

ヒドラジナー水加物のラットを用いた
経口投与によるがん原性試験(混水試験)報告書

試験番号 : 0284

CAS No. 7803 - 57 - 8

2,000 年 12 月 21 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

ヒドラジナー水加物のラットを用いた
経口投与によるがん原性試験(混水試験)報告書

試験番号 : 0284

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 名称と別名	3
I-1-2 示性式、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、投与方法及び投与期間	5
II-1-2 投与濃度及びその設定理由	5
II-1-3 被験物質混合飲水の調製方法	5
II-1-4 被験物質混合飲水中の被験物質の濃度測定	6
II-1-5 被験物質混合飲水中の被験物質の安定性	6
II-1-6 被験物質の摂取量	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
II-3 観察・検査項目及び方法	8

II-3-1	動物の一般状態の観察	8
II-3-2	体重測定	8
II-3-3	摂水量測定	8
II-3-4	摂餌量測定	8
II-3-5	血液学的検査	8
II-3-6	血液生化学的検査	8
II-3-7	尿検査	9
II-3-8	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	9
II-4	数値処理と統計学的方法	10
II-4-1	数値の取扱いと表示	10
II-4-2	母数の取扱い	10
II-4-3	統計方法	10
II-5	試資料の保管	11
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	摂水量	13
III-5	摂餌量	13
III-6	被験物質摂取量	13
III-7	血液学的検査	14
III-8	血液生化学的検査	14
III-9	尿検査	14
III-10	病理学的検査	15
III-10-1	剖検	15
III-10-2	臓器重量	15
III-10-3	病理組織学的検査	16
III-10-4	死因	18
IV	考察及びまとめ	19

IV-1	生死状況、死因、一般状態、体重、摂水量、摂餌量	19
IV-2	腫瘍性病変	19
IV-3	非腫瘍性病変	21
IV-4	血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査	21
IV-5	他の文献との比較	22
V	試験の信頼性に影響を及ぼしたと考えられる要素	23
VI	結論	24
VII	参考文献	25

TABLES

TABLE 1	EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
TABLE 2	SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
TABLE 3	SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
TABLE 4	INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
TABLE 5	INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
TABLE 6	WATER CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
TABLE 7	WATER CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
TABLE 8	FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
TABLE 9	FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
TABLE 10	NEOPLASTIC LESIONS INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS OF MALE RAT IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
TABLE 11	NEOPLASTIC LESIONS INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS OF FEMALE RAT IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
TABLE 12	NUMBER OF RATS WITH SELECTED NON-NEOPLASTIC LESIONS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
TABLE 13	CAUSE OF DEATH OF RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE

FIGURES

- FIGURE 1 SURVIVAL ANIMAL RATE OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
- FIGURE 2 SURVIVAL ANIMAL RATE OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
- FIGURE 3 BODY WEIGHT CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
- FIGURE 4 BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
- FIGURE 5 WATER CONSUMPTION CHANGES OF RATS MICE IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
- FIGURE 6 WATER CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
- FIGURE 7 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE
- FIGURE 8 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE RATS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE

PHOTOGRAPHS

- PHOTOGRAPH 1 LIVER: ACIDOPHILIC CELL FOCUS,
RAT, MALE, 80ppm, ANIMAL NO. 0284-1315 (H&E)
- PHOTOGRAPH 2 LIVER: BASOPHILIC CELL FOCUS,
RAT, MALE, 80ppm, ANIMAL NO. 0284-1319 (H&E)
- PHOTOGRAPH 3 LIVER: HEPATOCELLULAR ADENOMA,
RAT, FEMALE, 80ppm, ANIMAL NO. 0284-2306 (H&E)
- PHOTOGRAPH 4 KIDNEY: HEPATOCELLULAR CARCINOMA,
RAT, FEMALE, 80ppm, ANIMAL NO. 0284-2334 (H&E)
- PHOTOGRAPH 5 KIDNEY: INFRACT,
RAT, FEMALE, 80ppm, ANIMAL NO. 0284-2343 (H&E)
- PHOTOGRAPH 6 KIDNEY: (A) PAPILLARY NECROSIS
(B) MINERALIZATION PAPILLA
(C) UROTHELIAL HYPERPLASIA: PELVIS
RAT, FEMALE, 80ppm, ANIMAL NO. 0284-2343(H&E)

APPENDIXES

APPENDIX A 1	CLINICAL OBSERVATION: SUMMARY, RAT : MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX A 2	CLINICAL OBSERVATION: SUMMARY, RAT : FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX B 1	BODY WEIGHT CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX B 2	BODY WEIGHT CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX C 1	WATER CONSUMPTION CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX C 2	WATER CONSUMPTION CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX D 1	FOOD CONSUMPTION CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX D 2	FOOD CONSUMPTION CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX E 1	CHEMICAL INTAKE CHANGES: SUMMARY, RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX E 2	CHEMICAL INTAKE CHANGES: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX F 1	HEMATOLOGY: SUMMARY, RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX F 2	HEMATOLOGY: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX G 1	BIOCHEMISTRY: SUMMARY, RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX G 2	BIOCHEMISTRY: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX H 1	URINALYSIS: SUMMARY, RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX H 2	URINALYSIS: SUMMARY, RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX I 1	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: MALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX I 2	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: FEMALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX I 3	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: MALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX I 4	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: FEMALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX I 5	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: MALE: SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX I 6	GROSS FINDINGS: SUMMARY, RAT: FEMALE: SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX J 1	ORGAN WEIGHT: ABSOLUTE: SUMMARY, RAT: MALE (2- YEAR STUDY)
APPENDIX J 2	ORGAN WEIGHT: ABSOLUTE: SUMMARY, RAT: FEMALE (2- YEAR STUDY)
APPENDIX K 1	ORGAN WEIGHT: RELATIVE: SUMMARY, RAT: MALE (2- YEAR STUDY)
APPENDIX K 2	ORGAN WEIGHT: RELATIVE: SUMMARY, RAT: FEMALE (2- YEAR STUDY)
APPENDIX L 1	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: MALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX L 2	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: FEMALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX L 3	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: MALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX L 4	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: FEMALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX L 5	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: MALE: SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX L 6	HISTOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: FEMALE: SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX M 1	NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED: RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX M 2	NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED: RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX N 1	HISTOLOGICAL FINDINGS: NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: MALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX N 2	HISTOLOGICAL FINDINGS: NEOPLASTIC LESIONS: SUMMARY, RAT: FEMALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX O 1	NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS: RAT: MALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX O 2	NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS: RAT: FEMALE (2-YEAR STUDY)
APPENDIX P 1	HISTOLOGICAL FINDINGS: METASTASIS OF TUMOR: SUMMARY, RAT: MALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX P 2	HISTOLOGICAL FINDINGS: METASTASIS OF TUMOR: SUMMARY, RAT: FEMALE: ALL ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX P 3	HISTOLOGICAL FINDINGS: METASTASIS OF TUMOR: SUMMARY, RAT: MALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX P 4	HISTOLOGICAL FINDINGS: METASTASIS OF TUMOR: SUMMARY, RAT: FEMALE: DEAD AND MORIBUND ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX P 5	HISTOLOGICAL FINDINGS: METASTASIS OF TUMOR: SUMMARY, RAT: MALE: SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)
APPENDIX P 6	HISTOLOGICAL FINDINGS: METASTASIS OF TUMOR: SUMMARY, RAT: FEMALE: SACRIFICED ANIMALS (2-YEAR STUDY)

