

ヒドラジーン-水加物のマウスを用いた
経口投与によるがん原性試験(混水試験)報告書

試験番号：0285

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マウスを用いた
経口投与によるがん原性試験(混水試験)報告書

試験番号：0285

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	6
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	9
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	14
III-10-1 剖検	14
III-10-2 臓器重量	15
III-10-3 病理組織学的検査	15
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	結論	23
VI	参考文献	24

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

FIGURES

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

PHOTOGRAPHS

- PHOTOGRAPH 1 LIVER: HEPATOCELLULAR ADENOMA,
MOUSE, FEMALE, 160ppm, ANIMAL NO. 0285-2307 (H&E)
- PHOTOGRAPH 2 LIVER: HEPATOCELLULAR CARCINOMA,
MOUSE, FEMALE, 160ppm, ANIMAL NO. 0285-2323 (H&E)
- PHOTOGRAPH 3 LIVER: HEMANGIOMA,
MOUSE, FEMALE, 160ppm, ANIMAL NO. 0285-2301 (H&E)
- PHOTOGRAPH 4 KIDNEY: DESQUAMATION: PELVIS
MOUSE, MALE, 80ppm, ANIMAL NO. 0285-1301 (H&E)

APPENDIXES

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

APPENDIXES (CONTINUED)

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

APPENDIXES (CONTINUED)

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

ヒドラジンー水加物のがん原性を検索する目的でマウスを用いた経口投与（飲水）による2年間（104週間）の試験を実施した。

試験には Crj:BDF₁ マウスを用いた。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、ヒドラジンー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、雄では20ppm、40ppm、80ppm（公比2.0）、雌では40ppm、80ppm、160ppm（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、対照群と比べ低値はみられず、雄では40ppm群と80ppm群で、雌では40ppm群で、むしろ生存率が高値であった。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は、雌雄ともみられなかった。体重は雌雄とも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。摂水量と摂餌量も雌雄とも投与濃度に対応した低値がみられ、特に投与群における摂水量の低値は顕著であった。病理組織学的検査では、雄に被験物質投与による腫瘍の発生増加は認められなかった。雌では肝細胞腺腫の明らかな発生増加と肝細胞癌の僅かな増加が認められた。なお、雄で肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生減少が、雌で下垂体の腺腫の発生減少がみられた。また、非腫瘍性病変としては、雄では腎臓に腎盂上皮の剥離の増加、雌では鼻腔に鼻腺の呼吸上皮化生と呼吸上皮のエオジン好性変化の増加がみられた。

以上の結果より、雄マウスにはヒドラジンー水加物投与による腫瘍の発生増加を示す証拠は認められなかった。雌マウスには肝細胞腺腫の明らかな発生増加と肝細胞癌の僅かな増加が認められ、ヒドラジンー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 (マウス：雄)

	投 与 濃 度 (ppm)		0	20	40	80	ベト一 検 定	コクラン アミテー ジ検定
	検 査 動 物 数		50	50	50	50		
良性腫瘍	肺 肝臓	細気管支-肺胞上皮腺腫	5	6	2	7		
		血管腫	0	0	4	0		
		肝細胞腺腫	17	12	8*	6**		↓↓
悪性腫瘍	肺 リンパ節	細気管支-肺胞上皮癌	12	10	4	5		
		悪性リンパ腫	4	3	5	5		
	脾臓 肝臓	悪性リンパ腫	3	3	0	1		
		組織球性肉腫	3	4	0	3		
	血管肉腫 肝細胞癌 肝細胞芽腫	血管肉腫	3	1	2	0		
		肝細胞癌	21	14	9**	4**		↓↓
		肝細胞芽腫	3	0	1	0		

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 (マウス：雌)

