

1,3,5,7-テトラアザトリシクロ [3.3.1.1<sup>3,7</sup>] デカンの  
ラット及び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

ラット/0224；マウス/0225

CAS No. 100 - 97 - 0

平成9年6月27日

中央労働災害防止協会  
日本バイオアッセイ研究センター

1,3,5,7-テトラアザトリシクロ [3.3.1.1<sup>3,7</sup>] デカンの  
ラット及び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

ラット/0224；マウス/0225

本 文

要約	.....1
I 試験材料	
I - 1 被験物質の性状等	
I - 1 - 1 名称と別名	.....2
I - 1 - 2 構造式、分子量	.....2
I - 1 - 3 物理化学的性状等	.....2
I - 2 被験物質の使用ロット等	.....3
I - 3 被験物質の同一性・安定性	
I - 3 - 1 同一性	.....3
I - 3 - 2 安定性	.....3
I - 4 試験動物	.....4
II 試験方法	
II - 1 投与	
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	.....5
II - 1 - 3 被験物質の調製方法	.....5
II - 1 - 4 調製被験物質の濃度測定	.....5
II - 1 - 5 調製被験物質の安定性	.....6
II - 1 - 6 被験物質の摂取量	.....6
II - 2 動物管理	
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	.....6
II - 2 - 3 飼育条件	.....7
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	.....7
II - 3 - 2 体重測定	.....7
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	.....8
II - 3 - 8 病理学的検査	.....8

II - 4	数値処理と統計学的方法	
II - 4 - 1	数値の取り扱いと表示	.....9
II - 4 - 2	母数の取り扱い	.....10
II - 4 - 3	統計方法	.....10
II - 5	試資料の保管	.....11
III	試験成績	
III - 1	ラットを用いたがん原性試験 (0224)	
III - 1 - 1	動物の状態観察	.....12
III - 1 - 2	血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査	.....13
III - 1 - 3	病理学的検査	.....14
III - 2	マウスを用いたがん原性試験 (0225)	
III - 2 - 1	動物の状態観察	.....18
III - 2 - 2	血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査	.....19
III - 2 - 3	病理学的検査	.....20
IV	考察	
IV - 1	ラット	
IV - 1 - 1	動物の状態観察	.....23
IV - 1 - 2	血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査	.....23
IV - 1 - 3	病理学的検査	.....23
IV - 2	マウス	
IV - 2 - 1	動物の状態観察	.....26
IV - 2 - 2	血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査	.....26
IV - 2 - 3	病理学的検査	.....26
V	結論	.....28
VI	文献	.....29

## TABLES

- TABLE 1 EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS  
IN THE DRINKING WATER STUDIES OF UROTROPIN
- TABLE 2 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT  
(TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 3 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT  
(TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 4 INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION  
IN MALE RAT
- TABLE 5 INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION  
IN FEMALE RAT
- TABLE 6 WATER CONSUMPTION IN MALE RAT (TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 7 WATER CONSUMPTION IN FEMALE RAT (TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 8 FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT (TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 9 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT (TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 10 NEOPLASTIC LESIONS INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS IN MALE RAT
- TABLE 11 NEOPLASTIC LESIONS INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS IN FEMALE RAT
- TABLE 12 NUMBER OF RATS WITH MINERALIZATION OF HEART
- TABLE 13 NUMBER OF RATS WITH MINERALIZATION OF KIDNEY (CORTEX)
- TABLE 14 CAUSE OF DEATH IN RATS
- TABLE 15 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE  
(TWO-YEAR STUDY)
- TABLE 16 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE  
(TWO-YEAR STUDY)

## TABLES (CONTINUE)

TABLE 17 INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION  
IN MALE MOUSE

TABLE 18 INCIDENCE OF EXTERNAL AND INTERNAL MASS IN CLINICAL OBSERVATION  
IN FEMALE MOUSE

TABLE 19 WATER CONSUMPTION IN MALE MOUSE (TWO-YEAR STUDY)

TABLE 20 WATER CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE (TWO-YEAR STUDY)

TABLE 21 FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE (TWO-YEAR STUDY)

TABLE 22 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE (TWO-YEAR STUDY)

TABLE 23 NEOPLASTIC LESIONS INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS IN MALE MOUSE

TABLE 24 NEOPLASTIC LESIONS INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS IN FEMALE MOUSE

TABLE 25 NUMBER OF MICE WITH SELECTED LESIONS OF NASAL CAVITY

TABLE 26 CAUSE OF DEATH IN MICE



## FIGURES

FIGURE 1 SURVIVAL ANIMAL RATE : RAT : MALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 2 SURVIVAL ANIMAL RATE : RAT : FEMALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 3 BODY WEIGHT CHANGES : RAT : MALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 4 BODY WEIGHT CHANGES : RAT : FEMALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 5 WATER CONSUMPTION : RAT : MALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 6 WATER CONSUMPTION : RAT : FEMALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 7 FOOD CONSUMPTION : RAT : MALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 8 FOOD CONSUMPTION : RAT : FEMALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 9 SURVIVAL ANIMAL RATE : MOUSE : MALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 10 SURVIVAL ANIMAL RATE : MOUSE : FEMALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 11 BODY WEIGHT CHANGES : MOUSE : MALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 12 BODY WEIGHT CHANGES : MOUSE : FEMALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 13 WATER CONSUMPTION : MOUSE : MALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 14 WATER CONSUMPTION : MOUSE : FEMALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 15 FOOD CONSUMPTION : MOUSE : MALE (TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 16 FOOD CONSUMPTION : MOUSE : FEMALE (TWO-YEAR STUDY)

## PHOTOGRAPHS

PHOTOGRAPH 1 HEART, MINERALIZATION,  
RAT, FEMALE, 30000ppm, ANIMAL NO. 0224-2341

PHOTOGRAPH 2 KIDNEY, MINERALIZATION : CORTEX  
RAT, FEMALE, 30000ppm, ANIMAL NO. 0224-2310

PHOTOGRAPH 3 MAMMARY GLAND, ADENOCARCINOMA  
MOUSE, FEMALE, 40000ppm, ANIMAL NO. 0225-2339

PHOTOGRAPH 4 NASAL CAVITY (LEVEL 3),  
DUCT ECTASIA : OLFACTORY GLAND  
MOUSE, MALE, 40000ppm, ANIMAL NO. 0225-1312



## APPENDIXES

APPENDIX A 1	CLINICAL OBSERVATION ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE
APPENDIX A 2	CLINICAL OBSERVATION ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE
APPENDIX A 3	CLINICAL OBSERVATION ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE
APPENDIX A 4	CLINICAL OBSERVATION ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE
APPENDIX B 1	BODY WEIGHT CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE
APPENDIX B 2	BODY WEIGHT CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE
APPENDIX B 3	BODY WEIGHT CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE
APPENDIX B 4	BODY WEIGHT CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE
APPENDIX C 1	WATER CONSUMPTION CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE
APPENDIX C 2	WATER CONSUMPTION CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE
APPENDIX C 3	WATER CONSUMPTION CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE
APPENDIX C 4	WATER CONSUMPTION CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE
APPENDIX D 1	FOOD CONSUMPTION CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE
APPENDIX D 2	FOOD CONSUMPTION CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE
APPENDIX D 3	FOOD CONSUMPTION CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE
APPENDIX D 4	FOOD CONSUMPTION CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE
APPENDIX E 1	CHEMICAL INTAKE CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE
APPENDIX E 2	CHEMICAL INTAKE CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE
APPENDIX E 3	CHEMICAL INTAKE CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE
APPENDIX E 4	CHEMICAL INTAKE CHANGES ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE

## APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX F 1	HEMATOLOGY ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE
APPENDIX F 2	HEMATOLOGY ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE
APPENDIX F 3	HEMATOLOGY ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE
APPENDIX F 4	HEMATOLOGY ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE
APPENDIX G 1	BIOCHEMISTRY ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE
APPENDIX G 2	BIOCHEMISTRY ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE
APPENDIX G 3	BIOCHEMISTRY ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE
APPENDIX G 4	BIOCHEMISTRY ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE
APPENDIX H 1	URINALYSIS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE
APPENDIX H 2	URINALYSIS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE
APPENDIX H 3	URINALYSIS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE
APPENDIX H 4	URINALYSIS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE
APPENDIX I 1	GROSS FINDINGS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
APPENDIX I 2	GROSS FINDINGS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
APPENDIX I 3	GROSS FINDINGS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE : SACRIFICED ANIMALS
APPENDIX I 4	GROSS FINDINGS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS
APPENDIX I 5	GROSS FINDINGS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
APPENDIX I 6	GROSS FINDINGS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
APPENDIX I 7	GROSS FINDINGS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE : SACRIFICED ANIMALS
APPENDIX I 8	GROSS FINDINGS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS

## APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX J 1	ORGAN WEIGHT ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) , ABSOLUTE RAT : MALE
APPENDIX J 2	ORGAN WEIGHT ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) , ABSOLUTE RAT : FEMALE
APPENDIX J 3	ORGAN WEIGHT ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) , ABSOLUTE MOUSE : MALE
APPENDIX J 4	ORGAN WEIGHT ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) , ABSOLUTE MOUSE : FEMALE
APPENDIX K 1	ORGAN WEIGHT ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) , RELATIVE RAT : MALE
APPENDIX K 2	ORGAN WEIGHT ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) , RELATIVE RAT : FEMALE
APPENDIX K 3	ORGAN WEIGHT ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) , RELATIVE MOUSE : MALE
APPENDIX K 4	ORGAN WEIGHT ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) , RELATIVE MOUSE : FEMALE
APPENDIX L 1	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
APPENDIX L 2	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
APPENDIX L 3	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE SACRIFICED ANIMALS
APPENDIX L 4	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS
APPENDIX L 5	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
APPENDIX L 6	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
APPENDIX L 7	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE : SACRIFICED ANIMALS
APPENDIX L 8	HISTOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS
APPENDIX M 1	NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED RAT : MALE
APPENDIX M 2	NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED RAT : FEMALE
APPENDIX M 3	NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED MOUSE : MALE
APPENDIX M 4	NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED MOUSE : FEMALE

## APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX N 1	HISTOLOGICAL FINDINGS : NEOPLASTIC LESIONS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE
APPENDIX N 2	HISTOLOGICAL FINDINGS : NEOPLASTIC LESIONS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE
APPENDIX N 3	HISTOLOGICAL FINDINGS : NEOPLASTIC LESIONS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE
APPENDIX N 4	HISTOLOGICAL FINDINGS : NEOPLASTIC LESIONS ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE
APPENDIX O 1	NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS RAT : MALE
APPENDIX O 2	NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS RAT : FEMALE
APPENDIX O 3	NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS MOUSE : MALE
APPENDIX O 4	NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS MOUSE : FEMALE
APPENDIX P 1	HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
APPENDIX P 2	HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
APPENDIX P 3	HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : MALE : SACRIFICED ANIMALS
APPENDIX P 4	HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) RAT : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS
APPENDIX P 5	HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
APPENDIX P 6	HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE : DEAD AND MORIBUND ANIMALS
APPENDIX P 7	HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : MALE : SACRIFICED ANIMALS
APPENDIX P 8	HISTOLOGICAL FINDINGS : METASTASIS OF TUMOR ( TWO-YEAR STUDY : SUMMARY ) MOUSE : FEMALE : SACRIFICED ANIMALS

## APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX Q 1	IDENTITY OF UROTROPIN ( TWO-YEAR STUDIES)
APPENDIX Q 2	STABILITY OF UROTROPIN ( TWO-YEAR STUDIES)
APPENDIX Q 3	CONCENTRATION OF UROTROPIN IN DRINKING WATER ( TWO-YEAR STUDY : RAT)
APPENDIX Q 4	CONCENTRATION OF UROTROPIN IN DRINKING WATER ( TWO-YEAR STUDY : MOUSE)
APPENDIX Q 5	STABILITY OF UROTROPIN IN DRINKING WATER ( TWO-YEAR STUDIES)
APPENDIX R 1	METHODS FOR HEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY AND URINALYSIS
APPENDIX R 2	UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY

## 要約

ウロトロピン(1,3,5,7-テトラアザトリツカ[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]テカ)のがん原性を検索する目的でラットとマウスを用いて経口(混水)投与による2年間(104週間)の試験を実施した。

試験にはF344/DuCrj(Fischer)ラットとCrj:BDF<sub>1</sub>マウスを用いた。被験物質投与群3群と対照群1群の計4群の構成で、雌雄各群とも50匹とし、合計ラット400匹、マウス400匹を用いた。投与は、ウロトロピンを各投与濃度に希釈調製した飲水の自由摂取で行った。投与濃度は、ラットは雌雄とも7500ppm、15000ppm、30000ppm(公比2.0)、マウスは雌雄とも10000ppm、20000ppm、40000ppm(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。

ラットでは、投与群の生存率は対照群と比較して雄の30000ppm群でやや低下した。雌では、15000ppm及び30000ppm群で低下した。雌雄とも腫瘍性病変の顕著な発生増加は認められなかった。非腫瘍性病変は、死亡/瀕死例の心臓及び腎臓に鉍質沈着がみられ、死亡率増加の原因になったと考えられた。

マウスでは、雌雄とも投与群の生存率は対照群と比較して特に顕著な差を示さなかった。腫瘍性病変は、雌の乳腺の腺癌及び腺腫の発生が統計的に増加傾向を示した。非腫瘍性病変は、雌雄とも嗅腺の導管拡張が認められ、これに加えて加齢性病変である雌雄の粘膜固有層の腺の呼吸上皮化生、雄の嗅上皮の呼吸上皮化生及び雌の嗅上皮のエオジン好性変化の発生増加が認められた。

以上のことから、ウロトロピンの投与によりCrj:BDF<sub>1</sub>マウスの雌に乳腺の腺癌及び腺腫の発生の増加傾向が認められ、ウロトロピンのCrj:BDF<sub>1</sub>マウスの雌に対するがん原性が示された。ただし、その増加の程度は僅かであった。雄のCrj:BDF<sub>1</sub>マウス及び雌雄のF344/DuCrj(Fischer)ラットには顕著な腫瘍の発生増加は認められず、がん原性は示されなかった。