APPENDIXES (CONTINUED)

- | | |
|--------------|---|
| APPENDIX Q 1 | IDENTITY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY |
| APPENDIX Q 2 | STABILITY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY |
| APPENDIX Q 3 | CONCENTRATION OF HYDRAZINE MONOHYDRATE IN FORMULATED WATER IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY |
| APPENDIX Q 4 | STABILITY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE IN FORMULATED WATER IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY |
| APPENDIX R 1 | METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY AND URINALYSIS IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE |
| APPENDIX R 2 | UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY IN THE 2-YEAR DRINKING WATER STUDY OF HYDRAZINE MONOHYDRATE |

要 約

ヒドラジン－水加物のがん原性を検索する目的でラットを用いた経口投与（飲水）による2年間（104週間）の試験を実施した。

試験には F344/DuCrj (Fischer) ラットを用いた。被験物質投与群3群と対照群1群の4群構成で、各群、雌雄各50匹とし、合計400匹を用いた。被験物質の投与は、ヒドラジン－水加物を希釈混合した飲料水を動物に自由摂取させることにより行った。投与濃度は雌雄とも20ppm、40ppm、80ppm（公比2.0）とした。観察、検査項目は、一般状態の観察、体重、摂水量、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。

試験の結果、最終計測週（104週）における投与群の生存率は、対照群と比べ雌の80ppm群で低下がみられたが、雌雄とも他の群では大きな差はみられなかった。投与期間中の一般状態の観察では、被験物質投与による特徴的な所見として、雌の全投与群で赤色尿がみられた。体重は雌雄とも全投与群で、ほぼ全投与期間にわたり、投与濃度に対応した体重増加の抑制が認められた。摂水量、摂餌量は雌雄とも全投与群で、ほぼ全投与期間にわたり、投与濃度に対応した低値が認められた。病理組織学的検査では、雄に、肝臓の肝細胞腺腫の発生増加がわずかであるが認められ、また前腫瘍性病変である好酸性小増殖巣が増加した。雌では、肝臓の肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加が認められ、また前腫瘍性病変である好酸性小増殖巣と好塩基性小増殖巣が増加した。その他の非腫瘍性病変としては、雌雄とも、腎臓の乳頭部の鉍質沈着、腎盂上皮の過形成、乳頭壊死及び梗塞が増加し、腎臓への障害が示された。

以上の結果より、雄ラットには肝臓の肝細胞腺腫の発生増加がわずかであるが認められ、また前腫瘍性病変である好酸性小増殖巣が増加し、ヒドラジン－水加物のがん原性を示す証拠と考えられた。雌ラットには肝臓の肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加が認められ、また前腫瘍性病変である好酸性小増殖巣と好塩基性小増殖巣が増加し、ヒドラジン－水加物のがん原性を示す証拠と考えられた。

ヒドラジーン水加物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)		0	20	40	80	ベト一定 検 定	コ克蘭 アミテー ジ検定
	検 査 動 物 数		50	50	50	50		
良性腫瘍	皮下組織	線維腫	5	7	5	4	↑↑	↑↑
	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	3	3	3	1		
	肝臓	肝細胞腺腫	0	0	0	3		
	脾臓	島細胞腺腫	1	3	1	2		
	下垂体	腺腫	33	21*	25	21*		
	甲状腺	C-細胞腺腫	5	7	5	3		
	副腎	褐色細胞腫	8	8	4	6		
	精巣	間細胞腫	37	45*	43	44		
							↑	
悪性腫瘍	肺	細気管支-肺胞上皮癌	0	3	0	0		
	脾臓	単核球性白血病	5	3	1	1		
	肝臓	肝細胞癌	0	0	0	1		
	肝臓	肝細胞腺腫／肝細胞癌	0	0	0	4	↑↑	↑↑

ヒドラジーン水加物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)		0	20	40	80	ベト一定 検 定	コ克蘭 アミテー ジ検定
	検 査 動 物 数		50	50	50	50		
良性腫瘍	肝臓	肝細胞腺腫	1	0	3	4	↑	
	下垂体	腺腫	23	26	23a)	16		
	甲状腺	C-細胞腺腫	7	2	1*	2		
	副腎	褐色細胞腫	1	3	0	0		
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	7	6	5	4		
	乳腺	線維腺腫	9	8	0*	2*		
								↓↓
悪性腫瘍	脾臓	単核球性白血病	6	3	1	1	↑↑	↓
	肝臓	肝細胞癌	0	0	0	4		↑↑
	乳腺	腺癌	1	0	0	0		
	肝臓	肝細胞腺腫／肝細胞癌	1	0	3	6	↑↑	↑↑

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

*:有意水準5%以下で有意

**:有意水準1%以下で有意（フィッシャー検定）

↑:有意水準5%以下で有意増加

↑↑:有意水準1%以下で有意増加（ベト、コ克蘭アミテージ検定）

↓:有意水準5%以下で有意減少

↓↓:有意水準1%以下で有意減少（コ克蘭アミテージ検定）

a):検査動物数48、他は上段に表示の検査動物数と同じ

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称と別名

名 称 : ヒドラジン-水加物 (Hydrazine Monohydrate)
別 名 : Hydrazine Hydrate
CAS No. : 7803-57-8

I-1-2 示性式、分子量 (文献 1)



分 子 量 : 50.06

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 無色透明の液体
比 重 : 1.032
融 点 : -51.7°C
沸 点 : 120.1°C
溶 解 性 : 水及びアルコールとは混和しやすく、クロロホルム及びエーテルに
不溶
保 存 条 件 : 室温で暗所に保管した。

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : KCJ4216 (1995.3.13~1997.1.13)
(使用期間) DLL4042 (1997.1.13~1997.3.17)
製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
グ レ ー ド : 和光特級
純 度 : 100% (KCJ4216、DLL4042)

I-3 被験物質の特性・同一性、安定性

I-3-1 特性・同一性

被験物質の同一性の確認は各ロット毎に、被験物質のマススペクトルをマススペクトロメーター (Hitachi M-80B Mass Spectrometer) により測定し、理論値と比較した。また、赤外吸収スペクトルを赤外吸収スペクトロメーター (島津製作所 FTIR-8200PC) により測定し、文献値 (文献 2) と比較した。

その結果、被験物質のマススペクトルは理論値と同じ擬分子イオンを示すピークが確認され、赤外吸収スペクトルも文献値と同じ波長にピークが認められ、ヒドラジーン水加物であることを確認した。

それらの結果については、APPENDIX Q1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質の安定性は各ロット毎に、使用開始前及び使用終了後に、赤外吸収スペクトロメーター (島津製作所 FTIR-8200PC) と高速液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) により、赤外吸収スペクトル及び高速液体クロマトグラムを測定し、それぞれのデータを比較することにより行った。

その結果、使用開始前及び使用終了後の赤外吸収スペクトル及び高速液体クロマトグラムに差はみられず、投与期間中のヒドラジーン水加物は安定であったことを確認した。

それらの結果については、APPENDIX Q2 に示した。

I-4 試験動物

動物は日本チャールス・リバー (株) (神奈川県厚木市下古沢 795 番地) より購入した F344/DuCrj (Fischer) ラット (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 248 匹を生後 4 週齢で導入し、各 1 週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で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 (投与開始時体重範囲、雄：117~135g、雌：95~107g) を選別し、試験に供した。

