± 36.7	211.8 ± 40.4	226.2 ± 45.6	213.2 ± 53.4
$\gamma$ -GTP (IU/L)	0.77 ± 0.33	0.83 ± 0.36	0.55 ± 0.19	0.75 ± 0.18
Total bilirubin (mg/dL)	0.058 ± 0.012	0.055 ± 0.015	0.078 ± 0.019	0.080 ± 0.011*
Glucose (mg/dL)	126.7 ± 8.2	128.3 ± 14.4	134.0 ± 16.4	148.0 ± 13.9*
Total cholesterol (mg/dL)	58.2 ± 3.5	57.5 ± 12.6	66.7 ± 9.3	54.0 ± 9.0
Triglyceride (mg/dL)	33.8 ± 8.2	41.7 ± 40.1	46.5 ± 19.6	62.3 ± 43.1
Phospholipids (mg/dL)	113.8 ± 6.7	111.3 ± 21.5	128.3 ± 13.0	108.8 ± 15.1
Urea nitrogen (mg/dL)	16.03 ± 1.34	19.62 ± 0.96**	16.83 ± 2.77	17.47 ± 3.58
Creatinine (mg/dL)	0.532 ± 0.034	0.560 ± 0.040	0.568 ± 0.041	0.557 ± 0.061
Sodium (mEq/L)	140.92 ± 1.24	141.25 ± 1.64	140.67 ± 1.03	140.42 ± 1.39
Potassium (mEq/L)	4.670 ± 0.280	4.657 ± 0.309	4.710 ± 0.374	4.790 ± 0.152
Chlorine (mEq/L)	109.0 ± 1.1	108.7 ± 1.8	108.3 ± 1.0	108.5 ± 1.1
Calcium (mg/dL)	9.85 ± 0.50	9.78 ± 0.25	9.65 ± 0.39	9.70 ± 0.40
Inorganic phosphorous (mg/dL)	8.53 ± 1.25	8.90 ± 0.92	8.02 ± 0.41	8.30 ± 0.39

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01)

Table 5 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	12	12	12	12
Body weight (g)	511.8 ± 50.2	501.9 ± 51.9	502.4 ± 46.0	500.2 ± 58.0
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.200 ± 0.066	2.240 ± 0.070	2.193 ± 0.078	2.235 ± 0.081
Heart (g)	1.504 ± 0.173	1.464 ± 0.196	1.433 ± 0.115	1.403 ± 0.119
Liver (g)	13.891 ± 2.222	13.664 ± 1.896	14.575 ± 2.256	15.398 ± 2.655
Kidneys (g)	3.329 ± 0.358	3.216 ± 0.313	3.084 ± 0.446	3.168 ± 0.280
Spleen (g)	0.748 ± 0.104	0.715 ± 0.082	0.703 ± 0.123	0.790 ± 0.128
Adrenals (mg)	57.8 ± 6.2	60.3 ± 10.0	60.3 ± 8.6	62.4 ± 7.4
Thymus (mg)	299.8 ± 52.6	276.1 ± 65.4	271.7 ± 53.2	282.2 ± 100.2
Testes (g)	3.234 ± 0.550	3.280 ± 0.236	3.191 ± 0.308	3.442 ± 0.245
Epididymides (g)	1.233 ± 0.205	1.243 ± 0.061	1.271 ± 0.120	1.301 ± 0.098
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.432 ± 0.043	0.450 ± 0.046	0.437 ± 0.033	0.452 ± 0.042
Heart (g%)	0.293 ± 0.021	0.292 ± 0.019	0.286 ± 0.018	0.283 ± 0.018
Liver (g%)	2.698 ± 0.199	2.717 ± 0.181	2.889 ± 0.244	3.063 ± 0.230**
Kidneys (g%)	0.651 ± 0.049	0.643 ± 0.053	0.612 ± 0.041	0.635 ± 0.038
Spleen (g%)*	0.147 ± 0.019	0.142 ± 0.016	0.139 ± 0.020	0.158 ± 0.019
Adrenals (mg%)	11.320 ± 0.859	12.008 ± 1.597	11.998 ± 1.305	12.512 ± 1.032
Thymus (mg%)	59.102 ± 12.036	54.784 ± 10.731	54.043 ± 9.930	56.000 ± 16.133
Testes (g%)	0.639 ± 0.131	0.658 ± 0.063	0.638 ± 0.083	0.696 ± 0.079
Epididymides (g%)	0.245 ± 0.054	0.250 ± 0.030	0.254 ± 0.027	0.262 ± 0.027

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (\*\*p<0.01)