## 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 : Urotropin

ウロトピン

IUPAC名 : 1,3,5,7-Tetraazatricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decane

1,3,5,7-テトラアザトリシクロ[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]デカン

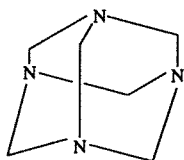
別 名 : Hexamethylenetetramine(ヘキサメチレンテトラミン)

Hexamine(ヘキサミン)

Methenamine(メテナミン)

CAS.No. : 100-97-0

#### I - 1 - 2 構造式、分子量



$C_6H_{12}N_4$

分子量 : 140.19

#### I - 1 - 3 物理化学的性状等 (文献 1,2,3)

性 状 : ほとんど無臭の白色の結晶性粉末か、無色の光沢ある結晶でわずかな甘味と苦みを有する。

昇 華 点 : 263℃ (一部分解)

融 点 : 加圧下で285℃以上

比 重 : 1.270 (25℃)

溶 解 性 : 水、メタノール、エタノール、クロロホルムに可溶、ベンゼン、アセトン、エーテルに難溶、石油エーテルに不溶

保存条件 : 火気のない場所に直射日光を避けて密閉容器で保存



I - 2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号：TWH2454(1992年11月 9日～1993年 3月29日)

APR5276(1993年 3月25日～1994年 1月20日)

APF5582(1994年 1月17日～1994年 3月21日)

KCR6018(1994年 3月16日～1994年12月 5日)

製 造 元：和光純薬工業株式会社

グ レ ー ド：試薬特級

純 度：99%以上

I - 3 被験物質の同一性・安定性

I - 3 - 1 同一性

被験物質の同一性は、使用ロットごとに被験物質のマススペクトル及び赤外吸収スペクトルを測定し、文献値(文献 4,5)と比較することにより確認した。

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、被験物質を使用ロットごとの投与開始前及び投与終了後にガスクロマトグラフを用いて分析し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

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)より購入したF344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)及びCrj:BDF<sub>1</sub>マウス(SPF)の雌雄を使用した。

ラット、マウスとも雌雄各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、発育順調で一般状態の観察所見に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各200匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:120~136g、雌:94~106g/マウス雄:21.1~23.9g、雌:17.0~19.3g)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

経口投与とした。すなわち、褐色遮光のガラス製給水瓶を用い、ウロトロピンを混合した飲料水の自由摂取により、104週間解剖直前まで連続投与した。なお、対照群の動物には飲料水のみを与えた。

#### II - 1 - 2 投与濃度

投与濃度は予備試験である13週間試験(文献 6)の結果に基づき決定した。ラットでは雌雄とも7500ppm、15000ppm、30000ppm(公比2.0)、マウスでは雌雄とも10000ppm、20000ppm、40000ppm(公比2.0)とした。

#### II - 1 - 3 被験物質の調製方法

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混合して各設定濃度になるように希釈調製した。なお、各試験における濃度の表示は、ppm(重量対重量比)とした。また、調製頻度は給水瓶交換に合わせて週2回とした。

#### II - 1 - 4 調製被験物質の濃度測定

各投与濃度に調製された被験物質(調製被験物質)の濃度は、3ヶ月ごとにガスクロマトグラフを用いて測定した。その結果、各群の調製濃度は設定濃度に対し、ラットの試験では93.2~100.3%、マウスの試験では94.1~101.7%の範囲にあった。

それらの結果については、APPENDIX Q 3,4 に示した。

## II - 1 - 5 調製被験物質の安定性

調製被験物質の安定性の確認は、調製直後及び11日後に低用量及び高用量の調製被験物質の濃度をガスクロマトグラフを用いて測定し、それらのデータを比較することにより行った。その結果、それぞれ調製直後及び11日後の測定値に差はみられず、調製被験物質は11日間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 5 に示した。

## II - 1 - 6 被験物質の摂取量

各計測週(週内後半4日間)の摂水量より被験物質の体重当たりの摂取量(g/kg/day)を算出した。

それらの結果については、APPENDIX E 1~4 に示した。

## II - 2 動物管理

### II - 2 - 1 各群の使用動物数

ラット、マウスとも投与群3群及び対照群1群の計4群を設け、雌雄各群50匹の動物を用いた。

### 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体重の偏りを小さくする群分け方法(適正層別方式)により実施した(文献 7)。

試験期間中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識別し、またケージにも個体識別番号を付した。投与期間においては耳パンチにより識別し、またケージにも個体識別番号を付した。

なお、ラットとマウスはバリア区域(AC-1エリア)内の独立した室(ラット:107室、マウス:106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区別した。

## II - 2 - 3 飼育条件

動物は各試験ともに全飼育期間を通して、温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、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/時の環境下で飼育した。

動物は単飼ケージ(ステンレス製二連網ケージ、ラット:170W×294D×176H mm、マウス:112W×212D×120H mm)に収容し、ケージ交換は2週間ごとに実施した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)のCRF-1固型飼料(30KGy- $\gamma$ 線照射滅菌飼料)を使用し、全飼育期間を通して固型飼料給餌器により自由摂取させた。

飲水は、市水(秦野市水道局供給)をフィルターろ過及び紫外線照射して使用した。検疫期間は自動給水装置により、馴化及び投与期間は褐色遮光のガラス製給水瓶により自由摂取させた。また、給水瓶交換は週2回行った。

なお、飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)、夾雑物については(財)日本食品分析センターの分析データを使用ロットごとに入手し、飲水については(財)食品薬品安全センターの分析データを3ヶ月に1回入手し、それぞれ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

毎日1回、動物の生死及び瀕死の確認を主とした一般状態の観察を行った。また、週1回は詳細な一般状態の観察を行った。

### II - 3 - 2 体重測定

投与開始後14週までは週1回、それ以降は2週に1回、体重を測定した。なお、動物の死亡発見時及び切迫屠殺時も体重を測定した。

### II - 3 - 3 摂水量測定

投与開始後14週までは週1回(週内後半4日間)、それ以降は2週に1回(週内後半4日間)、給水量と残水量を個体別に測定し、その差を給水期間(原則として4日間)で除し、1日当たりの平均摂水量として算出した。

### II - 3 - 4 摂餌量測定

投与開始後14週までは週1回、それ以降は4週に1回、給餌量と残餌量を個体別に測定し、その差を給餌期間(原則として7日間)で除し、1日当たりの平均摂餌量として算出した。

### II - 3 - 5 血液学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、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動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて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より絶食(18時間以上)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

全動物について肉眼的に観察を行った。

## (2) 臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について 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。なお、鼻腔については切歯の後端(レベル 1)、切歯乳頭(レベル 2)、第一臼歯の前端(レベル 3)の3ヶ所で切り出し(横断)、検査した。

## II - 4 数値処理と統計学的方法

### II - 4 - 1 数値の取り扱いと表示

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、ラットでは小数点以下第1位を四捨五入して整数値で表示し、マウスではそのまま小数点以下第1位までを表示した。