II 試験方法

試験計画、材料及び方法等の概要を TABLE 1 に示した。

II-1 投与

II-1-1 投与経路、投与方法及び投与期間

被験物質を脱イオン水（市水を脱イオンし、紫外線照射し、フィルターろ過した飲料水）によって設定濃度に調製した被験物質混合飲水を褐色ガラス製給水瓶に充填し、それを動物に自由摂取させる経口投与とした。投与期間は 104 週間とし、定期解剖直前まで連続投与した。なお、対照群の動物には脱イオン水のみを与えた。

II-1-2 投与濃度及びその設定理由

各群の投与濃度は予備試験である 13 週間試験（文献 3）の結果に基づき決定した。すなわち、6 週齢の F344/DuCrj (Fischer) ラットを用い、5 投与群と 1 対照群（各群雌雄 10 匹）に分け、ヒドラジーン水加物を設定濃度に希釈調製し、動物に自由摂取させる 13 週間の経口投与を行った。投与濃度は雌雄とも 25ppm、50ppm、100ppm、150ppm、200ppm とした。

その結果、雌雄とも 100ppm 以上の濃度では摂水の忌避及びこれに伴うと思われる摂餌量の低値や体重増加の抑制が大きく、2 年間の連続投与は困難であると思われた。50ppm 群では雌雄とも摂水量の低値はあるものの、体重の抑制も対照群と比較し、雄で 91%、雌で 95%と比較的少なく、病理組織学的検査でも投与によると思われる変化は特に認められなかった。また、その他の検査結果でも動物の生存に影響を及ぼすような顕著な変化を認めなかった。以上のことより、がん原性試験の最高用量は、雌雄とも 50ppm と 100ppm の間の 80ppm とし、以下 40ppm、20ppm（公比 2.0）とした。

II-1-3 被験物質混合飲水の調製方法

脱イオン水に被験物質を溶解して各設定濃度になるように希釈混合による調製をした。なお、試験における濃度の表示は、ppm（重量対重量比）とした。また、被験物質混合飲水の調製頻度は、給水瓶の交換頻度に合わせて週 2 回とした。

II-1-4 被験物質混合飲水中の被験物質の濃度測定

各投与濃度に調製された被験物質混合飲水中の被験物質の濃度は、約 3 ヶ月ごとに高速液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) を用いて分析した。各群の調製濃度は設定濃度に対し、20ppm 群 : 97.0~104.5%、40ppm 群 : 97.8~102.0%、80ppm 群 : 98.0~102.5% の範囲であった。

それらの結果を APPENDIX Q3 に示した。

II-1-5 被験物質混合飲水中の被験物質の安定性

被験物質混合飲水中の被験物質の安定性は、ラット用給水瓶に充填し、室温で 4 日間放置した被験物質混合飲水の最低投与濃度 (20ppm) と最高投与濃度 (80ppm) について、高速液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) を用いて分析し、試験開始前に確認した。その結果、4 日目には調製濃度に対し 20ppm で 78.9%、80ppm で 74.7% に減衰した。

それらの結果を APPENDIX Q4 に示した。

II-1-6 被験物質の摂取量

各計測週における摂水量と設定濃度より動物体重当り 1 日の被験物質摂取量 (mg/kg/day) を算出した。

それらの結果について、APPENDIX E1,E2 に示した。

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。

雄		雌	
群 名 称	使用動物数 (動物番号)	群 名 称	使用動物数 (動物番号)
対 照 群	50 匹 (1001~1050)	対 照 群	50 匹 (2001~2050)
20ppm 群	50 匹 (1101~1150)	20ppm 群	50 匹 (2101~2150)
40ppm 群	50 匹 (1201~1250)	40ppm 群	50 匹 (2201~2250)
80ppm 群	50 匹 (1301~1350)	80ppm 群	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、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4）。

試験期間の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間においては色素塗布により、投与期間においては耳パンチにより識別した。また、全飼育期間を通してケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物は検疫期間を含む全飼育期間、バリア区域（AC-1 空調エリア）内の独立した室（雄：111 室、雌：112 室）にそれぞれ収容し、各室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物との区別を行った。

II-2-3 飼育条件

動物は、全飼育期間を通して、設定温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ （実測値：雄（111 室）； $24.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、雌（112 室）； $23.9 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ）、設定湿度 $55 \pm 10\%$ （実測値：雄（111 室）； $55.9 \pm 2.5\%$ 、雌（112 室）； $55.3 \pm 2.2\%$ ）、明暗サイクル：12 時間点灯（8：00～20：00）／12 時間消灯（20：00～8：00）、換気回数 15～17 回／時に設定した環境下で飼育した。なお、飼育室の作業内容、電気設備点検、計測機器の故障、一時的な停電、空調機器の交換等により設定値の幅を超えることがあったが、動物の状態に影響を与えるほどの長時間または大きな変化ではなかった。

動物は単飼ケージ（ステンレス製二連網ケージ、 $W170 \times D294 \times H176\text{mm}$ ）に収容し、ケージ交換は2週間ごとに実施した。

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（30KGr- γ 線照射滅菌飼料）を使用し、固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖日前日の夕方から絶食させた。

飲水は、検疫期間はフィルターろ過した市水（秦野市水道局供給）を紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。馴化期間は市水を脱イオンし、紫外線照射し、フィルターろ過した飲料水を給水瓶により自由摂取させた。投与期間は市水を脱イオンし、紫外線照射し、フィルターろ過した飲料水に被験物質を希釈混合した、被験物質混合飲水を給水瓶により自由摂取させた。

なお、飼料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毎に入手し、また飲料水については（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3ヶ月ごとに分析を委託し、それぞれ試験計画書に規定した許容基準と比較して異常のないことを確認した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の一般状態の観察

全動物について、投与期間中は生死及び瀕死の確認を毎日 1 回以上行い、一般状態の観察を週 1 回行った。

II-3-2 体重測定

投与開始後 14 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（但し、104 週目も測定）、体重を測定した。また、動物の死亡発見時、切迫屠殺時及び定期解剖の搬出時にも体重を測定した。

II-3-3 摂水量測定

投与開始後 14 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（但し、104 週目も測定）、給水量と残水量を測定し、その差を給水日数で除した値を 1 日当たりの摂水量とした。

II-3-4 摂餌量測定

投与開始後 14 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（但し、104 週目も測定）、給餌量と残餌量を測定し、その差を給餌日数で除した値を 1 日当たりの摂餌量とした。

II-3-5 血液学的検査

定期解剖時まで生存した全動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2K 入り採血管に採血した血液を用いて血液学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より（18 時間以上）絶食させた。

検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX R1 に示した。

II-3-6 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存した全動物について、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、遠心分離して得られた血漿を用いて血液生化学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より（18 時間以上）絶食させた。

検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX R1 に示した。

II-3-7 尿検査

投与最終週まで生存した動物について新鮮尿を採取し、尿検査を行った。

検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX R1 に示した。

II-3-8 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について剖検を行った。

(2) 臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について TABLE 1 に示した臓器の実重量を測定した。また、実重量の体重比、すなわち定期解剖時の体重に対する百分率を算出した。

(3) 病理組織学的検査

全動物の臓器を 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、TABLE 1 に示した臓器及び肉眼的に変化のみられた組織を、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡にて病理組織学的に検査した。