	投 与 濃 度 (ppm)		0	40	80	160	ベト一 検 定	コクラン アミテー ジ検定
	検 査 動 物 数		50	50	50	50		
良性腫瘍	肺 肝臓	細気管支-肺胞上皮腺腫	2	3	4	4		
		血管腫	0	0	1	3	↑↑	↑
		肝細胞腺腫	5	6	2	14*	↑↑	↑↑
	下垂体	腺腫	10	3*	3*	0**		↓↓
悪性腫瘍	肺 リンパ節	細気管支-肺胞上皮癌	3	0	2	0		
		悪性リンパ腫	22	14	13*	7**		↓↓
	脾臓 肝臓	悪性リンパ腫	4	6	6	6		
		肝細胞癌	2	2	1	4	↑↑	
	血管肉腫 子宮	血管肉腫	1	2	0	1		
		組織球性肉腫	7	9	9	3		
	肝臓	血管腫+血管肉腫	1	2	1	4	↑	
		肝細胞腺腫+肝細胞癌	7	8	3	17*	↑↑	↑↑

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5%以下で有意増加

↓:有意水準5%以下で有意減少

** :有意水準1%以下で有意 (フィッシャー検定)

↑↑:有意水準1%以下で有意増加 (ベト、コクランアミテージ検定)

↓↓:有意水準1%以下で有意減少 (コクランアミテージ検定)

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 : ヒドラジンー水加物 (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 (1995.4.17~1997.1.13)
(使用期間) DLL4042 (1997.1.13~1997.4.21)
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 Q 1 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 Q 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) (神奈川県厚木市下古沢 795 番地) より購入した Crj:BDF₁ マウス (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: 23.0~25.7g、雌: 18.2~21.0g) 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 Crj:BDF₁ マウスを用い、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、被験物質の投与による影響に性差が認められ、特に体重への影響は顕著であった。したがって、がん原性試験の投与濃度は雌雄で異なる設定とするのが妥当であると考えた。

雄は、100ppm 群では摂水量及び摂餌量の低値と体重増加の抑制がみられ、2 年間の連続投与は困難であると考えられた。50ppm 群では摂水量及び摂餌量の低値、体重増加の抑制はみられるものの、病理組織学的検査で投与によると思われる所見は認められなかった。以上のことより、がん原性試験の最高用量は 50ppm と 100ppm の間の 80ppm とし、以下 40ppm、20ppm（公比 2.0）とした。

雌は、200ppm 群では顕著な摂水量及び摂餌量の低値、体重増加の抑制（87%）がみられた。150ppm 群では摂水量及び摂餌量の低値はみられるものの、体重増加の抑制は 93% と比較的少なく、病理組織学的検査で被験物質の投与によると思われる所見は認められなかった。以上のことより、がん原性試験の最高用量は 150ppm よりやや高めの 160ppm とし、以下 80ppm、40ppm（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：99.0～101.0%、40ppm 群：98.5～102.8%、80ppm 群：98.1～103.4%、160ppm 群：98.1～101.9%の範囲であった。

それらの結果を APPENDIX Q 3 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、マウス用給水瓶に充填し、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（160ppm）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 77.3%、160ppm で 74.1%に減衰した。

それらの結果を APPENDIX Q 4 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 E 1, E 2 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)	40ppm 群	50 匹 (2101～2150)
40ppm 群	50 匹 (1201～1250)	80ppm 群	50 匹 (2201～2250)
80ppm 群	50 匹 (1301～1350)	160ppm 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した。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：108 室、雌：109 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（108 室）； $23.8 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、雌（109 室）； $23.7 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ）、設定湿度 $55 \pm 10\%$ （実測値：雄（108 室）； $56.8 \pm 2.1\%$ 雌（109 室）； $55.9 \pm 1.8\%$ ）、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、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、W112×D212×H120mm）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 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 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 R 1 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 R 1 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 R 1 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 位まで計測し、そのまま小数点以下第 1 位まで表示した。

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ックス (下記 (注) 参照) 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。

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ックス

- 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 に示した。

試験終了時の生存率は、対照群と比べ生存率の低値はみられなかった。雄では 40ppm 群と 80ppm 群で、雌では 40ppm 群で高値傾向がみられた。

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：31/50 例（62%）、20ppm 群：30/50 例（60%）、40ppm 群：36/50 例（72%）、80ppm 群：40/50 例（80%）、雌では対照群：26/50 例（52%）、40ppm 群：37/50 例（74%）、80ppm 群：29/50 例（58%）、160ppm 群：23/50 例（46%）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は、雌雄ともみられなかった。

