ヒドラジン化合物の突然変異誘起性に関する研究, とくに発がん性との関係について

Relationships between the mutagenic and carcinogenic effects
of Hydrazine derivatives

東京慈恵会医科大学公衆衛生学教室

清水 英 佑・林 和 夫・竹 村 望

Hidesuke Shimizu, Kazuo Hayashi and Nozomi Takemura

Department of Public Health, Jikei University School of Medicine, Tokyo

Hydrazine and its derivatives are widely used in industrial, agricultural and medical fields, but they also exist in nature, for example, in the mushroom or tobacco and tobacco smoke. Therefore, it is important to investigate the mutagenic and carcinogenic effects of hydrazine derivatives.

The microbial mutagenicity of 26 hydrazine compounds were tested with *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and TA1537 in the presence or absence of S-9 Mix. Eighteen of these 26 compounds were already found to be carcinogenic, but the carcinogenicity of 8 of these compounds are yet unknown.

1) Five carcinogenic compounds, such as 2-hydroxyethylhydrazine, butylhydrazine oxalate, phenylhydrazine HCl, beta-phenylethylhydrazine sulfate and *p*-tolylhydrazine HCl, were found to be mutagenic to TA100 with and without S-9 Mix, and 2 of these compounds, hydrazine hydrate and hydrazine sulfate, were mutagenic to TA100 only in the presence of S-9 Mix.

2) 2, 4-Dinitrophenylhydrazine and *p*, *p'*-oxybisbenzendisulfonylhydrazide, the carcinogenicity of which is unknown, were mutagenic to TA 100 with and without S-9 Mix.

3) Phenylhydrazine HCl, *p*-tolylhydrazine HCl and 2, 4-dinitrophenylhydrazine were mutagenic to TA1537 with and without S-9 Mix.

4) Phenylhydrazine HCl and *p*-tolylhydrazine HCl were mutagenic to TA98 with S-9 Mix, while 2, 4-dinitrophenylhydrazine showed mutagenic activity to TA 98 with and without S-9 Mix.

I. 緒 言

19世紀後半に Curtis により無機塩又は水和物として合成、単離された Hydrazine は、特有な化学的性質によって利用・開発が盛んとなり、第2次世界大戦末期には、ドイツに於て V₂ ロケット推進用燃料として使用されたのがきっかけとなり脚光をあびるようになった¹⁾。その後、近代化学工業の発展とともに数々の Hydrazine 誘導体が合成され、工業化学物質として種々の製品の原材料や中間体として用いられるだけでなく、農業や医薬品としても利用価値が高くなって来た。

1957年 Juhász ら²⁾は、Hydrazine 誘導体で結核治療薬として今日でも広く用いられている Isonicotinic acid hydrazide (INH) が、マウスに肺腫瘍を発生させること

を報告して以来、多くの研究者により追試がなされて来た^{3,4)}。この事がきっかけとなって研究は2つの方向に向った。1つは INH の代謝産物である Hydrazine^{5,6)}, Isonicotinic acid⁷⁾, 1-Acetyl-2-isonicotinoylhydrazide⁸⁾等の発がん性に関する研究であり、もう1つは工業化学物質や農薬、医薬品として我々の環境中に広く存在する他の Hydrazine 誘導体に関する発がん性の研究である。その結果今日までに、約26種類の合成された Hydrazine 誘導体の発がん性と、天然に存在する Hydrazine 化合物の発がん性が証明されている⁹⁾。

最近 California 大学の Ames らは、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) を用いて、化学物質の突然変異誘起性を調べる方法を開発した¹⁰⁾。このテストで発がん性を持つ化学物質の約90%が同時に突然変異誘起性

を示し，両者の間に非常に高い相関性が認められると報告されている^{11,12)}。一方，今日すでに我々の生活環境中に存在する化学物質や，新規に合成された化学物質の大部分は，十分に毒性や発がん性が検討されていないのが現状である。発がん実験は，長い観察期間と莫大な経費，充分な設備と高度な判定技術を必要とするのに対して，微生物の突然変異誘起性から化学物質の発がん性をスクリーニングする方法は，簡便低廉で，同時に多数の検体を短時間にテストできるという利点があり，しかも発がん性との相関が高いことから，化学物質の第一次スクリーニングとしてその利用価値は高く，すでに実用の段階に達している。