II-4 数値処理と統計学的方法

II-4-1 数値の取扱いと表示

体重については g を単位とし、小数点以下第 1 位を四捨五入して整数値で表示した。

摂餌量と摂水量については g を単位とし、計測期間を通しての摂取量を小数点以下第 1 位まで計測し、この値を計測期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂取量を算出し、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。

ヒドラジン-水加物の体重当たりの摂取量は、摂水量にヒドラジン-水加物の設定濃度を乗じ、体重で除した値を mg/kg(body weight)/day を単位として小数点以下第 4 位を四捨五入し、小数点以下第 3 位までを表示した。

臓器重量については g を単位とし、小数点以下第 3 位まで計測し、表示した。臓器重量体重比について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、血液生化学的検査については APPENDIX R2 に示した精度により表示した。A/G 比はアルブミン / (総蛋白 - アルブミン) による計算で求め、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。

なお、各数値データにおいて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 母数の取り扱い

体重、摂水量及び摂餌量については、各計測時に生存していた全動物を対象に計測し、その中から欠測となったデータを除外して母数とした。

臓器重量、血液学的検査、血液生化学的検査は、定期解剖時まで生存した動物を対象にし、欠測となったデータを除外して母数とした。

尿検査は投与最終週まで生存した全動物を対象に行い、検査ができた動物数を母数とした。

剖検と病理組織学的検査データは、各群の有効動物数（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）を母数とした。ただし、腫瘍性病変については臓器別に、検査不能臓器数を除いたものを母数とした。

II-4-3 統計方法

本試験で得られた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群間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。

予備検定については 5% の有意水準で両側検定を行い、最終検定では 5% 及び 1% で両側検定を行った。

なお、病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変について、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等を基準に 1~4 のグレード分けし、 χ^2 検定を行った。また、尿検査についても χ^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、各群ごとの総担癌臓器数について Peto 検定 (文献 5)、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キスト (下記 (注) 参照) を用いて死亡率法 (コンテキスト 3、4 を付与された腫瘍についての検定)、有病率法 (コンテキスト 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 (コンテキスト 0~4 の総計で検定) を行った。

χ^2 検定と Fisher 検定は対照群と各投与群間との検定である。

各群雌雄ごとに検査数が 2 以下の項目については検定より除外した。

(注) Peto 検定に用いるコンテキスト

- 0 : 定期解剖時にみつかった腫瘍
- 1 : 死亡／瀕死例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 だと思いが、確かでない腫瘍
- 3 : 多分 4 だと思いが、確かでない腫瘍
- 4 : 死亡／瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

II-5 試資料の保管

試験計画書、標本、生データ、記録文書、最終報告書、信頼性保証証明書、その他本試験に係わる資料は試資料保管施設に保管する。保管期間は最終報告書提出後、原則として 10 年間とする。

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE 2,3 及び FIGURE 1,2 示した。

試験終了時の生存率は、雌の 80ppm 群で対照群と比べて低値がみられた。その他の群は雌雄とも対照群と比べ、大差はみられなかった。

各群の 104 週目における生存動物数（生存率）は、雄では対照群：37/50 例（74%）、20ppm 群：39/50 例（78%）、40ppm 群：44/50 例（88%）、80ppm 群：39/50 例（78%）、雌では対照群：40/50 例（80%）、20ppm 群：39/50 例（78%）、40ppm 群：44/50 例（88%）、80ppm 群：29/50 例（58%）であった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1,2 に、外部腫瘍、内部腫瘍の発生動物数を TABLE 4,5 に示した。

ヒドラジン—水加物の投与による特徴的な所見としては、雌の全投与群で赤色尿がみられた。その全投与期間における総発生例数（初めて観察された週）は、20ppm 群：1/50 例（89 週目）、40ppm 群：19/50 例（74 週目）、80ppm 群：31/50 例（74 週目）であった。雄では 80ppm 群に 1 例みられたのみであった。

投与期間を通しての外部腫瘍の発生動物数は、雄では対照群：15/50 例、20ppm 群：12/50 例、40ppm 群：9/50 例、80ppm 群：11/50 例、雌では対照群：14/50 例、20ppm 群：8/50 例、40ppm 群：4/50 例、80ppm 群：4/50 例であり、対照群と比べ、雌雄とも全投与群で発生例数の減少傾向がみられた。

投与期間を通しての内部腫瘍の発生動物数は、雄では対照群：3/50 例、20ppm 群：1/50 例、40ppm 群：2/50 例、80ppm 群：2/50 例、雌では対照群：2/50 例、20ppm 群：1/50 例、40ppm 群 1/50 例、80ppm 群：1/50 例であり、対照群と比べ、発生時期が著しく早まったり発生例数の増加はみられなかった。

Ⅲ-3 体重

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

雌雄とも投与濃度に対応した体重増加の抑制がみられた。

雄では対照群と比べ、40ppm 群と 80ppm 群ではほぼ全投与期間にわたり、20ppm 群では 22～94 週目にかけて有意な低値がみられた。雌では対照群と比べ、40ppm 群と 80ppm 群で全投与期間にわたり、20ppm 群では 1、7、10、12、13、18～98 週目に有意な低値が

みられた。

なお、104 週目の最終計測日における各投与群の体重は対照群に対して、雄では 20ppm 群：97%、40ppm 群：85%、80ppm 群：71%であり、雌では 20ppm 群：89%、40ppm 群：68%、80ppm 群：56%であった。

III-4 摂水量

摂水量を TABLE 6,7、FIGURE 5,6、APPENDIX C 1,2 に示した。

雄では対照群と比べ、全投与群で、全投与期間にわたり投与濃度に対応した低値がみられた。雌では対照群と比べ、全投与群で、ほぼ全投与期間にわたり投与濃度に対応した低値がみられた。

全投与期間における各群の平均摂水量（対照群に対する相対比）は、雄では対照群：19.8g（100%）、20ppm 群：16.5g（83%）、40ppm 群：14.8g（75%）、80ppm 群：13.6g（69%）であり、雌では、対照群：18.1g（100%）、20ppm 群：13.1g（72%）、40ppm 群：11.3g（62%）、80ppm 群：10.7g（59%）であった。

III-5 摂餌量

摂餌量を TABLE 8,9、FIGURE 7,8、APPENDIX D 1,2 に示した。

雄では対照群と比べ、40ppm 群と 80ppm 群で全投与期間にわたり、投与濃度に対応した低値がみられた。20ppm 群では 1～86 週目に低値が散見された。雌では対照群と比べ、40ppm 群と 80ppm 群で全投与期間にわたり、投与濃度に対応した低値がみられた。20ppm 群では 1～62 週目に低値がみられ、それ以降も低値が散見された。

全投与期間における各群の平均摂餌量（対照群に対する相対比）は、雄では対照群：15.9g（100%）、20ppm 群：15.4g（97%）、40ppm 群：14.6g（92%）、80ppm 群：13.7g（86%）であり、雌では、対照群：11.6g（100%）、20ppm 群：10.9g（94%）、40ppm 群：9.9g（86%）、80ppm 群：9.3g（81%）であった。