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：8/50 例、20ppm 群：4/50 例、40ppm 群：0/50 例、80ppm 群：2/50 例、雌では対照群：1/50 例、40ppm 群：6/50 例、80ppm 群：5/50 例、160ppm 群：3/50 例であり、対照群と比べ、雄の全投与群で減少傾向が、雌では全投与群で増加傾向がみられた。

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：10/50 例、20ppm 群：6/50 例、40ppm 群：8/50 例、80ppm 群：4/50 例、雌では対照群：9/50 例、40ppm 群：11/50 例、80ppm 群：13/50 例、160ppm 群：4/50 例であり、対照群と比べ、雄の全投与群で減少傾向が、雌では 160ppm 群で減少傾向がみられた。

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 群で全投与期間にわたり、20ppm 群では 3～94 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、80ppm 群と 160ppm 群で全投与期間にわたり、40ppm 群では 1、6～104 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：95%、40ppm 群：83%、80ppm 群：72%であり、雌では 40ppm 群：78%、80ppm 群：73%、160ppm 群：59%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。

雌雄とも対照群と比べ、全投与群で、全投与期間にわたり投与濃度に対応した摂水量の低値がみられた。

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：4.0g（100%）、20ppm 群：2.7g（67%）、40ppm 群：2.4g（59%）、80ppm 群：2.0g（50%）であり、雌では、対照群：4.1g（100%）、40ppm 群：2.4g（59%）、80ppm 群：2.2g（54%）、160ppm 群：1.6g（41%）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、80ppm 群では全投与期間にわたり、40ppm 群では 2～86、94、104 週目に、20ppm 群では 1、3、5～86、94、104 週目に投与濃度に対応した摂餌量の低値がみられた。

雌では対照群と比べ、160ppm 群ではほぼ全投与期間にわたり、80ppm 群では 13～104 週目に、40ppm 群では 1、10、13、18～30、38～66、74～104 週目に投与濃度に対応した摂餌量の低値がみられた。

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：4.3g（100%）、20ppm 群：4.0g（93%）、40ppm 群：3.9g（89%）、80ppm 群：3.7g（85%）であり、雌では、対照群：4.0g（100%）、40ppm 群：3.6g（92%）、80ppm 群：3.6g（90%）、160ppm 群：3.3g（84%）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：1.437mg/kg/day（1.060～2.509mg/kg/day）、40ppm 群：2.649mg/kg/day（2.103～3.923mg/kg/day）、80ppm 群：4.930mg/kg/day（4.090～6.676mg/kg/day）であり、雌では 40ppm 群：3.535mg/kg/day（2.938～4.637mg/kg/day）、80ppm 群：6.795mg/kg/day（5.770～8.364mg/kg/day）、160ppm 群：11.449mg/kg/day（9.760～13.729mg/kg/day）であった。全投与期間における各群の平均被験物質摂取量は、雄の 20ppm 群、40ppm 群及び 80ppm 群と雌の 40ppm 群と 80ppm 群では設定用量比（公比 2.0）にほぼ対応していたが、雌の 160ppm 群では僅かに低い値を示した。

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。

雄では白血球数の減少が 40ppm 群と 80ppm 群でみられた。

雌では MCV、MCH 及び白血球数の減少が 160ppm 群でみられた。その他、白血球分類で好酸球の減少が 80ppm 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－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 GPT 活性の低下が全投与群で、総コレステロールの減少、並びに GOT 活性と LDH 活性の低下が 40ppm 群と 80ppm 群で（40ppm 群の GOT 活性と LDH 活性においては、この群の中に測定値の非常に大きなものが数例含まれており、平均値は上昇していたが統計学的には有意な低下を示した。）、総蛋白の減少が 80ppm 群でみられた。その他、尿素窒素の減少が 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。

雌ではナトリウムの増加が全投与群で、A/G 比と無機リンの増加が 80ppm 群と 160ppm 群で、総ビリルビンと尿素窒素の増加、GOT 活性、ALP 活性及び CPK 活性の上昇、並びにグルコースとトリグリセライドの減少が 160ppm 群でみられた。その他、カリウムの増加が 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。