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

摂餌量については g を単位とし、計測期間を通しての摂餌量を小数点以下第1位まで計測し、この値を計測期間の日数で除し、1日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

被験物質の摂取量は  $\text{g/kg}(\text{body weight})/\text{day}$  を単位とし、摂水量にウロトロピンの設定濃度を乗じ体重で除した値の小数点以下第4位を四捨五入して小数点以下第3位まで表示した。

臓器実重量については 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解剖時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第4位を四捨五入して、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 R 2 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る全動物を対象に計測し、欠測となったデータについては母数より除いた。

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とし、欠測となったデータについては母数より除いた。

尿検査は、投与最終週まで生存した動物を対象に行い、検査数を母数とした。

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、検査不能臓器をもつ動物数を除いたものを母数とした。

#### II - 4 - 3 統計方法

病理組織学的検査及び尿検査以外の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各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合にはDunnett(型)の多重比較検定を行った。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。

尿検査については $\chi^2$ 検定を行った。

また、病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード0として $\chi^2$ 検定を行った。腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto検定(文献8)、Cochran-Armitage検定、Fisher検定を行った。またPeto検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス(注)を用いて、死亡率法(コンテッ

クス3,4を付与された腫瘍についての検定)、有病率法(コンテックス0,1,2を付与された腫瘍についての検定)、死亡率法+有病率法(コンテックス0~4の総計で検定)を行った。

$\chi^2$ 検定とFisher検定は対照群と各投与群間の検定を行った。

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：定期解剖例にみつかった腫瘍

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、被験物質、その他本試験に係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。なお生標本、標本については品質が評価に耐え得る期間保管する。被験物質は安定性が確認されている期間、あるいは品質が評価に耐え得る期間保管する。

### Ⅲ 試験成績

#### Ⅲ-1 ラットを用いたがん原性試験(0224)

##### Ⅲ-1-1 動物の状態観察

###### (1) 生死状況

生死状況を TABLE 2,3 及び FIGURE 1,2 に示した。

投与群の生存率は、雄では30000ppm群で投与期間の末期に対照群と比較してやや低い生存率を示した。雌では7500ppm群で83週以降、15000ppm群で88週以降対照群と比較して低い生存率を示した。また30000ppm群では68週以降対照群と比較して徐々に低下し、最終計測週(104週)で28%という低い生存率を示した。

各群の104週における生存動物数(生存率)は、雄では対照群:38/50例(76%)、7500ppm群:39/50例(78%)、15000ppm群:34/50例(68%)、30000ppm群:30/50例(60%)、雌では対照群:47/50例(94%)、7500ppm群:39/50例(78%)、15000ppm群:35/50例(70%)、30000ppm群:14/50例(28%)であった。

###### (2) 一般状態

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

雄では4週、雌では3週に30000ppm群で被毛の着色(黄色)が観察された。その後、被毛が着色した動物は全投与群にわたって増加し、雄では15週、雌では16週以降投与群の全動物に観察された。

その他、ウロトロピンの投与による特徴的な所見は、死亡/瀕死例と定期解剖例のいずれにも認められなかった。また外部腫瘍と内部腫瘍の発生についても、ウロトロピンの各投与群と対照群との間に顕著な差は認められなかった。

###### (3) 体重

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

雌雄とも15000ppm及び30000ppm群でほぼ全投与期間にわたり対照群と比較して低値を示し、体重増加の抑制が認められた。その抑制率は対照群と比較して最大で雄では15000ppm群:6%、30000ppm群:12%、雌では15000ppm群:7%、30000ppm群:15%であった。

(4) 摂水量

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

雄の15000ppm群でほぼ全投与期間にわたり対照群と比較して高い傾向を示した。雌雄とも30000ppm群では、対照群と比較して初期に低く、その後は高い傾向を示した。

(5) 摂餌量

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

雌雄とも30000ppm群でほぼ全投与期間にわたり対照群と比較して低値を示した。対照群に対する30000ppm群の摂餌量は、雄:81~100%、雌:85~102%であった。

(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(g/kg/day)を APPENDIX E 1,2 に示した。

被験物質の1日当たりの摂取量は、雄では7500ppm群:0.300~0.934g/kg、15000ppm群:0.637~2.002g/kg、30000ppm群:1.380~3.835g/kg、雌では7500ppm群:0.440~1.214g/kg、15000ppm群:0.934~2.175g/kg、30000ppm群:2.112~4.531g/kgであった。

III - 1 - 2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

(1) 血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX F 1,2 に示した。

雌雄とも30000ppm群で血小板数の減少が認められた。

(2) 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。

雄の7500ppm群でLDH活性の上昇が認められた。30000ppm群でA/G比及びクロールの増加、GOT及びLDH活性の上昇、並びに総蛋白、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、カルシウム及び無機リンの減少が認められた。

雌の7500ppm群でカリウムの増加が認められた。30000ppm群でGOT及びGPT活性の上昇並びに尿素窒素の増加が認められた。

### (3) 尿検査

尿検査の結果を APPENDIX H 1,2 に示した。

雄の全投与群で蛋白の陽性度の増加、30000ppm群でpHの低下が認められた。

雌の15000ppm群でケトン体の陽性例の減少が認められた。また、30000ppm群でも生存動物数が少なく統計学的に有意差は示さなかったが、全匹(14/14例)にケトン体の陽性例の減少が認められた。

### III - 1 - 3 病理学的検査

#### (1) 剖検

解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX I 1~4 に示した。

死亡/瀕死例では、雌雄とも30000ppm群で心臓の白色斑(雄; 対照群: 0/12例、7500ppm群: 0/11例、15000ppm群: 0/16例、30000ppm群: 5/20例、雌; 対照群: 0/3例、7500ppm群: 0/11例、15000ppm群: 0/15例、30000ppm群: 6/36例)が観察された。

定期解剖例では、雄の30000ppm群で腎臓の顆粒状化(対照群: 20/38例、7500ppm群: 22/39例、15000ppm群: 15/34例、30000ppm群: 2/30例)が対照群と比較して減少した。

#### (2) 臓器重量

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

雄の15000ppm群で肺及び精巣の体重比の高値が認められた。30000ppm群で肺、精巣及び脳の体重比の高値並びに腎臓、肝臓及び心臓の実重量の低値が認められた。

雌の15000ppm群で腎臓及び副腎の体重比の高値が認められた。30000ppm群で腎臓、副腎、肺、心臓及び脳の体重比の高値が認められた。

#### (3) 病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果を APPENDIX L 1~4 に示した。腫瘍性病変の結果は、担腫瘍動物数と腫瘍数を APPENDIX M 1,2、腫瘍の種類別の発生数を APPENDIX N 1,2、統計解析(Peto検定、Cochran-Armitage検定、Fisher検定)を APPENDIX O 1,2、転移性病変を APPENDIX P 1~4 に示した。また統計解析の結果、有意差を示した腫瘍性病変については TABLE 10,11 に示した。