III-6 被験物質摂取量

体重、摂水量及び設定濃度より算出した被験物質摂取量を APPENDIX E 1,2 に示した。

全投与期間における 1 日当たりの被験物質摂取量の平均値（範囲）は、雄では 20ppm 群：0.971mg/kg/day（0.742～1.967mg/kg/day）、40ppm 群：1.844mg/kg/day（1.439～3.588mg/kg/day）、80ppm 群：3.863mg/kg/day（3.109～7.201mg/kg/day）であり、雌では 20ppm 群：1.276mg/kg/day（1.022～2.447mg/kg/day）、40ppm 群：2.496mg/kg/day（2.011～4.206mg/kg/day）、80ppm 群：5.350mg/kg/day（4.084～8.185mg/kg/day）で

あり、全投与期間における各群の平均被験物質摂取量は、雌雄ともほぼ設定用量比（公比 2.0）に対応していた。

III-7 血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX F 1,2 に示した。

雄では赤血球数の増加と血小板数の減少が全投与群で、MCV と MCH の減少、白血球分類で好酸球と単球の増加並びに異型白血球比の減少が 40ppm 群と 80ppm 群でみられた。また、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の増加が 20ppm 群と 40ppm 群でみられた。

雌では MCV と MCH の減少並びに血小板数の増加が全投与群で、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の減少が 40ppm 群と 80ppm 群で、MCHC の減少が 80ppm 群でみられた。

III-8 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を APPENDIX G 1,2 に示した。

雄ではクレアチニンの減少が全投与群で、アルブミンと A/G 比の増加、GPT 活性の上昇、並びに総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質及びカルシウムの減少が 40ppm 群と 80ppm 群で、GOT 活性と ALP 活性の上昇、カリウムの増加、並びに総蛋白と総ビリルビンの減少が 80ppm 群でみられた。その他、ナトリウムの減少が 40ppm 群でみられたが投与濃度に対応した変化ではなかった。

雌ではカルシウムの増加とクロールの減少が全投与群で、尿素窒素と無機リンの増加並びに総ビリルビンとグルコースの減少が 40ppm 群と 80ppm 群で、A/G 比の増加、 γ -GTP 活性と CPK 活性の上昇、並びに総蛋白の減少が 80ppm 群でみられた。その他、トリグリセライドの増加が 20ppm 群で、ナトリウムの減少が 20ppm 群と 40ppm 群でみられたが投与濃度に対応した変化ではなかった。

III-9 尿検査

尿検査の結果を APPENDIX H 1,2 に示した。

雄では潜血の陽性例及び陽性度の増加或いは増加傾向が全投与群で、蛋白の陽性度の減少とケトン体の陽性例の増加が 80ppm 群でみられた。

雌では潜血の陽性例及び陽性度の増加或いは増加傾向が全投与群で、pH の減少が 40ppm 群と 80ppm 群でみられた。その他、蛋白の陽性度の増加が 20ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ-10 病理学的検査

Ⅲ-10-1 剖検

解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX I 1～6 に示した。

雄では腎臓の変形（対照群：1/50 例、20ppm 群：4/50 例、40ppm 群：23/50 例、80ppm 群：33/50 例）が投与濃度に対応して増加し、特に 40ppm 群と 80ppm 群の多くの動物に観察された。これに対し、腎臓の顆粒状変化（対照群：25/50 例、20ppm 群：16/50 例、40ppm 群：11/50 例、80ppm 群：0/50 例）と下垂体の腫大（対照群：11/50 例、20ppm 群：5/50 例、40ppm 群：3/50 例、80ppm 群：0/50 例）は投与群で減少した。

雌では肝臓の結節（対照群：0/50 例、20ppm 群：1/50 例、40ppm 群：5/50 例、80ppm 群：6/50 例）が投与濃度が高い群ほど多く発生した。また、腎臓の変形（対照群：1/50 例、20ppm 群：7/50 例、40ppm 群：39/50 例、80ppm 群：25/50 例）が投与群で増加し、特に 40ppm 群と 80ppm 群では多くの動物に観察された。皮下組織の腫瘍（対照群：11/50 例、20ppm 群：10/50 例、40ppm 群：2/50 例、80ppm 群：4/50 例）は 40ppm 群と 80ppm 群で減少した。

Ⅲ-10-2 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 APPENDIX J 1,2 (実重量)、APPENDIX K 1,2 (体重比) に示した。

雄では被験物質投与による影響を示唆する臓器重量の変化は認められなかった。ただし、全投与群で解剖時体重が対照群よりも低く、これに伴って、20ppm 群で心臓の実重量の低値、40ppm 群で心臓、副腎、肺、脾臓及び肝臓の実重量の低値と肺、腎臓及び脳の体重比の高値、80ppm 群で心臓、副腎、肺、脾臓、肝臓及び脳の実重量の低値と心臓、肺、腎臓、精巣及び脳の体重比の高値がみられた。なお、40ppm 群の副腎の実重量の平均値は対照群より高い値であったが、この群の中に数例実重量の非常に大きなものが含まれていたためであり、群としての実重量は統計学的に有意な低値を示した。

雌では全投与群で腎臓の実重量と体重比の高値がみられ、被験物質投与による影響が示唆された。また、全投与群で解剖時体重が対照群よりも低く、これに伴って、20ppm 群で肝臓の体重比の高値、40ppm 群と 80ppm 群で副腎、心臓、肺、脾臓、肝臓及び脳の実重量の低値と肝臓、副腎、卵巣、心臓、肺、脾臓及び脳の体重比の高値がみられた。なお、40ppm 群と 80ppm 群の脾臓の体重比は、対照群と比べ平均値は低い値であったが、これは対照群の中に脾臓の実重量の非常に大きなものが 1 例含まれていたためで、統計学的には、40ppm 群と 80ppm 群の体重比は有意な高値を示した。

Ⅲ-10-3 病理組織学的検査

腫瘍性病変の結果を、APPENDIX M 1,2 に担腫瘍動物数と腫瘍数、APPENDIX N 1,2 に腫瘍の種類別の発生数、APPENDIX O 1,2 に統計解析（Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定）、APPENDIX P 1~6 に転移性病変について示した。非腫瘍性病変の結果は APPENDIX L 1~6 に示した。

—主な腫瘍性病変—

主な腫瘍性病変を TABLE 10,11 に示した。

<肝臓>

雄の肝細胞腺腫の発生（対照群：0/50 例、20ppm 群：0/50 例、40ppm 群：0/50 例、80ppm 群：3/50 例）が Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。肝細胞癌は 80ppm 群の 1/50 例にのみ発生がみられた。なお、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生（対照群：0/50 例、20ppm 群：0/50 例、40ppm 群：0/50 例、80ppm 群：4/50 例）も Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。

雌の肝細胞腺腫の発生（対照群：1/50 例、20ppm 群：0/50 例、40ppm 群：3/50 例、80ppm 群：4/50 例）が Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示し、肝細胞癌の発生（対照群：0/50 例、20ppm 群：0/50 例、40ppm 群：0/50 例、80ppm 群：4/50 例）は Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。また、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生（対照群：1/50 例、20ppm 群：0/50 例、40ppm 群：3/50 例、80ppm 群：6/50 例）も Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。なお、80ppm 群で肝細胞癌を示した動物のうち、2 例は肝細胞腺腫を伴っていた。

<乳腺>

雌の線維腺腫の発生（対照群：9/50 例、20ppm 群：8/50 例、40ppm 群：0/50 例、80ppm 群：2/50 例）が Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 40ppm 群と 80ppm 群に有意な減少が示された。