そこで著者らは，今日までに発がん性が証明されて来た18種類の Hydrazine 及びその誘導体と，また発がん性が検討されていない8種類の物質について，突然変異誘起性との関係について検討を行った。

II. 実験材料及び実験方法

1. 用いた化学物質と試料の作成

用いた化学物質は，1,2-Dimethylhydrazine 2HCl, Phenylhydrazine HCl, Benzoylhydrazine, Benzylhydrazine 2HCl, 2-Hydroxyethylhydrazine, Carbamylhydrazine HCl, Hydrazine sulfate, 1-Carbamyl-2-phenylhydrazine, Methylhydrazine sulfate, Butylhydrazine oxalate, Ethylhydrazine oxalate, β -Phenylethylhydrazine sulfate, Thiosemicarbazide, β -Phenylisopropyl hydrazine, 1,2-Diformylhydrazine, 1,2-Diethylhydrazine dicarboxalate, *p*-Tolylhydrazine HCl, Succinic acid 2,2-dimethylhydrazide, Formic acid hydrazide, Hydrazine hydrate, 1,1-Dimethylhydrazine, Isonicotinic acid hydrazide, Guanylhiazine HCl, 2,4-Dinitrophenylhydrazine, 2-Methyl-4-chlorophenoxyacetic acid hydrazide HCl 及び *p*, *p'*-Oxybisbenzen disulfonylhiazide である。

試料の作成にあたっては，水溶性のものは滅菌蒸留水にて，非水溶性のものは Dimethylsulfoxide (DMSO) にて，800, 400, 200, 100 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}/\text{plate}$ の各4段階濃度を作成して用いた。但し 800 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ で弱陽性を示した物質は，さらに濃度を上げ 1,600, 1,200 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}/\text{plate}$ について検討を行った。液状物質は2%を最高濃度として5段階に希釈して用いた。

2. 用いた菌株

Salmonella typhimurium TA 1537, TA 98, TA 100 の3株を用いた。

3. 寒天平板培地の作成

Vogel-Bonner の最小培地に2%の Glucose と1.5%の Agar を加え 高圧蒸気滅菌後，滅菌シャーレに 30 ml ずつ Dispensing ポンプにて分注する。

4. Soft agar の作成

寒天平板培地上に菌を均一に播くため，0.7% Agar-0.6% NaCl 溶液を 高圧蒸気滅菌後保存し，使用直前に加温溶解させ，滅菌した 0.5 mM Histidine-0.5 mM Biotin 溶液を 1/10 容量 (100 ml に 10 ml) 加え，よく混合し 45°C に保温しておく。

5. 肝 microsome 分画酵素の誘導と S-9 分画の作成

多くの発がん物質は動物の体内で代謝を受け proximate carcinogen から ultimate carcinogen になる事が知られているが，微生物ではこれらの代謝経路を欠くものが多い。Ames ら¹⁰⁾は，肝 microsome 酵素の誘導物質として Aromatic amine 類には Phenobarbital を，Polycyclic hydrocarbon 類には 3-Methylcholanthrene を用いていたが，最近これらの代りに Polychlorinated biphenyl (PCB) を用いる事により，両者の代謝活性化に関係する酵素を幅広く誘導できる事を見出し，広く用いられるようになったので，我々もこの方法を用いた。

Sprague-Dawley 系雄ラット (90~100 g 位) に，体重 1 kg あたり 500 mg の PCB (Kanechlor 500) を corn oil を溶解し，1回腹腔内注射後5日目に断頭屠殺する。直ちに開腹し冷 0.15 M KCl 液で灌流後，肝を摘出して秤量し細切する。次いで肝重量の3倍量の冷 0.15 M KCl を加え，Teflon homogenizer で homogenize し，その homogenate を冷凍遠沈機にて 9,000 g で10分間遠心沈澱し，その上清 (S-9 分画) を集め，滅菌小試薬ビンに分注し，-80°C にて凍結保存する。必要に応じて室温にて解凍し使用する。以上の操作はすべて無菌的に行う。