ウロトロビンの投与の影響とみられた変化を腫瘍性病変と非腫瘍性病変に分けて臓器別に示した。主な変化は雌雄とも心臓と腎臓の非腫瘍性病変(鉍質沈着)であった。

－腫瘍性病変－

<皮膚／付属器>

雄の皮脂腺腺腫の発生(対照群:0/50例、7500ppm群:0/50例、15000ppm群:0/50例、30000ppm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。

<下垂体>

雌の腺腫の発生(対照群:18/49例、7500ppm群:14/50例、15000ppm群:12/50例、30000ppm群:6/50例)が、Cochran-Armitage検定で投与量に対応した減少傾向を示し、Fisher検定でも30000ppm群で対照群と比較して減少を示した。なお、腺癌と腺腫を合わせた発生(対照群:19/49例、7500ppm群:14/50例、15000ppm群:14/50例、30000ppm群:7/50例)も同様にCochran-Armitage検定(減少傾向)とFisher検定(30000ppm群、減少)で統計学的に有意差を示したが、腺癌の発生数は低値で投与量に対応していないことから腺腫の発生低下のみがウロトロビンの投与による影響と考えられた。

－非腫瘍性病変－

<心臓>

鉍質沈着(雄;対照群:2/50例、7500ppm群:0/50例、15000ppm群:1/50例、30000ppm群:13/50例、雌;対照群:1/50例、7500ppm群:0/50例、15000ppm群:3/50例、30000ppm群:18/50例)が、雌雄の30000ppm群で増加した。特に、死亡／瀕死例(雄;対照群:2/12例、7500ppm群:0/11例、15000ppm群:1/16例、30000ppm群:11/20例、雌;対照群:1/3例、7500ppm群:0/11例、15000ppm群:2/15例、30000ppm群:18/36例)で増加し、定期解剖例では雄の30000ppm群の2例と雌の15000ppm群の1例にのみ認められた。(TABLE 12)

心筋線維症が、雌の30000ppm群の死亡／瀕死例(対照群:1/3例、7500ppm群:5/11例、15000ppm群:12/15例、30000ppm群:33/36例)で増加した。また、定期解剖例(対照群:36/47例、7500ppm群:30/39例、15000ppm群:26/35例、30000ppm群:13/14例)では発生率の増加を示したが、程度は減弱した。

## &lt; 腎臓 &gt;

皮質の鉍質沈着(雄; 対照群:2/50例、7500ppm群:0/50例、15000ppm群:2/50例、30000ppm群:13/50例、雌; 対照群:1/50例、7500ppm群:1/50例、15000ppm群:2/50例、30000ppm群:26/50例)が、雌雄の30000ppm群で増加した。特に、死亡/瀕死例(雄; 対照群:2/12例、7500ppm群:0/11例、15000ppm群:2/16例、30000ppm群:11/20例、雌; 対照群:1/3例、7500ppm群:1/11例、15000ppm群:1/15例、30000ppm群:26/36例)で増加し、定期解剖例では心臓に鉍質沈着がみられた個体と同一である雄の30000ppm群の2例と雌の15000ppm群の1例にのみ認められた。(TABLE 13)

皮髄境界部の鉍質沈着が、雌の全投与群の定期解剖例(対照群:17/47例、7500ppm群:25/39例、15000ppm群:22/35例、30000ppm群:13/14例)で増加した。

## &lt; 鼻腔 &gt;

嗅上皮のエオジン好性変化が、雄では30000ppm群の死亡/瀕死例(対照群:8/12例、7500ppm群:8/11例、15000ppm群:7/16例、30000ppm群:4/20例)と定期解剖例(対照群:34/38例、7500ppm群:28/39例、15000ppm群:25/34例、30000ppm群:20/30例)で、雌では30000ppm群の死亡/瀕死例(対照群:2/3例、7500ppm群:4/11例、15000ppm群:10/15例、30000ppm群:8/36例)で減少した。

## &lt; 肝臓 &gt;

明細胞性小増殖巣が、雄の30000ppm群の定期解剖例(対照群:18/38例、7500ppm群:12/39例、15000ppm群:14/34例、30000ppm群:4/30例)で減少した。

## &lt; 眼球 &gt;

網膜萎縮が、雌の30000ppm群の定期解剖例で程度の減弱を示した。

## - その他の病変 -

上記の所見の他に統計学的に有意差を示した腫瘍性病変は、雄の甲状腺のC-細胞腺腫の発生(減少傾向 Cochran-Armitage検定)、乳腺の腺腫と線維腺腫を合わせた発生(減少傾向 Cochran-Armitage検定)、雌の脾臓の単核球性白血病の発生(増加傾向 Peto検定(死亡率法、死亡率法+有病率法)、7500ppm群で対照群と比較して増加 Fisher検定)、子宮の子宮内膜間質性ポリープの発生(7500ppm群で対照群と比較して減少 Fisher検定)、子宮内膜間質性ポリープと子宮内膜間質性肉腫を合わせた発生(増加傾向 Peto検定(死亡率法)、7500ppm群で対照群と比較して減少 Fisher検定)で



あった。しかし、これらの所見の発生数は当センターのヒストリカルコントロールデータ (TABLE 10,11 文献 9) の範囲内であったり、投与量に対応した変化ではない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。また、非腫瘍性病変で投与群と対照群との間に統計学的に有意差を示した所見は、死亡/瀕死例では雌雄の腎臓の慢性腎症 (30000ppm群)、雄の骨髓の赤血球造血増加 (7500ppm群) 及び精巣の間細胞増生 (30000ppm群)、雌の胃の鉍質沈着、前胃の潰瘍及び腺胃のびらん (30000ppm群) 並びに前胃の過形成 (15000ppm、30000ppm群)、肝臓の好塩基性小増殖巣 (7500ppm群)、定期解剖例では雌雄の鼻腔の鉍質沈着 (7500ppm群)、雄の下垂体の過形成 (30000ppm群)、雌の肝臓の肉芽形成 (7500ppm群)、腎臓の慢性腎症 (15000ppm群) 及び副腎皮質の巣状脂肪変性 (15000ppm群) であった。しかし、これらの変化は投与量に対応した変化ではなかったり、死亡/瀕死例のみの変化であることなどから、被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

#### (4) 死因

病理学的にみた死亡/瀕死の原因を TABLE 14 に示した。

雄では心臓血管病変 (主に鉍質沈着)、雌では心臓血管病変 (主に鉍質沈着) 及び腎臓病変 (主に皮質の鉍質沈着) による死亡/瀕死が 30000ppm群で増加した。なお、雌の 15000ppm群では死亡の原因として増加した病変はなかったが心臓血管病変 (鉍質沈着) による死亡が 1例認められた。

### Ⅲ - 2 マウスを用いたがん原性試験 (0225)

#### Ⅲ - 2 - 1 動物の状態観察

##### (1) 生死状況

生死状況を TABLE 15,16 及び FIGURE 9,10 に示した。

投与群の生存率は、雄では対照群と比較して特に顕著な差はみられなかった。雌では20000ppm群で投与期間の末期に対照群と比較して低い生存率を示したが、投与量に対応した変化ではなく、特に死亡の原因として増加した病変もないことからウロトロピンの投与による影響とは考えられなかった。