<脾臓>

雌の単核球性白血病の発生（対照群：6/50 例、20ppm 群：3/50 例、40ppm 群：1/50 例、80ppm 群：1/50 例）が Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

<甲状腺>

雌の甲状腺に C-細胞腺腫の発生（対照群：7/50 例、20ppm 群：2/50 例、40ppm 群：1/50

例、80ppm 群：2/50 例）が Fisher 検定で 40ppm 群に有意な減少が示された。

<下垂体>

雄の腺腫の発生（対照群：33/50 例、20ppm 群：21/50 例、40ppm 群：25/50 例、80ppm 群：21/50 例）が Fisher 検定で 20ppm 群と 80ppm 群に有意な減少が示された。

<精巣>

雄の精巣に間細胞腫の発生（対照群：37/50 例、20ppm 群：45/50 例、40ppm 群：43/50 例、80ppm 群：44/50 例）が Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示し、Fisher 検定で 20ppm 群に有意な増加が示された。

－非腫瘍性病変－

主な非腫瘍性病変を TABLE 12 に示した。

<鼻腔>

異物性炎症が雄の 40ppm 群と 80ppm 群で減少した。

<肝臓>

雄では好酸性小増殖巣（対照群：7/50 例、20ppm 群：12/50 例、40ppm 群：20/50 例、80ppm 群：36/50 例）が 40ppm 群と 80ppm 群で増加し、肉芽形成が 40ppm 群と 80ppm 群で、胆管増生が 80ppm 群で減少した。

雌では好酸性小増殖巣（対照群：0/50 例、20ppm 群：4/50 例、40ppm 群：22/50 例、80ppm 群：26/50 例）と好塩基性小増殖巣（対照群：4/50 例、20ppm 群：8/50 例、40ppm 群：19/50 例、80ppm 群：19/50 例）が 40ppm 群と 80ppm 群で増加した。

<腎臓>

雄では乳頭部の鉍質沈着（対照群：0/50 例、20ppm 群：6/50 例、40ppm 群：8/50 例、80ppm 群：29/50 例）と腎盂上皮の過形成（対照群：6/50 例、20ppm 群：16/50 例、40ppm 群：27/50 例、80ppm 群：28/50 例）が全投与群で、梗塞（対照群：0/50 例、20ppm 群：1/50 例、40ppm 群：5/50 例、80ppm 群：11/50 例）と乳頭の壊死（対照群：0/50 例、20ppm 群：0/50 例、40ppm 群：1/50 例、80ppm 群：20/50 例）が 80ppm 群で増加した。これに対し、慢性腎症は 40ppm 群と 80ppm 群で程度の減弱を示した。

雌では乳頭部の鉍質沈着（対照群：0/50 例、20ppm 群：13/50 例、40ppm 群：36/50 例、80ppm 群：47/50 例）が全投与群で、梗塞（対照群：0/50 例、20ppm 群：3/50 例、40ppm 群：35/50 例、80ppm 群：29/50 例）、腎盂上皮の過形成（対照群：19/50 例、20ppm 群：22/50 例、40ppm 群：42/50 例、80ppm 群：45/50 例）及び乳頭壊死（対照群：0/50 例、

20ppm 群：1/50 例、40ppm 群：35/50 例、80ppm 群：42/50 例）が 40ppm 群と 80ppm 群で増加した。これに対し、慢性腎症が 40ppm 群と 80ppm 群で程度の減弱を示した。

<心臓>

心筋線維症が雄の 80ppm 群で減少した。

<精巣>

結節性動脈炎が雄の 40ppm 群と 80ppm 群で減少した。

<前立腺>

過形成が雄の 80ppm 群で減少した。

<乳腺>

乳腺嚢胞が雌雄ともに 80ppm 群で減少した。

<ハーダー腺>

リンパ球浸潤が雌の 80ppm 群で減少した。

<骨>

骨硬化症が雌の 80ppm 群で減少した。

その他、雄で鼻腔の炎症性細胞浸潤と嗅上皮の好酸性変化、脾臓の髓外造血とヘモジデリン沈着、雌で鼻腔の嗅上皮の好酸性変化、横隔膜ヘルニア、心臓の心筋線維症、下垂体の嚢胞の発生が統計学的に対照群と投与群の間に有意な差が示されたが、投与濃度に対応した変化ではなく、被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

III-10-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 13 に示した。

雄では、被験物質の投与により増加した死因はみられなかった。

雌では、80ppm 群で腎臓病変による死亡／瀕死動物（対照群：0/10 例、20ppm 群：0/11 例、40ppm 群：0/6 例、80ppm 群：15/21 例）が増加した。

IV 考察及びまとめ

IV-1 生死状況、死因、一般状態、体重、摂水量、摂餌量

試験終了時の生存率は対照群と比べ、雌の 80ppm 群で低下がみられたが、その他の群は雌雄とも対照群と比べ、大きな差はみられなかった。一般状態の観察では被験物質投与による特徴的な所見として、雌の全投与群で投与濃度に対応して赤色尿のみられた動物数が増加した。その原因として、後述する腎臓の障害が考えられた。

摂水量は、全投与群で投与濃度に対応して低値がみられた。これは、被験物質混合飲水の飲水忌避に起因するものと考えた。これに伴い、摂餌量も投与濃度に対応して低下した。また、体重値も雌雄とも 40ppm 群と 80ppm 群ではほぼ全投与期間にわたり、20ppm 群でも多くの週で、投与濃度に対応した増加抑制がみられた。特に 80ppm 群では著しい体重増加の抑制がみられた。

動物の死因は雌の 80ppm 群で腎臓病変による死亡／瀕死動物が顕著に増加し、80ppm 群の全死亡動物数 21 例中 15 例（71%）が腎臓病変により死亡した。

IV-2 腫瘍性病変

雄の肝細胞腺腫の発生（対照群：0/50 例、20ppm 群：0/50 例、40ppm 群：0/50 例、80ppm 群：3/50 例）が Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。また、好酸性小増殖巣（対照群：7/50 例、20ppm 群：12/50 例、40ppm 群：20/50 例、80ppm 群：36/50 例）が 40ppm 群と 80ppm 群で投与濃度に対応して顕著に増加した。80ppm 群の肝細胞腺腫の発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータ（文献 6）の発生率 0～6%（19/999 例、平均 1.9%）の最高発生率（6.0%）と同率であり、その増加はわずかであった。しかし、好酸性小増殖巣は投与用量に対応して顕著に増加しており被験物質の投与による影響と考えられた。好酸性小増殖巣は肝腫瘍に移行する可能性がある前腫瘍性病変と考えられており（文献 7）、肝細胞腺腫についても発生例数は少ないものの、被験物質の投与による増加と推察した。なお、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生（対照群：0/50 例、20ppm 群：0/50 例、40ppm 群：0/50 例、80ppm 群：4/50 例）も Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示したが、肝細胞癌の発生は 80ppm 群の 1 例だけであり被験物質の投与との関連について言及できなかった。

雌については肝細胞腺腫の発生（対照群：1/50 例、20ppm 群：0/50 例、40ppm 群：3/50 例、80ppm 群：4/50 例）が Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示し、肝細胞癌の発生（対照群：0/50 例、20ppm 群：0/50 例、40ppm 群：0/50 例、80ppm 群：4/50 例）が Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。また、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生（対照群：1/50 例、20ppm 群：0/50 例、40ppm 群：3/50 例、80ppm 群：6/50 例）も Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。80ppm 群の発生率は、肝細胞腺腫、肝細胞癌ともヒストリカルコントロールデータの発生率、肝細胞