6. S-9 Mix の作成

肝 homogenate の S-9 分画と，NADPH 産生系酵素類との混合したものを S-9 Mix といい，プレートあたり 0.5 ml を加える。著者らは Ames の原法を改良した矢作の方法を用いた¹³⁾。

7. 菌の培養

Difco-Nutrient broth (8 g/l) に NaCl (5 g/l) を加えた培養液を L 字管に 5 ml ずつとり 高圧蒸気滅菌後，凍結保存しておいた TA 100, TA 1537, TA 98 の菌懸濁液より菌を接種し，37°C にて 14~15 時間培養すると約 $1\sim 2 \times 10^9$ 生菌数/ml の菌懸濁液が得られる。これを使用直前まで氷中に保存しておく。

8. Mutation test と判定方法

Dimethylnitrosamine (DMN) は強力な発がん物質とし

て知られているが, Ames 原法ではその突然変異誘起性を検出できない。杉村ら¹⁴⁾は, Ames の方法に, さらに Malling や, Nakajima らの液体法である preincubation を組み込む事によって DMN も容易に検出可能としたのでこの方法を用いた。

1) 0.5 mM Histidine—0.5 mM Biotin 添加の Soft agar を45℃に保温し準備する。

2) 蒸留水又は DMSO にて溶解した試料溶液を 0.1 ml ずつマイクロピペットにて滅菌中試験管に分注する。

3) S-9 Mix 又は 100 mM Na·P 緩衝液を 0.5 ml 加える。

4) 0.1 ml の菌濁懸液を加える。

5) 37℃, 20分間, 毎分60往復の速さで振盪しながら preincubation する。

6) Soft agar 2 ml を加えよく混合する。

7) 寒天平板培地上に注ぎ一様に広げる。

8) 37℃にて48時間孵卵器中にて incubation する。

9) プレート上の Histidine 非要求株 (His⁺) に変異したコロニー数を数える。

10) コントロール群と試験群のコロニー数との差が100 以上あり, しかも Dose-response があるものを陽性と判定した。

III. 実験結果

26種類の Hydrazine (H) 及びその誘導体に関する突然変異誘起性と発がん性との関係を, *Salmonella typhimurium* TA100, TA1537, TA98 の3種の菌株を用いて, S-9 Mix を加えて Metabolic activation を与えた場合と与えない場合の両者について検討した。結果は次の如くである。

The number of revertants of *S. typhimurium* TA100 and TA1537 obtained after incubation with various amounts of chemicals. HH, Hydrazine hydrate; HS, Hydrazine sulfate; 2HE, 2-Hydroxyethylhydrazine; PH, Phenylhydrazine HCl; PEH, β -Phenylethylhydrazine sulfate.

With S-9 Mix. (—●—), Without S-9 Mix. (---○---).

Fig. 1

The number of revertants of *S. typhimurium* TA100, TA1537 and TA98 obtained after incubation with various amounts of chemicals. 24D, 2,4-Dinitrophenylhydrazine; TH, *p*-Tolylhydrazine HCl; OSH, *p,p'*-Oxybisbenzen disulfonyl hydrazide.

with S-9 Mix. (—●—), without S-9 Mix. (---○---).

Fig. 2

1. *S. typhimurium* TA100 による塩基置換型突然変異原物質の検索

TA100 は，TA1535 に R-factor plasmid (pKM101) が加えられたことによって変異原物質に対し，より感度が高くなった菌株で，塩基置換型の突然変異を起こす^{10,15)}ことが知られている。検討した26種類のうち9種類の物

質に陽性が認められた (Table 1, Fig. 1, 2)。

Fig. 1-a の Hydrazine hydrate (HH)，Fig. 1-b の Hydrazine sulfate (HS) は S-9 Mix を加えた場合のみ，Fig. 2-p の *p,p'*-Oxybisbenzene disulfonylhydrazide (OSH) は S-9 Mix を加えても加えなくても陽性を示したが，その突然変異誘起作用はあまり強く認められない。