各群の104週における生存動物数(生存率)は、雄では対照群:34/50例(68%)、10000ppm群:35/50例(70%)、20000ppm群:30/50例(60%)、40000ppm群:25/50例(50%)、雌では対照群:29/50例(58%)、10000ppm群:24/50例(48%)、20000ppm群:19/50例(38%)、40000ppm群:28/50例(56%)であった。

##### (2) 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 3,4 に、外部腫瘍と内部腫瘍の発生動物数を TABLE 17,18 に示した。

雄の40000ppm群で35週に陰茎または外陰部周囲の潰瘍が観察された。その後徐々に増加し、49週以降は雄の全投与群で観察された(陰茎または外陰部周囲の潰瘍が観察された動物数;対照群:1/50例、10000ppm群:20/50例、20000ppm群:27/50例、40000ppm群:26/50例)。

その他、ウロトロピンの投与による特徴的な所見は、死亡/瀕死例と定期解剖例のいずれにも認められなかった。また外部腫瘍と内部腫瘍の発生についても、ウロトロピンの各投与群と対照群との間に顕著な差は認められなかった。

##### (3) 体重

体重の推移を TABLE 15,16、FIGURE 11,12 及び APPENDIX B 3,4 に示した。

雄の40000ppm群で全投与期間にわたり対照群と比較して低値を示したが、体重増加の抑制率は、最大でも8%と低かった。

(4) 摂水量

摂水量を TABLE 19,20、FIGURE 13,14 及び APPENDIX C 3,4 に示した。

雄の40000ppm群でほぼ全投与期間にわたり対照群と比較して高い傾向を示した。また、雌の20000ppm及び40000ppm群でも投与期間の初期と後期に対照群と比較して高い傾向を示した。

(5) 摂餌量

摂餌量を TABLE 21,22、FIGURE 15,16 及び APPENDIX D 3,4 に示した。

雄の40000ppm群でほぼ全投与期間にわたり対照群と比較して低値を示した。対照群に対する40000ppm群の摂餌量は、89～102%であった。

(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(g/kg/day)を APPENDIX E 3,4 に示した。

被験物質の1日当たりの摂取量は、雄では10000ppm群:0.846～2.235g/kg、20000ppm群:1.756～4.829g/kg、40000ppm群:3.948～11.089g/kg、雌では10000ppm群:1.157～3.856g/kg、20000ppm群:2.674～7.861g/kg、40000ppm群:5.382～14.617g/kgであった。

Ⅲ - 2 - 2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

(1) 血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX F 3,4 に示した。

雌雄とも各投与群と対照群との間に顕著な差は認められなかった。

(2) 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を APPENDIX G 3,4 に示した。

雄の20000ppm群で尿素窒素の減少、40000ppm群で尿素窒素の減少とC P K活性の上昇が認められた。

雌の20000ppm群で尿素窒素の増加、40000ppm群で尿素窒素の増加とカリウムの減少が認められた。

(3) 尿検査

尿検査の結果を APPENDIX H 3,4 に示した。

雌雄とも全投与群で蛋白の陽性度の増加とケトン体の陽性例の減少、雄の10000ppm及び40000ppm群でpHの上昇が認められた。

### Ⅲ - 2 - 3 病理学的検査

#### (1) 剖検

解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX I 5~8 に示した。

死亡／瀕死例及び定期解剖例ともに投与群に特徴的な所見あるいは対照群と比較して顕著な差を示した所見は認められなかった。

#### (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 3,4、K 3,4 に示した。

雄の40000ppm群で心臓の実重量の低値が認められた。

雌では、10000ppm群で卵巣の体重比の高値が認められた。20000ppm群で肺の実重量の高値と腎臓の体重比の高値が認められた。40000ppm群で腎臓及び肺の実重量の高値並びに腎臓、肺及び肝臓の体重比の高値が認められた。

#### (3) 病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果を APPENDIX L 5~8 に示した。腫瘍性病変の結果は、担腫瘍動物数と腫瘍数を APPENDIX M 3,4、腫瘍の種類別の発生数を APPENDIX N 3,4、統計解析(Peto検定、Cochran-Armitage検定、Fisher検定)を APPENDIX O 3,4、転移性病変を APPENDIX P 5~8 に示した。また統計解析の結果、有意差を示した腫瘍性病変については TABLE 23,24 に示した。

ウロトロピンの投与の影響とみられた変化を腫瘍性病変と非腫瘍性病変に分けて臓器別に示した。

腫瘍性病変は雌の乳腺腫瘍の増加傾向がみられた。非腫瘍性病変は主に鼻腔に変化がみられた。

－腫瘍性病変－

<乳腺>

雌の腺腫の発生(対照群:0/50例、10000ppm群:0/50例、20000ppm群:1/50例、40000ppm群:3/50例)がPeto検定(有病率法)とCochran-Armitage検定で投与量に対応した増加傾向を示した。また、腺癌及び腺腫を合わせた発生(対照群:1/50例、10000ppm群:1/50例、20000ppm群:3/50例、40000ppm群:6/50例)もPeto検定(有病率法、死亡率法+有病率法)とCochran-Armitage検定で投与量に対応した増加傾向を示した。

乳腺腫瘍の分類は、基本的にはAndervontとDunnの基準(文献 10)に従っ

たが、長径が5mm未満の大きさで細胞異型がほとんどないものは腺腫とした。  
 なお、腺癌の内20000ppm群と40000ppm群の各1例は、腺表皮腫型であった。

－非腫瘍性病変－

<鼻腔(TABLE 25)>

嗅腺の導管拡張が、雄では40000ppm群の死亡／瀕死例(対照群:0/16例、10000ppm群:0/15例、20000ppm群:1/20例、40000ppm群:18/25例)並びに20000ppm及び40000ppm群の定期解剖例(対照群:0/34例、10000ppm群:0/35例、20000ppm群:9/30例、40000ppm群:21/25例)で、雌では40000ppm群の死亡／瀕死例(対照群:0/21例、10000ppm群:0/26例、20000ppm群:2/31例、40000ppm群:16/22例)及び定期解剖例(対照群:0/29例、10000ppm群:0/24例、20000ppm群:3/19例、40000ppm群:24/28例)で増加した。

粘膜固有層の腺の呼吸上皮化生が、雄では40000ppm群の死亡／瀕死例(対照群:4/16例、10000ppm群:4/15例、20000ppm群:8/20例、40000ppm群:16/25例)並びに10000ppm及び40000ppm群の定期解剖例(対照群:10/34例、10000ppm群:22/35例、20000ppm群:13/30例、40000ppm群:21/25例)で、雌では20000ppm及び40000ppm群の定期解剖例(対照群:0/29例、10000ppm群:4/24例、20000ppm群:7/19例、40000ppm群:10/28例)で増加した。

嗅上皮の呼吸上皮化生が、雄の40000ppm群の死亡／瀕死例(対照群:2/16例、10000ppm群:1/15例、20000ppm群:8/20例、40000ppm群:14/25例)と定期解剖例(対照群:11/34例、10000ppm群:10/35例、20000ppm群:17/30例、40000ppm群:18/25例)で増加した。