Ⅲ－9 尿検査

尿検査の結果を APPENDIX H 1,2 に示した。

雄では蛋白の陽性度の増加とケトン体の陽性例の増加、並びに pH の低下が全投与群でみられた。

雌では蛋白の陽性度の増加が全投与群でみられた。その他、pH の低下が 80ppm 群でみられた。

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。

雄では被験物質投与により増加したと思われる所見はみられなかった。

雌では肝臓の結節が投与群で増加し、その発生例数は、対照群：10/50 例、40ppm 群：

17/50 例、80ppm 群：19/50 例、160ppm 群：24/50 例と投与濃度に依存して増加した。

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。

雌雄とも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。

なお、雄では全投与群で解剖時体重が対照群より低く、これに伴って、20ppm 群で心臓の実重量の低値が、40ppm 群で心臓、肺、腎臓及び肝臓の実重量の低値と脳の体重比の高値が、80ppm 群で心臓、肺、腎臓、脾臓及び肝臓の実重量の低値と脳、副腎、精巣、心臓、肺及び腎臓の体重比の高値がみられた。

雌では全投与群で解剖時体重が対照群より低く、これに伴って、40ppm 群で心臓と肝臓の実重量の低値と副腎、肺、腎臓及び脳の体重比の高値が、80ppm 群で心臓、肺、脾臓、肝臓及び脳の実重量の低値と副腎、卵巣、心臓、肺、腎臓及び脳の体重比の高値が、160ppm 群で副腎、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓及び脳の実重量の低値と副腎、心臓、肺、腎臓及び脳の体重比の高値がみられた。なお、卵巣の 160ppm 群の実重量は、対照群と比べ平均値は高値を示していたが、これは実重量の非常に大きなものが数例含まれていたためであり、統計学的には有意な低値を示した。

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：17/50 例、20ppm 群：12/50 例、40ppm 群：8/50 例、80ppm 群：6/50 例) は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 40ppm 群と 80ppm 群に有意な減少が認められた。また、肝細胞癌の発生 (対照群：21/50 例、20ppm 群：14/50 例、40ppm 群：9/50 例、80ppm 群：4/50 例) は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 40ppm 群と 80ppm 群に有意な減少が認められた。さらに、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生 (対照群：34/50 例、20ppm 群：24/50 例、40ppm

群：15/50 例、80ppm 群：10/50 例）も Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で全投与群に有意な減少が認められた。

雌の肝細胞腺腫の発生（対照群：5/50 例、40ppm 群：6/50 例、80ppm 群：2/50 例、160ppm 群：14/50 例）は Peto 検定（有病率法、有病率法＋死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 160ppm 群に有意な増加が認められた。また、肝細胞癌の発生（対照群：2/50 例、40ppm 群：2/50 例、80ppm 群：1/50 例、160ppm 群：4/50 例）は Peto 検定（死亡率法）で増加傾向を示した。なお肝細胞腺腫と肝細胞癌の合わせた発生（対照群：7/50 例、40ppm 群：8/50 例、80ppm 群：3/50 例、160ppm 群：17/50 例）は Peto 検定（有病率法、死亡率法、有病率法＋死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 160ppm 群に有意な増加が認められた。さらに、血管腫の発生（対照群：0/50 例、40ppm 群：0/50 例、80ppm 群：1/50 例、160ppm 群：3/50 例）は Peto 検定（有病率法、有病率法＋死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、血管腫と血管肉腫を合わせた発生（対照群：1/50 例、40ppm 群：2/50 例、80ppm 群：1/50 例、160ppm 群：4/50 例）は Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示した。

<リンパ節>

雌の悪性リンパ腫の発生（対照群：22/50 例、40ppm 群：14/50 例、80ppm 群：13/50 例、160ppm 群：7/50 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 80ppm 群と 160ppm 群に有意な減少が認められた。また、雌の全臓器の悪性リンパ腫を集計した例数（対照群：26/50 例、40ppm 群：20/50 例、80ppm 群：19/50 例、160ppm 群：13/50 例）も Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 160ppm 群に有意な減少が認められた。

<下垂体>

雌の腺腫の発生（対照群：10/50 例、40ppm 群：3/50 例、80ppm 群：3/50 例、160ppm 群：0/50 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で全投与群に有意な減少が認められた。