Table 1 Mutagenicity and carcinogenicity of tested Hydrazine compounds

No.	Chemical	Structure	Mutagenicity			Carcinogenicity and Reference's No.
			TA 100	TA 1537	TA 98	
1	Hydrazine hydrate	$N_2N-NH_2 \cdot H_2O$	+	—	—	+16
2	Hydrazine sulfate	$H_2N-NH_2 \cdot H_2SO_4$	+	—	—	+17, 18
3	Methylhydrazine sulfate	$H_3CHN-NH_2 \cdot H_2SO_4$	—	—	—	+27, 28
4	1, 1-Dimethylhydrazine	$(CH_3)_2N-NH_2$	—	—	—	+ 6, 29
5	1, 2-Dimethylhydrazine dihydrochloride	$H_3C \cdot HN-NH \cdot CH_3 \cdot 2HCl$	—	—	—	+30, 31
6	Ethylhydrazine oxalate	$H_3CH_2C \cdot HN-NH_2 \cdot (COOH)_2$	—	—	—	+19
7	2-Hydroxyethylhydrazine	$H_2N-NH \cdot CH_2CH_2OH$	+*	—	—	+20, 21
8	Butylhydrazine oxalate	$H_3CH_2CH_2CH_2C \cdot HN-NH_2 \cdot (COOH)_2$	+*	—	—	+26
9	Carbamylhydrazine HCl	$H_2N-NH \cdot CO \cdot NH_2 \cdot HCl$	—	—	—	+32
10	Succinic acid 2, 2-dimethylhydrazide	$HOOCCH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot HN-N(CH_3)_2$	—	—	—	+33
11	Guanylhiazine HCl	$H_2N \cdot C(NH) \cdot HN-NH_2 \cdot HCl$	—	—	—	?
12	Thiosemicarbazide	$H_2N \cdot CS \cdot HN-NH_2$	—	—	—	?
13	1, 2-Diethylhydrazine dicarboxalate	$H_5C_2 \cdot HN-NH \cdot C_2H_5 \cdot 2(COOH)_2$	—	—	—	?
14	Formic acid hydrazide	$HCO \cdot HN-NH_2$	—	—	—	?
15	1, 2-Diformylhydrazine	$HCO \cdot HN-NH \cdot CHO$	—	—	—	?
16	Phenylhydrazine HCl	-NH-NH ₂ ·HCl	+*	+*	+	+22, 23
17	Benzylhydrazine 2HCl	-CH ₂ ·NH-NH ₂ ·2HCl	—	—	—	+23
18	<i>β</i> -Phenylethylhydrazine sulfate	-CH ₂ ·CH ₂ ·HN-NH ₂ ·H ₂ SO ₄	+*	—	—	+24
19	Benzoylhiazine	-CO·HN-NH ₂	—	—	—	+34
20	1-Carbamyl-2-phenyl hydrazine	-NH-NH·CO·NH ₂	—	—	—	+35
21	<i>p</i> -Tolylhydrazine HCl	H ₃ C- -NH-NH ₂ ·HCl	+*	+*	+	+25
22	2, 4-Dinitrophenyl hydrazine	-NH-NH ₂	+*	+*	+*	?
23	Isonicotinic acid hydrazide	-CO·HN-NH ₂	—	—	—	+2, 3
24	<i>β</i> -Phenylisopropyl hydrazine	-NH-NH·CH(CH ₃) ₂	—	—	—	?
25	2-Methyl-4-chloro phenoxy acetic acid hydrazide HCl	Cl- -OCH ₂ ·CO·HN-NH ₂ ·HCl	—	—	—	+36
26	<i>p,p'</i> -Oxybisbenzen disulfonyl hydrazide	H ₂ N-NH·SO ₂ - -O- -SO ₂ ·HN-NH ₂	+*	—	—	?