胞腺腫 0~6.1%、肝細胞癌 0~2.0% (肝細胞腺腫: 12/898 例、平均 1.3%、肝細胞癌: 1/898 例、平均 0.1%) の最高発生率を超えており、特に雌の肝細胞癌の発生はヒストリカルコントロールデータ 18 試験で 898 例中に 1 例みられたのみであり、非常にまれな腫瘍であるといえる。また、前腫瘍性病変である好酸性小増殖巣 (対照群: 0/50 例、20ppm 群: 4/50 例、40ppm 群: 22/50 例、80ppm 群: 26/50 例) と好塩基性小増殖巣 (対照群: 4/50 例、20ppm 群: 8/50 例、40ppm 群: 19/50 例、80ppm 群: 19/50 例) も 40ppm 群と 80ppm 群で増加しており、被験物質の投与による肝腫瘍の増加を裏付ける変化と考えられた。したがって、被験物質投与による影響でこれらの腫瘍の発生は増加したと考えられた。しかし、肝細胞癌の発生は 80ppm 群の 4 例のみであり、「がん原性を示す明らかな証拠」とするには不十分であると考えられた。

以上をまとめると、雄では肝臓に肝細胞腺腫の発生増加がわずかであるが認められ、前腫瘍性病変である好酸性小増殖巣の発生増加が認められた。これらの結果はヒドラジーン水加物のがん原性を示す証拠 (some evidence) であると考えられた。また、雌では肝臓に肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加が認められ、前腫瘍性病変である好酸性小増殖巣と好塩基性小増殖巣の発生増加が認められた。これらの結果はヒドラジーン水加物のがん原性を示す証拠 (some evidence) であると考えられた。

その他、雌の乳腺の線維腺腫の発生 (対照群: 9/50 例、20ppm 群: 8/50 例、40ppm 群: 0/50 例、80ppm 群: 2/50 例) が Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 40ppm 群と 80ppm 群に有意な減少が示された。この腫瘍の発生は各投与群ともヒストリカルコントロールデータの発生率 0~20% (84/898 例、平均: 9.4%) の範囲であった。しかし、上記腫瘍の投与群の発生は、ヒストリカルコントロールデータの範囲内であるものの、過去のヒストリカルコントロールデータ 18 試験中、0 例が 1 試験、2 例も 3 試験のみであり、本試験における乳腺の線維腺腫の発生減少は被験物質の投与による影響を否定できないと考えた。

雌の脾臓の単核球性白血病の発生 (対照群: 6/50 例、20ppm 群: 3/50 例、40ppm 群: 1/50 例、80ppm 群: 1/50 例) が Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。この腫瘍の発生は各投与群ともヒストリカルコントロールデータの発生率 2~26% (131/898 例、14.6%) の範囲内であった。しかし、上記腫瘍の投与群の発生は、ヒストリカルコントロールデータ 18 試験中、1 例の発生を示したものは 1 試験のみであり、本試験における単核球性白血病の発生減少は被験物質の投与による影響を否定できないと考えた。

雌の甲状腺の C-細胞腺腫の発生 (対照群: 7/50 例、20ppm 群: 2/50 例、40ppm 群: 1/50 例、80ppm 群: 2/50 例) が Fisher 検定で 40ppm 群に有意な減少が示された。この腫瘍の発生は各投与群ともヒストリカルコントロールデータの発生率 0~14% (80/893 例、平均 8.9%) の範囲内であった。しかし、上記腫瘍の投与群の発生は、ヒストリカルコントロールデータの範囲内であるものの、ヒストリカルコントロールデータ 18 試験中、0 例が 1 試験、2 例も 3 試験のみであり、本試験における甲状腺の C-細胞腺腫の発生減少は被験物質

の投与による影響を否定できないと考えた。

雄の下垂体に腺腫の発生（対照群：33/50 例、20ppm 群：21/50 例、40ppm 群：25/50 例、80ppm 群：21/50 例）が Fisher 検定で 20ppm 群と 80ppm 群に有意な減少が示された。しかし、この腫瘍の発生は全投与群ともヒストリカルコントロールデータの発生率 20～52%（343/995 例、平均 34.5%）の範囲内であり、投与濃度に対応した減少はみられなかった。また、下垂体の腺腫の発生は制限給餌や体重増加の抑制により、減少すると報告されており（文献 8,9,10）、雄では全投与群で体重増加の抑制と摂餌量の低値あるいは低値傾向がみられたことから、下垂体の腺腫の発生減少は被験物質投与による体重増加の抑制との関連が考えられた。

雄の精巣の間細胞腫の発生（対照群：37/50 例、20ppm 群：45/50 例、40ppm 群：43/50 例、80ppm 群：44/50 例）が Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示し、Fisher 検定で 20ppm 群に有意な増加が示された。しかし、この腫瘍の発生は全投与群ともヒストリカルコントロールデータの発生率 82～98%（887/996 例、平均 88.7%）の範囲内であり、また各投与群の発生率を比較すると投与濃度に対応した増加はみられなかったことから、この腫瘍の発生は統計学的に有意差を示したが被験物質投与による影響とは考えられなかった。

IV-3 非腫瘍性病変

雌雄とも、投与群の腎臓に乳頭部の鉍質沈着、腎盂上皮の過形成、乳頭壊死及び梗塞の発生増加を認めた。雄では乳頭部の鉍質沈着と腎盂上皮の過形成が全投与群で増加し、80ppm 群で乳頭壊死と梗塞の増加も認められた。また、雌では乳頭部の鉍質沈着が全投与群で増加し、40ppm 以上の群では、腎盂上皮の過形成、乳頭壊死及び梗塞の増加も認められた。これらの所見は投与濃度が高いほど程度が強く、雌の 80ppm 群では 15 例がこれらの腎臓病変によって死亡した。また、一般状態観察でみられた赤色尿（雌のみ 40ppm 群と 80ppm 群）、尿検査でみられた潜血の陽性例の増加（雌雄とも 40ppm 群と 80ppm 群）、剖検観察でみられた腎臓の変形（雌雄とも 40ppm 群と 80ppm 群）は、上記腎臓病変に対応した所見と考えられた。これに対し、慢性腎症が雌雄ともに 40ppm 群と 80ppm 群で程度の減弱を示した。ラットの加齢性病変である慢性腎症は体重増加の抑制により軽減することが報告されている（文献 7）。本試験でも全投与群で体重増加の抑制がみられ、特に 40ppm 群と 80ppm 群で顕著であり、慢性腎症の減弱は被験物質の投与による体重増加の抑制による影響と考えられた。なお、腎臓の腫瘍性変化については、投与による影響を認めなかった。

IV-4 血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査

血液学的検査においては、被験物質の投与による影響を示唆する変化として、雄の全投与群に赤血球数の増加、雌の全投与群及び雄の 40ppm 以上の群に MCV、MCH の減少、雌の 80ppm 群に MCHC の減少が認められた。しかし、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値は雄で増加、雌で減少、血小板数は雄で減少、雌で増加とそれぞれ雌雄で相反する変化

を示した。また、変化のあった項目を総合的に判断すると、雄では増血傾向、雌では貧血傾向を示した。その他、雄の 40ppm 以上の群に好酸球比及び単球比の増加、異型白血球比の減少が認められたが、ごくわずかな変化であり、毒性学的には殆ど意味のないものであると推測された。