嗅上皮のエオジン好性変化が、雌の40000ppm群の定期解剖例(対照群:2/29例、10000ppm群:2/24例、20000ppm群:0/19例、40000ppm群:11/28例)で増加した。

－その他の病変－

上記の所見の他に統計学的に有意差を示した腫瘍性病変は、雄の脾臓の悪性リンパ腫(増加傾向 Peto検定(死亡率法、死亡率法+有病率法))と全臓器の悪性リンパ腫(増加傾向 Peto検定(死亡率法))、雌の全臓器の悪性リンパ腫(増加傾向 Peto検定(有病率法))と子宮の子宮内膜間質性ポリープ(20000ppm群で対照群と比較して減少 Fisher検定)であった。しかし、これらの所見の発生数は当センターのヒストリカルコントロールデータ(TABLE 23,24 文献 9)の範囲内であったり、投与量に対応した変化ではない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。また、非腫瘍性病変で投与群と対照群との間に統計学的に有意差を示した所見は、

死亡/瀕死例では雌の腎臓の硝子滴(40000ppm群)、定期解剖例では雄の歯の異形成(20000ppm群)、肝臓の肉芽形成(40000ppm群)及び精巣の鉍質沈着(20000ppm群)、雌の鼻腔の嗅上皮の呼吸上皮化生(20000ppm)であった。しかし、これらの変化は投与量に対応した変化ではなかったり、死亡/瀕死例のみの変化であることなどから、被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

#### (4) 死因

病理学的にみた死亡/瀕死例の死因を TABLE 26 に示した。

雌雄とも各投与群と対照群との間に顕著な差を認めなかった。

#### IV 考察

##### IV-1 ラット

##### IV-1-1 動物の状態観察

投与群の生存率は、対照群と比較して雄の30000ppm群でやや低下した。雌では15000ppm及び30000ppm群で低下し、特に30000ppm群は顕著であった。死因として、30000ppm群の雄では心臓血管病変、雌では心臓血管病変及び腎臓病変による死亡／瀕死例が増加した。また、雌の15000ppm群では特に死亡の原因として増加した病変はなかったものの心臓血管病変による死亡が1例認められた。これらは、ウロトロピンの投与による影響と考えられた。なお、雌の7500ppm群でも生存率は対照群と比較して低下したが、死亡の原因として増加した病変はなく、対照群の生存率(94%:47/50例)が当センターのヒストリカルコントロールデータ(雌の16試験中最小-最大の生存率; 44%:22/50例-90%:45/50例 文献 9)では最高の生存率であったことから、ウロトロピンの投与による影響とは断定できなかった。

一般状態の観察では、投与群の全ての動物で被毛が黄色に着色する所見が認められた。これは、ウロトロピンの長期投与の試験で報告されているもの(文献 11,12)と同じ所見と考えられた。また、雌雄の体重及び摂餌量の抑制並びに摂水量の若干の変化が認められた。これらは、ウロトロピンの投与による影響と考えられた。

##### IV-1-2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

血液生化学的検査で肝機能障害を示唆する変化等が認められ、ウロトロピンの投与による影響と考えられたが、病理学的検査に対応する所見はみられなかった。また、その他の検査でもウロトロピンの投与の影響と考えられた変化が認められたが、病理学的検査に明確に関連する所見はみられなかった。

##### IV-1-3 病理学的検査

##### — 腫瘍性病変 —

雄の皮膚／付属器の皮脂腺腺腫が30000ppm群に3例発生し、統計学的にPeto検定(有病率法)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示した。



この腫瘍は、当センターのヒストリカルコントロールデータ(文献 9)では、雄に850例中2例の発生が認められている。しかし、その2例は本試験と同時期に導入した試験の動物に認められたものである。すなわち発生数としては非常に稀であるが、最近の動物のLotの傾向として、この腫瘍の自然発生率が増加してきたという可能性もある。従って、雄の皮脂腺腺腫の発生については、発生数が3例と低く、自然発生の可能性も否定できない為、ウロトロピンの投与によるものか否かを断定することはできなかった。

雌の下垂体の腺腫の発生(対照群:18/49例、7500ppm群:14/50例、15000ppm群:12/50例、30000ppm群:6/50例)が、Cochran-Armitage検定で投与量に対応した減少傾向を示し、Fisher検定でも30000ppm群で対照群と比較して減少を示した。

雌の対照群の下垂体腺腫は18例中16例と多くの例が定期解剖時に認められた。一方、投与群では投与量に対応して生存率と下垂体腺腫の発生が低下した。すなわち、定期解剖時の生存動物数の減少により、二次的に下垂体腺腫の発生が低下した可能性が考えられる。また、制限給餌や体重の増加抑制によって、F344ラットの下垂体腫瘍の発生低下が起こるという報告(文献 13,14)もある。これらのことから、雌の下垂体腺腫の発生低下はウロトロピンの投与による生存率の低下、摂餌量の低下及び体重の増加抑制に起因した変化と考えられた。

#### －非腫瘍性病変－

ウロトロピンの投与の影響とみられた鉍質沈着が、主に死亡/瀕死例(雄:20例、雌:36例)の心臓及び腎臓の皮質などに認められた。

心臓では、鉍質沈着が雌雄の30000ppm群で増加した。雄に13/50例(11例が死亡/瀕死)、雌に18/50例(全例が死亡/瀕死)認められ、その多くが死亡/瀕死例であった。定期解剖例では雄の30000ppm群の2例と雌の15000ppm群の1例にのみ認められた。その他、心筋線維症が雌の30000ppm群の死亡/瀕死例で増加し、定期解剖例でも発生率の増加を示した。これらの変化はウロトロピンの投与による影響であり、特に鉍質沈着は死亡率の増加の原因になったと考えられた。また、剖検でみられた白色斑は、これらの組織所見に対応する所見として考えられた。

腎臓でも、皮質の鉍質沈着が雌雄の30000ppm群で増加した。雄に13/50例(11例が死亡/瀕死)、雌に26/50例(全例が死亡/瀕死)認められ、その多くが死亡/瀕死例であった。定期解剖例では心臓に鉍質沈着がみられた個体と同一である雄の30000ppm群の2例と雌の15000ppm群の1例にのみ認められた。また、皮髄境界部の鉍質沈着が雌の全投与群の定期解剖例で増加した。

これらの変化はウロトロピンの投与による影響であり、特に皮質の鉍質沈着は死亡率の増加の原因になったと考えられた。なお、剖検で対照群と比較して減少した雄の30000ppm群の顆粒状化は、慢性腎症に対応する所見であるが、慢性腎症の発生については、ウロトロピンの投与の影響を示唆する様な変化を示さなかった。

#### 心臓血管病変と腎臓病変との関連性について

心臓血管病変あるいは腎臓病変で死亡／瀕死に至った動物は、ほとんどの例が心臓の鉍質沈着と腎臓の皮質の鉍質沈着の両方を有していた。雄と雌とを比較すると雌の方が程度が強く、腎臓病変による死亡は雌にのみ認められた。また腎臓病変で死亡した個体は、心臓血管病変で死亡した個体に比べて死亡時期が早い傾向にあった。これらのことから、ウロトロピンに対する心臓及び腎臓の感受性は雄に比べて雌の方が強く、腎臓にその影響が強く現れた個体は早い時期に死に至り、腎臓への影響を耐えた個体が後に心臓による影響で死に至ったと考えられた。