+ : with S-9 Mix, +* : with and without S-9 Mix

OSHの発がん性は未知であるが、HH及びHSは肺又は血管系に腫瘍を発生させる¹⁶⁻¹⁸⁾。Fig. 1-cの2-Hydroxyethylhydrazine (2HE)は、Ethylhydrazine (EH)の2の位置にOH基がついたものである。EHでは肺及び血管系に腫瘍が発生する¹⁹⁾のに対し、2HEの発がん作用は強くない^{20,21)}。しかし突然変異誘起作用は、HH、HSに比較して強く、しかもS-9 Mixを加えても加えなくても陽性を示した。一方、Phenyl基を共通に持つFig. 1-dのPhenylhydrazine HCl(PH)^{22,23)}、Fig. 1-fのβ-Phenylethylhydrazine(PEH)²⁴⁾及びFig. 2-mのp-Tolyl-hydrazine (TH)²⁵⁾は、肺又は血管系の腫瘍を発生させるが、突然変異誘起作用は、S-9 Mixを添加しなくても3物質とも陽性を示したが、S-9 Mixを添加した方が強くする傾向にある。

Fig. 2-gの2,4-Dinitrophenylhydrazine (24D)は、S-9 Mixの添加がなくても非常に強い突然変異原物質であり、特にS-9 Mixを加えない場合400 µg/plate以上では毒性が強く菌は死滅し検出できなかった。発がん性テストを現在行っている。

Butylhydrazine oxalate (BH) (Fig. はなし)は、S-9 Mixを加えなくてもわずかながら dose-response curveを示したことから弱陽性と判定した。n-Butylhydrazine HClとして肺腫瘍の発生が証明されている²⁶⁾。

2. *S. typhimurium* TA1537によるフレイムシフト型突然変異原物質の検索

*Salmonella tester strain*の中のTA1535シリーズの1菌株であるTA1537は、TA1532株の細胞膜構成成分であるLipopolysaccharideが欠失したもの(rfa, deep rough)であり¹⁵⁾、9-Aminoacridineの変異原性を検出できる唯一の菌株であることから、AmesはTA100、TA98とともに使用することを推奨している¹⁰⁾。このTA1537により陽性を示したのは、26種類中3種類だけであった (Table 1, Fig. 1, 2)。

PHはFig. 1-eに示す如く、S-9 Mixを加えた場合、TA100より強く陽性を示したが、S-9 Mixを加えない場合は弱陽性であった。Fig. 2-hの24Dは、S-9 Mixを加えた場合linearな増加を示したが、加えない場合には、400 µg/plate以上で急激な増加を示した。Fig. 2-nのTHは、S-9 Mixの添加により強陽性を示したが、加えない場合には、400 µg/plate以上の濃度で菌の死滅が起こり検出不能となった。

3. *S. typhimurium* TA98によるフレイムシフト型突然変異原物質の検索

TA1538にR-factor plasmidを組み込むことによって

得られたTA98は、より感度が優れ、フレイムシフト型の突然変異原物質によって復帰突然変異を起こす。この菌株により3種類の物質が変異原物質として証明できた (Table 1, Fig. 2)。

PH及びTHはともにS-9 Mixを添加した時に弱陽性を示した (Fig. はなし)が、24DはFig. 2-kに示す如く、TA100の場合と同様に強い変異原性を示した。

4. 発がん性と突然変異原性との相関について

Methylhydrazine sulfate (MH)、1,1-Dimethylhydrazine (1,1-DMH)、1,2-Dimethylhydrazine 2HCl (1,2-DMH)、Ethylhydrazine oxalate (EH)、Carbamylhydrazine HCl (CBH)、Succinic acid 2,2-dimethylhydrazide (SADH)、Benzylhydrazine 2HCl (BEH)、Benzoylhydrazine (BOH)、Isonicotinic acid hydrazide (INH)、1-Carbamyl-2-phenylhydrazine (CPE)、2-Methyl-4-chlorophenoxy acetic acid hydrazide HCl (MCPH)の11種の物質は、いずれも動物による発がん性が証明されているが、突然変異性テストでは陰性であった (Table 1)。

一方、1,2-Diethylhydrazine dicarboxalate (1,2-DED)、1,2-Diformylhydrazine (1,2-DFH)、Formic acid hydrazide (FAH)の3種の物質は、まだ発がん実験がなされていないが、変異性テストでは陰性であった。26物質中動物実験で発がん性の証明がなされている18物質のうち突然変異誘起作用をした物質は7種類 (38.8%)であった。