Table 6 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	11	11	10	11
Body weight (g)	309.1 ± 19.9	311.5 ± 21.5	306.9 ± 18.2	308.7 ± 21.6
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.051 ± 0.107	2.029 ± 0.053	2.051 ± 0.062	2.013 ± 0.066
Heart (g)	0.922 ± 0.042	1.005 ± 0.132*	0.980 ± 0.051*	1.024 ± 0.135*
Liver (g)	9.694 ± 0.746	10.659 ± 1.004	10.478 ± 0.929	10.724 ± 1.210*
Kidneys (g)	1.968 ± 0.134	2.022 ± 0.154	2.010 ± 0.145	2.015 ± 0.178
Spleen (g)	0.613 ± 0.098	0.625 ± 0.110	0.673 ± 0.103	0.838 ± 0.119**
Adrenals (mg)	71.8 ± 8.3	80.5 ± 11.7	71.3 ± 7.0	79.0 ± 10.8
Thymus (mg)	219.6 ± 71.3	223.1 ± 77.3	196.8 ± 60.7	200.3 ± 54.6
Ovaries (mg)	106.3 ± 7.3	106.0 ± 7.2	106.8 ± 12.7	109.5 ± 10.1
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.666 ± 0.053	0.653 ± 0.041	0.671 ± 0.034	0.655 ± 0.053
Heart (g%)	0.298 ± 0.017	0.324 ± 0.040	0.319 ± 0.018*	0.330 ± 0.036*
Liver (g%)	3.140 ± 0.213	3.420 ± 0.166**	3.413 ± 0.215**	3.465 ± 0.206**
Kidneys (g%)	0.637 ± 0.043	0.652 ± 0.053	0.655 ± 0.043	0.655 ± 0.042
Spleen (g%)	0.196 ± 0.024	0.200 ± 0.024	0.220 ± 0.038	0.274 ± 0.038**
Adrenals (mg%)	23.252 ± 2.416	25.780 ± 2.796	23.226 ± 1.744	25.562 ± 2.662
Thymus (mg%)	70.383 ± 19.754	71.106 ± 22.416	64.247 ± 20.346	65.323 ± 18.878
Ovaries (mg%)	34.480 ± 2.896	34.155 ± 2.995	34.797 ± 3.513	35.598 ± 3.475

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

Table 7 Histopathological findings of rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item		0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
<Male>					
Number of animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings	Grade				
Glandular stomach: Erosion	+	0	0	0	1
<Female>					
Number of animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings	Grade				
Glandular stomach: Erosion	+	0	1	1	2
Spleen: Hematopoiesis, extramedullary	+	1	0	3	7*

Values are number of animals with findings.  
 Grade of histopathological finding; +: slight.  
 Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ )

Table 8 Influence of methacrylonitrile on reproductive performance of rats treated orally in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals examined	12	12	12	12
Number of pairs mated	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation	12	12	12	11
Duration of mating (day, Mean $\pm$ S.D.)	2.3 $\pm$ 0.8	2.9 $\pm$ 0.9	2.9 $\pm$ 1.1	3.5 $\pm$ 3.6
Copulation Index <sup>a</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	91.7
Number of pregnant animals	11	11	10	11
Fertility index <sup>b</sup> (%)	91.7	91.7	83.3	100.0

a) (Number of pairs with successful copulation/number of pairs mated) $\times$ 100.

b) (Number of pregnant animals/number of pairs with successful copulation) $\times$ 100.

Table 9 Influence of methacrylonitrile on developmental performance of rats treated orally in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of pregnant animals	11	11	10	11
Number of implantation sites	15.2 ± 1.7	15.7 ± 1.3	15.8 ± 1.1	16.0 ± 2.0
Number of pups born	14.5 ± 1.7	14.4 ± 2.2	15.0 ± 1.6	14.5 ± 2.3
Delivery index <sup>a</sup> (%)	96.0 ± 7.2	91.5 ± 12.8	94.9 ± 6.5	91.2 ± 10.6
Number of live pups	14.5 ± 1.7	14.3 ± 2.1	15.0 ± 1.6	13.6 ± 4.3
Live birth index <sup>b</sup> (%)	100.0 ± 0.0	99.5 ± 1.8	100.0 ± 0.0	92.0 ± 24.6
Sex ratio (Male/Female)	1.21 ± 0.62	0.83 ± 0.30	1.09 ± 0.44	1.00 ± 0.61
Number of dead pups	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.9 ± 2.7
Gestation length (day)	22.5 ± 0.5	22.6 ± 0.5	22.8 ± 0.4	22.6 ± 0.5
Gestation index <sup>c</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Nursing index <sup>d</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of live pups on day 0	14.5 ± 1.7	14.3 ± 2.1	15.0 ± 1.6	13.6 ± 4.3
Number of live pups on day 4	14.5 ± 1.6	14.1 ± 2.0	14.7 ± 1.5	13.6 ± 4.3
Viability index <sup>e</sup> (%)	99.5 ± 1.8	98.9 ± 2.5	98.1 ± 3.1	100.0 ± 0.0
Body weight of pups (g)				
Litter Day 0	98.14 ± 9.61	96.65 ± 11.61	99.51 ± 8.17	91.38 ± 27.56
1	107.27 ± 11.26	104.83 ± 12.08	109.18 ± 8.54	100.35 ± 30.07
4	151.44 ± 13.34	150.61 ± 15.98	154.09 ± 13.99	143.23 ± 42.32
Male Day 0	6.99 ± 0.68	7.00 ± 0.53	6.90 ± 0.63	6.91 ± 0.55
1	7.64 ± 0.85	7.66 ± 0.82	7.55 ± 0.76	7.58 ± 0.79
4	10.80 ± 1.25	11.09 ± 1.46	10.99 ± 1.24	11.05 ± 1.31
Female Day 0	6.60 ± 0.63	6.68 ± 0.57	6.50 ± 0.53	6.60 ± 0.53
1	7.23 ± 0.74	7.32 ± 0.78	7.14 ± 0.73	7.27 ± 0.68
4	10.34 ± 1.12	10.61 ± 1.31	10.22 ± 1.25	10.40 ± 1.17

Values are expressed as Mean ± S.D.

a) (Number of pups born/number of implantation sites) × 100.

b) (Number of live pups born/number of pups born) × 100.

c) (Number of females with live pups delivery/number of pregnant females) × 100.

d) (Number of females nursing live pups/number of females with normal delivery) × 100.

e) (Number of live pups on day 4/number of live pups born) × 100.