また、心臓と腎臓の皮質の鉍質沈着は死亡／瀕死例に多くみられ、定期解剖例では数個体にのみ認められた程度であった。このことから、ウロトロピンによる直接的な影響は機能的変化への障害であり、鉍質沈着は二次的な影響として死亡に至る段階ではじめて現れるものと推察されたが、他に明確な証拠は得られなかった。

上記の所見の他に、投与群と対照群との間に投与量に対応した発生の差が認められ、ウロトロピンの投与による影響を否定できない所見を以下に示す。

鼻腔の嗅上皮のエオジン好性変化(雌雄の30000ppm群、発生低下)

肝臓の明細胞性小増殖巣(雄の30000ppm群、発生低下)

眼球の網膜萎縮(雌の30000ppm群、程度の減弱)

#### IV - 2    マウス

##### IV - 2 - 1    動物の状態観察

投与群の生存率において、ウロトロピンの投与による影響と考えられた変化はみられなかった。

一般状態の観察では、雄の陰茎または外陰部周囲の潰瘍が、全投与群で観察された。これは、ウロトロピンの投与による影響と考えられたが、尿路系等の病理組織に変化はみられなかった。また、雄の体重及び摂餌量の抑制並びに雌雄の摂水量の若干の増加が認められた。これらは、ウロトロピンの投与による影響と考えられた。

##### IV - 2 - 2    血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

血液生化学的検査と尿検査で、ウロトロピンの投与の影響と考えられた変化が認められたが、病理学的検査に明確に関連する所見はみられなかった。

##### IV - 2 - 3    病理学的検査

###### －腫瘍性病変－

雌の乳腺の腺腫が20000ppm群に1例、40000ppm群に3例発生し、統計学的にPeto検定(有病率法)とCochran-Armitage検定で投与量に対応した増加傾向を示した。また、腺癌及び腺腫を合わせた発生(対照群:1/50例、10000ppm群:1/50例、20000ppm群:3/50例、40000ppm群:6/50例)もPeto検定(有病率法、死亡率法+有病率法)とCochran-Armitage検定で投与量に対応した増加傾向を示した。

当センターのヒストリカルコントロールデータ(文献 9)では、乳腺の腺腫は雄に800例中1例認められ、雌は799例中全く認められていない。腺癌については雄の発生はなく、雌で799例中11例認められ、平均発生率:1.4%、試験単位の発生率:0-4%である。従って、乳腺の腺癌及び腺腫の発生はヒストリカルコントロールデータの範囲を超えており、ウロトロピンの投与による影響を否定し得なかった。

－非腫瘍性病変－

ウロトロビンの投与の影響とみられた変化が、鼻腔の上皮と粘膜固有層の腺組織に認められた。

雌雄とも嗅腺の導管拡張が認められた。この変化は予備試験である13週間試験(雌雄の80000ppm群 文献 6)でも認められたが、投与期間の長期化による顕著な増強はみられなかった。また、加齢性病変である雌雄の粘膜固有層の腺の呼吸上皮化生、雄の嗅上皮の呼吸上皮化生及び雌の嗅上皮のエオジン好性変化の発生増加が認められた。これらの変化はウロトロビンの投与による影響と考えられた。

## V 結 論

F344/DuCrj(Fischer)ラット及びCrj:BDF<sub>1</sub>マウスを用いてウロトロピンの2年間(104週間)にわたる経口(混水)投与によるがん原性試験を行った。

ラットでは、雌雄とも顕著な腫瘍の発生増加は認められず、雌雄の心臓及び腎臓に鉍質沈着が認められた。

マウスでは、雌の乳腺の腺癌及び腺腫の発生が統計学的に増加傾向を示した。また、鼻腔に雌雄とも嗅腺の導管拡張が認められ、これに加えて加齢性病変である雌雄の粘膜固有層の腺の呼吸上皮化生、雄の嗅上皮の呼吸上皮化生及び雌の嗅上皮のエオジン好性変化の発生増加が認められた。

以上のように、ウロトロピンの投与によりCrj:BDF<sub>1</sub>マウスの雌に乳腺の腺癌及び腺腫の発生の増加傾向が認められ、ウロトロピンのCrj:BDF<sub>1</sub>マウスの雌に対するがん原性が示された。ただし、その増加の程度は僅かであった。雄のCrj:BDF<sub>1</sub>マウス及び雌雄のF344/DuCrj(Fischer)ラットには顕著な腫瘍の発生増加は認められず、がん原性は示されなかった。

VI 文 献

1. 化学工業日報社(1997)  
13197の化学商品  
pp.511-512, pp1063, 化学工業日報社, 東京
2. 後藤 稠、池田正之、原 一郎 編(1981)  
産業中毒便覧(増補版)  
pp.1350, 医歯薬出版, 東京
3. 化学大辞典編集委員会(1978)  
化学大辞典 8  
pp.292-293, 共立出版株式会社, 東京
4. Heller,S.R. and Milne,G.W.A.(1978)  
EPA/NIH Mass Spectral Data Base Vol.1, pp.348,  
U.S.Government Printing Office, Washington.
5. 和光純薬工業からの提供資料(1981)
6. 日本バイオアッセイ研究センター(1993)  
1,3,5,7-テトラアザトリシクロ[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]デカンのラット及び  
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
7. 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.
8. Peto,R., Pike,M.C., Day,N.E., Gray,R.G., Lee,P.N., Parish,S., Peto, J., Richrds,S.  
and Wahrendorf, J.(1980)  
Guidlines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects  
in long-term animal experiments.  
Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens : A Critical Appraisal,  
IARC Monographs, Suppl.2, pp.311-426,  
International Agency for Research on Cancer, Lyon.
9. 日本バイオアッセイ研究センター内部資料(1984-1997)

10. Squartini,F.(1979)  
Tumours of the mammary gland  
In : Turusov,V.S.(ed), Pathology of Tumours in Laboratory Animals,  
Vol. II Tumours of the Mouse IARC Scientific Publications, No.23, pp.43–90,  
International Agency for Research on Cancer, Lyon.
11. Della Porta,G., Colnaghi,M. I. and Parmiani G.(1968)  
Non–carcinogenicity of hexamethylenetetramine in mice and rats.  
Fd Cosmet.Toxicol., Vol.6, pp.707–715.
12. Natvig,H., Andersen, J. and Wulff Rasmussen,E.(1971)  
A contribution to the toxicological evaluation of hexamethylenetetramine.  
Fd Cosmet.Toxicol., Vol.9, pp.491–500.
13. 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 F344 rats.  
Journal of Toxicologic Pathology, Vol.3, 209–221.
14. Witt,W.M., Sheldon,W.G. and Thurman, J.D.(1991)  
Pathological endpoints in dietary restricted rodents–Fischer 344 rats and  
B6C3F<sub>1</sub> mice.  
In : L.Fishbein ed. Biological Effects of Dietary Restriction.  
Springer–Verlag, New York.