IV. 考 察

ヒトにおけるがんの80%は環境中に存在する化学発がん物質が原因であるといわれている³⁷⁾。この原因と結果が明確なものとして職業がんがある。例えば、塩化ビニールモノマーによる肝血管肉腫や、β-ナフチルアミンあるいはベンチジンによる膀胱がんの発生がある。また、食品添加物として知られる亜硝酸ソーダは、食物中のアミンと反応し、動物実験で強い発がん性が証明されているニトロソ化合物を生ずる。一方自然界に存在し食品にも発生するカビ (*Aspergillus flavus*) からの aflatoxin は強い肝がん発生作用のあることが知られている。また、医薬品として流産防止のために母親に用いられた Diethylstilbestrol は、その生れた娘が思春期に達する頃、膣がんを発生させる例が報告されている³⁸⁾。しかし、これら以外にも人の発がんに関与する未知の化学物質は多数環境中に存在することが推測される。従って簡便な screening test によって、環境中に存在する物質の発がん性を予測したり、労働衛生の分野に応用して職業がん

を予防するということは，今日重要な問題である。

Ames らによって開発・分離された *Salmonella* の菌株は，動物実験による長期の発がん性テストを補助するという意味で，第一次 screening test としての利用価値が高く評価されている。即ち，初期に用いられていた TA1535 シリーズの菌株に，薬剤耐性因子の R-plasmid を組み込むことによって改良した TA98 と TA100¹⁵⁾ は，種々の突然変異原物質に対し，著しく感度が高められているだけでなく，従来行われて来た種々の微生物を用いた突然変異性テストと異って，S-9 Mix による代謝活性を与える方法を取り入れたことである³⁹⁾。例えば，Acetylaminofluorene は従来発がん性が証明されていたが突然変異原性はない物質と考えられていたが，この物質は体内で代謝を受け，エステル化され最終発がん物質になることがわかった⁴⁰⁾。事実 *Salmonella* 菌でも S-9 Mix を加えることにより始めて突然変異原性を検出できることが証明された³⁹⁾。

Hydrazine (H) 及びその誘導体の数は数百種類にのぼるといわれるが，その用途も広く，ロケットの燃料として大量に用いられているだけでなく，工業化学物質や農業・医薬品の合成原料として，或いは中間原料として重要な物質となっている。Table 2, 3, 4 は26種類の化合物の中で実際に用いられているものについて，その代表的な用途を示した。1963～1964年の1年間の米国でのH及びその誘導体を作るためのHの総消費量は1,540万 kg で，このうちHとして498万 kg，1,1-DMHとして860万 kg である⁴¹⁾。Hと1,1-DMHの1:1の混合物は Aerozine 50⁴²⁾ と呼ばれ，宇宙ロケットの燃料として用いられているが，両者だけで全消費量の88%を占めている。ロケット燃料の需要が減少した1971年の米国での消費量は HH として230万 kg，この中40%はボイラー清浄剤，60%は工業化学物質として用いられているが，1,1-DMH の生産量は年間50万 kg といわれる⁴⁾。

Hは，T4 phage, ϕ 80 phage^{43,44)}, *B. Subtilis*⁴⁵⁾, ショージョーバエ⁴⁶⁾で，また大麦，トウモロコシ，ジャガイモ，イネ⁴⁷⁾やトマト⁴⁸⁾などの植物細胞で突然変異誘起性が示されている。さらに Host-mediated assay では陽性^{49,50)}を示したが，Dominant lethal test^{50,51)}では陰性である。Ames は，HS が TA1530 で S-9 Mix なしに陽性を示すことを報告¹¹⁾したが，この菌は，G46⁵²⁾ のヒスチジン要求株に gal. (inability to ferment galactose), bio. (nutritional requirement for biotin), chl. (resistance to chlorate), uvrB. (deficiency in DNA excision repair system) 等，遺伝子上に突然変異が起こっている菌であ