その他、雄の肺に細気管支－肺胞上皮癌の発生（対照群：12/50 例、20ppm 群：10/50 例、40ppm 群：4/50 例、80ppm 群：5/50 例）が Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 40ppm 群に有意な減少が認められた。しかし、この腫瘍の発生は全投与群とも当センターのヒストリカルコントロールデータ（文献 6）（細気管支－肺胞上皮癌：平均：10.0%、試験単位での発生率：0～22%）の範囲であり、むしろ対照群が高い傾向にあった。また、細気管支－肺胞上皮腺腫と細気管支－肺胞上皮癌を合わせた発生（対照群：17/50 例、20ppm 群：15/50 例、40ppm 群：6/50 例、80ppm 群：11/50 例）は Fisher 検定で 40ppm 群に有意な減少が認められたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。以上のことから、

上記の腫瘍性病変の発生は統計学的に有意差を示したが、被験物質の投与による影響とは考えられなかった。また、雄の脾臓の血管腫と血管肉腫を合わせた発生（対照群：3/50 例、20ppm 群：2/50 例、40ppm 群：0/50 例、80ppm 群：0/50 例）が Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示したが、血管腫、血管肉腫いずれの発生数も少なく、また、当センターにおけるそれぞれのヒストリカルコントロールデータ（血管腫：平均 1.8%、試験単位での発生率：0～10%；血管肉腫：平均 2.2%、試験単位での発生率：0～6%）の範囲以内であることから、被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

－非腫瘍性病変－

主な非腫瘍性病変を TABLE 12 に示した。

<鼻腔>

雄では嗅上皮のエオジン好性変化が 40ppm 群と 80ppm 群で減少し、呼吸上皮のエオジン好性変化、嗅上皮の呼吸上皮化生及び鼻腺の呼吸上皮化生がいずれも全投与群で減少した。

雌では呼吸上皮のエオジン好性変化（対照群：25/50 例、40ppm 群：35/50 例、80ppm 群：39/50 例、160ppm 群：36/50 例）が 80ppm 群と 160ppm 群で、鼻腺の呼吸上皮化生（対照群：5/50 例、40ppm 群：18/50 例、80ppm 群：21/50 例、160ppm 群：15/50 例）が全投与群で増加した。

<脾臓>

雄では髄外造血が 80ppm 群で減少した。

雌では萎縮（対照群：0/50 例、40ppm 群：0/50 例、80ppm 群：0/50 例、160ppm 群：7/50 例）が 160ppm 群で増加し、髄外造血と濾胞増殖が 160ppm 群で減少した。

<歯>

異形成が雄の全投与群で減少した。

<胃>

鉍質沈着が雌の 160ppm 群で減少した。

<肝臓>

肉芽形成が雌の 80ppm 群と 160ppm 群で減少した。

<腎臓>

雄では腎盂上皮の剥離（対照群：0/50 例、20ppm 群：0/50 例、40ppm 群：4/50 例、80ppm

群：12/50 例）が 80ppm 群で増加し、皮質の鉍質沈着が 40ppm 群と 80ppm 群で減少した。
雌では硝子滴が 160ppm 群で減少した。

<精巣>

鉍質沈着が雄の 40ppm 群と 80ppm 群で減少した。

<脳>

鉍質沈着が雌の 160ppm 群で減少した。

その他、雄で包皮腺の導管の拡張、雌で腎臓の乳頭の鉍質沈着、腎盂上皮の剥離、下垂体の過形成、子宮の嚢胞状内膜増生で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。

雄では被験物質投与により増加した死因はみられなかった。

雌では組織学的に死因の確定ができなかった動物（対照群：0/24 例、40ppm 群：0/13 例、80ppm 群：0/21 例、160ppm 群：8/27 例）が 160ppm 群に多くみられた。

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

雄雌とも投与群の生存率は対照群に比べ、生存率の低下はみられず、雄の 40ppm 群と 80ppm 群、雌の 40ppm 群ではむしろ生存率が高値であった。また、一般状態の観察でも、被験物質投与による特徴的な変化はみられなかった。