血液生化学的検査においては、被験物質の投与による肝臓等への影響を示す変化として、雄の 40ppm 以上の群に GPT 活性の上昇、80ppm 群に GOT 活性及び ALP 活性の上昇が認められた。腎臓等への影響を示唆する変化としては、雌の 40ppm 以上の群に尿素窒素、無機リンの増加が認められた。また、体重の増加抑制や摂餌量の減少等の影響と思われる変化として、雄の 40ppm 以上の群に総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質の減少が、雌の 40ppm 以上の群にグルコースの減少が、雌雄の 80ppm 群に総蛋白の減少が認められた。その他、雄の全投与群にクレアチニンの減少、雄の 80ppm 群と雌の 40ppm 以上の群に総ビリルビンの減少がみられたが、いずれも減少性の変化であった。また、カルシウムは雄で減少、雌で増加と相反する変化を示した。さらに、これら以外にも幾つかの項目で変化がみられたが、いずれもわずかな変化であり、その毒性学的意義は明確ではなかった。

尿検査においては、被験物質の投与による影響を示す変化として、潜血の陽性例及び陽性度の増加ないし増加傾向が雌雄の全投与群に認められ、雌の 40ppm 以上の群に pH の減少が認められた。また、雄の 80ppm 群に蛋白の陽性度の減少及びケトン体の陽性例の増加が認められたが、ごくわずかな変化であった。

IV-5 他の文献との比較

ラットを用いたヒドラジン-水加物の飲水投与による慢性毒性試験は、Steinhoff と Mohr (1988) (文献 11) によって報告されている。

Steinhoff らは、Wistar 系ラット 4 群、雌雄各 50 匹/群、計 400 匹に 0、2、10 及び 50ppm (mg/L) の濃度にヒドラジン-水加物を溶解した飲水を与え、生涯にわたる慢性毒性試験を実施した。その結果、平均生存期間は群間による差はみられず、全平均生存期間は 915 日であった。50ppm 群では体重増加の抑制が認められ、毒性用量であると判断された。腫瘍性病変は 50ppm 群で雄 4/50 例、雌 7/50 例に肝腫瘍がみられ、統計学的に有意な発生増加であった。しかし、それ以下の濃度では有意な増加は認められなかった。

当センターで実施した今回のがん原性試験の結果と比較してみると、雄では肝細胞腺腫の発生がわずかであるが増加し、雌でも肝細胞腺腫の発生と肝細胞癌の発生が増加し、Steinhoff らの試験とほぼ同様の結果が得られた。

V 試験の信頼性に影響を及ぼしたと考えられる要素

ー網赤血球比の測定不実施についてー

試験計画書では、定期解剖時の血液学的検査の項目の 1 つとして、網赤血球比の測定を実施する予定であった。しかし、定期解剖（1997 年 3 月 11～17 日）の血液学的検査実施後、網赤血球比測定用のスライド標本を作成していないことに気付いたが、標本を再作成する血液がなく、検査を実施することができなかった。

網赤血球の増加は、赤血球再生現象が盛んであることを示し、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値などの検査値とともに貧血等の指標として使用される項目である。

本試験の予備試験である 13 週間試験（試験番号 0265）では、投与濃度を雌雄とも 25、50、100、150、200ppm に設定し、試験を実施した。その結果、雄では 100ppm 以上の群で貧血を示唆する変化がみられ、150ppm 以上の群で網赤血球比の高値がみられた。雌では 50ppm 以上の群で貧血を示唆する変化がみられ、100ppm 以上の群で網赤血球比の高値がみられた。

本試験の投与濃度は、雌雄とも 20、40、80ppm であり、13 週間試験で網赤血球比の増加がみられた濃度よりやや低い濃度で長期の投与試験を実施した。これらのことから、本試験で網赤血球比の検査を実施していれば、変化がみられた可能性も考えられた。しかし、本試験ではヘモグロビン濃度とヘマトクリット値で、雌の 40ppm 群と 80ppm 群で低値がみられ、網赤血球比の検査値がないものの貧血傾向の所見を得ることができた。また、本試験の試験目的である「がん原性の有無を検索する」という点から考えると、網赤血球比の検査が実施できなかったが、病理組織学的検査をはじめとする、他の検査項目から総合的に判断し得ることから、試験結果の評価及び信頼性に与える影響は少ないと判断した。

VI 結論

F344/DuCrj (Fischer) ラットを用いてヒドラジーン水加物の2年間(104週間)にわたる経口投与によるがん原性試験を行った。

その結果、雄ラットには、肝臓の肝細胞腺腫の発生増加がわずかであるが認められ、また前腫瘍性病変である好酸性小増殖巣が増加した。これらの結果は、ヒドラジーン水加物のがん原性を示す証拠と考えられた。

雌ラットには、肝臓の肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生増加が認められ、また前腫瘍性病変である好酸性小増殖巣と好塩基性小増殖巣が増加した。これらの結果は、ヒドラジーン水加物のがん原性を示す証拠と考えられた。

その他の非腫瘍性病変としては、雌雄とも、腎臓の乳頭部の鉍質沈着、腎盂上皮の過形成、乳頭壊死及び梗塞が増加し、腎臓への障害が示された。

VII 参考文献

1. 化学工業日報社 (2000)
13700 の化学商品
pp.144-146, 化学工業日報社, 東京
2. 和光純薬工業 (株) からの提供資料 (1993)
3. 日本バイオアッセイ研究センター (1997)
ヒドラジーン水加物のラット及びマウスを用いた経口投与によるがん原性予備試験
(混水試験) 報告書
日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川
4. 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.
5. Peto, R., Pike, M.C., Day, N.E., Gray, R.G., Lee, P.N., Parish, S., Peto, J., Richards,
S. and Wahrendorf, J. (1980)
Guideline for simple, sensitive significance test for carcinogenic effect in long-term
animal experiments.
In: Long-Term and Short-Term Screening Assay for Carcinogenes: A Critical
Proposal.
IARC Monographs, Suppl. 2, pp.311-426, IARC, Lyon.
6. 日本バイオアッセイ研究センター内部資料 (1984-1999)
7. Harada, T., Maronpot, R.R., Boorman, G.A., Morris, R.W. and Stizel, K.A. (1990)
Foci of cellular alteration in the rat liver: a review.
Journal of Toxicologic Pathology, 3, 161-188.
8. Imai, K., Yoshimura, S., Yamaguchi, K., Matsui, E., Isaka, H., Hashimoto, K. and
Boorman, G.A. (1990)
Effects of dietary restriction on age associated pathologic changes in F-344 rats.
Journal of Toxicologic Pathology, 3, 209-221.

9. Witt, W.M., Sheldon, W.G. and Thurman, J.D. (1991)
Pathological endpoints in dietary restricted rodents-Fischer 344 rats and B6C3F₁ mice.
In : Biological Effects of Dietary Restriction.
(Ed. : Fishbein, L.) pp.73-86, Springer-Verlag, New York.
10. Seilkop, S.K. (1995)
The effect of body weight on tumor incidence and carcinogenicity testing in B6C3F₁ mice and F344 rats.
Fundamental and Applied Toxicology, 24, 247-259.
11. Steinhoff, D. and Mohr, U. (1988)
The question of carcinogenic effects of hydrazine.
Experimental Pathology, 33, 133-143.