摂水量は、全投与群で投与濃度に対応して著しい低値がみられた。これは被験物質混合飲水の飲水忌避によるものと考えられた。これに伴い、摂餌量も全投与群でほぼ全投与期間にわたり、投与濃度に対応して低い値で推移した。また、体重値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みられた。特に雄の 80ppm 群と雌の全投与群で著しい体重増加の抑制がみられた。

動物の死因については、雌雄とも被験物質投与による特徴はみられなかった。雌の 160ppm 群において組織学的に死因の確定ができなかった動物 8 例（7 例死亡、1 例瀕死）について個体ごとに一般状態、死亡時期、体重、摂餌量及び摂水量を調べ検討した。一般状態では生存した期間の後期に消耗性の変化がみられたが、その他特徴的な変化はみられなかった。死亡時期も他の例と比べて著しく早まっていた（8 例の死亡時期の平均：92 週（範囲：77～104 週））。また、体重も 160ppm 群の平均値とほぼ同様に推移したが、生存終期に減少し、死亡時の体重は平均で 13.5g（範囲：12.5～14.4g）と低値を示していた。摂餌量と摂水量でも対照群と比較すると低値であったものの、160ppm 群の平均値との間に著しい差はみられなかった。病理組織学的に死因の確定ができなかった 8 例については、一般状態等その他のデータからも特徴的な死因は見出せなかった。以上のことから総合的に考えると、160ppm 群の動物は全体に栄養状態が悪かったことより、個体によっては老齢になって衰弱し、死に至ったと考えられた。

IV-2 腫瘍性病変

雄の肝細胞腺腫の発生（対照群：17/50 例、20ppm 群：12/50 例、40ppm 群：8/50 例、80ppm 群：6/50 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 40ppm 群と 80ppm 群に有意な減少が認められた。また、肝細胞癌の発生（対照群：21/50 例、20ppm 群：14/50 例、40ppm 群：9/50 例、80ppm 群：4/50 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 40ppm 群と 80ppm 群に有意な減少が認められた。さらに、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生（対照群：34/50 例、20ppm 群：24/50 例、40ppm 群：15/50 例、80ppm 群：10/50 例）も Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で全ての投与群に有意な減少が認められた。マウスの肝細胞由来の腫瘍の発生減少が制限給餌や体重の増加抑制によって起きることが報告されており（文献 7、8）、本試験でも全投与群の解剖時体重が対照群に比べて低値であり、上記の肝細胞腫瘍の発生減少はヒドラジン-水加物の投与による体重増加抑制に関連するものと考えられた。

雌については肝細胞腺腫の発生（対照群：5/50 例、40ppm 群：6/50 例、80ppm 群：2/50 例、160ppm 群：14/50 例）は Peto 検定（有病率法、有病率法＋死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 160ppm 群に有意な増加が認められた。また、肝細胞癌の発生（対照群：2/50 例、40ppm 群：2/50 例、80ppm 群：1/50 例、160ppm 群：4/50 例）は Peto 検定（死亡率法）で増加傾向を示した。さらに、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生（対照群：7/50 例、40ppm 群：8/50 例、80ppm 群：3/50 例、160ppm 群：17/50 例）は Peto 検定（有病率法、死亡率法、有病率法＋死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 160ppm 群に有意な増加が認められた。160ppm 群の肝細胞腺腫の発生率は、当センターで行われた試験におけるヒストリカルコントロールデータの発生率 2～10%（45/899 例、平均 5.0%）の最高発生率を越えており、ヒドラジン－水加物投与による明らかな発生増加と考えられた。一方、肝細胞癌の発生率は、ヒストリカルコントロールデータの発生率 0～8%（20/899 例、平均 2.2%）の範囲内であり、ヒドラジン－水加物投与による明らかな発生増加とは言えなかった。しかし、対照群で肝細胞癌の発生率が 8.0%を示したのはヒストリカルコントロールデータ 18 試験のうち 1 試験のみであり稀なケースであるといえる。また、マウスの肝細胞腺腫は肝細胞癌へ移行することが知られており（文献 9）、被験物質の投与により僅かであるが発生増加したものと考えられた。これらのことから、ヒドラジン－水加物の投与により肝細胞腺腫の明らかな発生増加と肝細胞癌の僅かな発生増加を示したと判断した。これは、「がん原性を示す証拠」と考えられた。なお、血管腫の発生（対照群：0/50 例、40ppm 群：0/50 例、80ppm 群：1/50 例、160ppm 群：3/50 例）は Peto 検定（有病率法、有病率法＋死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、血管腫と血管肉腫を合わせた発生（対照群：1/50 例、40ppm 群：2/50 例、80ppm 群：1/50 例、160ppm 群：4/50 例）は Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示した。160ppm 群の血管腫の発生率は、ヒストリカルコントロールデータの発生率 0～2%（3/899 例、平均 0.3%）の最高発生率を越えており、ヒドラジン－水加物投与による発生を否定できなかった。しかし、その増加の程度は僅かであり、被験物質の影響とするには不十分と思われた。

以上のことから雌では肝臓に、肝細胞腺腫の明らかな発生増加と肝細胞癌の僅かな増加が認められ、ヒドラジン－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、雌における下垂体の腺腫の発生（対照群：10/50 例、40ppm 群：3/50 例、80ppm 群：3/50 例、160ppm 群：0/50 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で全ての投与群に有意な減少が認められた。マウスの下垂体腺腫の発生減少は体重の増加抑制によって起きることが報告されており（文献 8）、本試験でも全投与群の解剖時体重が対照群に比べて低値であり、下垂体腺腫の発生減少はヒドラジン－水加物の投与による体重増加抑制に起因するものと考えられた。また、リンパ節の悪性リンパ腫の発生（対照群：22/50 例、40ppm 群：14/50 例、80ppm 群：13/50 例、160ppm 群：7/50 例）が

Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 80ppm 群と 160ppm 群に有意な減少が認められた。また、全臓器の悪性リンパ腫の発生（対照群：26/50 例、40ppm 群：20/50 例、80ppm 群：19/50 例、160ppm 群：13/50 例）が Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。リンパ節の悪性リンパ腫の発生率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 12～42%（225/899 例、平均 25.0%）の範囲内であり、被験物質投与による影響とは言えなかった。

IV-3 非腫瘍性病変

雄では腎臓の腎盂上皮の剥離が 80ppm 群で増加を示し、ヒドラジンー水加物投与による腎臓への影響が示唆された。しかし、この変化が腫瘍へ進展することはなかった。雌でも腎臓の腎盂上皮の剥離が 40ppm 群と 80ppm 群で増加したが、投与濃度に対応した変化ではないことから、被験物質の投与によって増加したとは言えなかった。

雌では脾臓の萎縮が 160ppm 群で増加を示し、ヒドラジンー水加物の投与による体重増加抑制に起因するものと考えられた。また、鼻腔で鼻腺の呼吸上皮化生が全投与群で増加し、呼吸上皮のエオジン好性変化が 80ppm 群と 160ppm 群で増加した。

その他、投与群と対照群の間に投与量に対応した発生の差が認められ、ヒドラジンー水加物投与による影響を否定できない発生減少の所見が、鼻腔（雄に呼吸上皮のエオジン好性変化、嗅上皮の呼吸上皮化生、鼻腺の呼吸上皮化生及び嗅上皮のエオジン好性変化）、脾臓（雄に髄外造血、雌に髄外造血と濾胞増殖）、歯（雄に異形成）、肝臓（雌に肉芽形成）、腎臓（雄に皮質の鉍質沈着、雌に硝子滴）、精巣（雄に鉍質沈着）、胃（雌に鉍質沈着）及び脳（雌に鉍質沈着）にみられた。

これらの所見の殆どは通常加齢性病変として認められる変化である。前述のとおりヒドラジンー水加物の投与により、雌雄とも全投与群で解剖時体重の体重増加抑制を認めたが、これらの病変が制限給餌や体重増加抑制に伴って減少するという報告は現在のところ見当たらず、被験物質の投与との関係は不明である。一方、発生増加を示した雌の鼻腔の病変は雄とは相反する変化を示したが、これらについてはホルモンや代謝の違いが推察されるものの、それらを証明する報告は得られなかった。

IV-4 血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査

血液学的検査では、被験物質の投与による影響を示唆する変化として、白血球数の減少が雄の 40ppm 群と 80ppm 群及び雌の 160ppm 群で認められた。また、MCV と MCH の軽度な減少が雌の 160ppm 群で認められた。

血液生化学的検査では、被験物質の投与による腎臓等への影響を示唆する変化として、雌ではナトリウムの増加が全投与群で、無機リンの増加が 80ppm 群と 160ppm 群で、尿素窒素の増加が 160ppm 群でそれぞれ認められた。また、肝臓等への影響を示す変化として、雌では総ビリルビンの増加、並びに GOT 活性と ALP 活性の上昇が 160ppm 群で認められ

た。これらは、肝臓腫瘍の増加と関連した変化と考えられた。しかし、雄ではその逆に GPT 活性の低下が全投与群で、GOT 活性と LDH 活性の低下が 40ppm 群と 80ppm 群でみられたがこの原因は明らかではなかった。さらに、摂餌量の減少や体重の増加抑制等の影響と思われる変化として、雄では総コレステロールの減少が 40ppm 群と 80ppm 群で、総蛋白の減少が 80ppm 群で、雌ではグルコースとトリグリセライドの減少が 160ppm 群で認められた。

尿検査では、蛋白の陽性度の増加が雌雄の全投与群に認められた。また、摂餌量や摂水量の減少による影響と思われる変化として、雄で pH の低下、ケトン体の陽性度の増加が全投与群で認められた。

IV-5 他の文献との比較

マウスを用いたヒドラジーン水加物の飲水投与による慢性毒性試験は、Steinhoff ら (1990) (文献 10) によって報告されている。

Steinhoff ら (1990) は、NMRI マウス 4 群、雌雄各 50 匹/群、計 400 匹の動物を用いて飲水に 0、2、10 及び 50ppm (mg/L) の濃度にヒドラジーン水加物を溶解し、2 年間にわたる慢性毒性試験を実施した。その結果、雌雄とも 50ppm 群で著しい体重増加の抑制がみられ、生存率では対照群と比較して雄では差はみられず、雌では 50ppm 群が最も高い生存率を示したが、大きな差ではなかった。摂水量では、対照群と比較し、雌雄とも各投与群で投与濃度に対応した減少が認められた。しかし、ヒドラジーン水加物の飲水投与による腫瘍性病変の発生増加は雌雄ともに認められなかったと報告している。

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、著しい体重増加の抑制がみられたことでは一致していたが、腫瘍発生については異なっていた。Steinhoff らの報告では腫瘍発生の増加はみられなかったとしているのに対し、当センターの結果では雌で肝細胞腺腫の明らかな発生増加と肝細胞腺癌の僅かな発生増加がみられた。このような結果の差は第一に使用動物の系統差によるものと考えられた。また、Steinhoff らの試験の被験物質摂取量の平均は、50ppm 群で、雄 6mg/kg/day、雌で 5mg/kg/day であった。一方、当センターの試験で腫瘍の発生した雌の 160ppm 群の被験物質摂取量は 11.46mg/kg/day、80ppm 群では 6.8 mg/kg/day であった。このことから、当センター試験の 80ppm 群における被験物質摂取量にほぼ相当し、当センターの結果でも、雌の 80ppm 群では肝臓腫瘍の増加はみられず、Steinhoff らと当センターの結果の差は、投与用量の差にあると考えられた。

V 結論

Crj : BDF1 マウス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、雄マウスにはヒドラジーン水加物の投与による腫瘍の発生増加を示す証拠は認められなかった。雌マウスには肝細胞腺腫の明らかな発生増加と肝細胞癌の僅かな増加が認められ、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。

VI 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. 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.

8. 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.
9. Frith, C.H. and Ward, J.M. (1980)
A morphologic classification of proliferative and neoplastic hepatic lesions in mice.
Journal of Environmental Pathology and Toxicology, 3, 329-351.
10. Steinhoff, D., Mohr, U. and Schmidt, W.M. (1990)
On the question of the carcinogenic action of hydrazine - evaluation on the basis of new experimental results.
Experimental Pathology, 39, 1-9.