Table 2 Usage of substituted hydrazines in industry

Hydrazine:	Rocket fuel Reducing and corrosive agent Oxygen scavenger for boiler water Fuel cells Blowing agents Medicinals and Agricultural uses
Methylhydrazine:	Rocket fuel Corrosive agents
1,1-Dimethylhydrazine:	Rocket fuel
2-Hydroxyethylhydrazine:	Aluminium coating process
Carbamylhydrazine HCl:	Polymer stabilization Rubber vulcarization Tobacco smoke filter
Guanylhdyrazine HCl:	Material for dye stuffs, photo chemical and medicine
<i>p, p'</i> -Oxybisbenzene disulfonyl hydrazide:	Hardner
Phenylhydrazine HCl:	Materials of antipiretic agent Photochemical industry
Tolyhydrazine HCl:	As a reagent (Laboratory use)

Table 3 Usage of substituted hydrazines in agriculture

Hydrazine:	Herbicide
2-Hydroxyethylhydrazine:	Pineapple ripener
2-Methyl-4-chlorophenoxy-acetic acid hydrazide HCl:	Herbicide
Succinic acid 2,2-dimethylhydrazide:	Growth regulator
Thiosemicarbazide:	Insecticide

Table 4 Usage of substituted Hydrazines in medicine

1-Carbamyl-2-phenyl hydrazine:	Antipyretic agent
Isonicotinic acid hydrazide:	Tuberculosis treatment
Phenylhydrazine HCl:	Polycythemia vera
β -Phenylethylhydrazine sulfate:	Antidepressant

るが，さらに改良が加えられて rfa (deep rough), R-factor が組み込まれた TA100 で我々も陽性の結果を得た。この TA100 は，塩基置換型の変異原物質によって変異を生ずる。Brown ら⁵³⁾によれば，Hは purine base に対

しては影響を与えないが、高濃度の HH では pyrimidine ring のある thymine を 4-Methylpyrazolone に、cytosine を 5-Amino-3-pyrazoline に開裂させる。さらに、H の還元作用の本体である di-imide の生成により 5,6-Dihydrothymine の生成を促し、これが突然変異にとって重要な物質になるとのべている。

このように H は、微生物や植物細胞に対して細胞毒性を示すのみならず、*Xenopus laevis* に対して催奇形作用があり⁵⁴⁾、高等動物での毒性試験では、胃腸、肝、腎に対する障害を示すことが報告されている⁵⁵⁻⁵⁷⁾。

H のメチル化合物である MH, 1,1-DMH, 1,2-DMH は、ともに栄養素欠損培地で *E. Coli* に対して変異性を示す⁵⁸⁾が、1,1-DMH は Dominant lethal test⁵¹⁾ やマウスの精細胞に異常を生じさせない⁵⁹⁾。発がんが証明されている SADM³³⁾ は、Egyptian cotton leafworm を不妊⁴⁷⁾とし、大麦の染色体異常をおこす⁶⁰⁾。MH で Ehrlich ascites tumor cell を処理すると DNA の single strand break を生ずる⁶¹⁾が、ラット細胞を 1,2-DMH で処理しても同様にみられる⁶²⁾。Therman⁶³⁾ はメチル化合物である 1-Methyl-2-benzylhydrazine が *in vivo* で、Ehrlich ascites tumor cell の translocation を生ずることを報告している。MH や 1,2-DMH は、pyrimidine ring をこわし methylated pyrazoles を生じて、cytosine の 4 位の C の置換を形成するが、このような現象がメチル化合物の発がん性と組織特異性との関連を示唆している⁴⁷⁾という。しかしメチル化合物の発がん性の強さに比較し、*Salmonella* 菌による変異性テストでは、陽性の結果を示さず、わずかに Host-mediated assay によって G46 の菌で 1,2-DMH の変異原性が最近証明された⁶⁴⁾。

H にベンゼン環の一つついた PH は、皮膚から容易に吸収され血中に出現し⁶⁵⁾、Methemoglobin を発生⁶⁶⁾させる物質として知られ、Polycythemia vera の治療に用いられる²³⁾。*E. Coli* による変異性テスト⁶⁷⁾では陰性であったが、prophage induction 作用⁶⁸⁾がある。又、1-Methyl-1-phenylhydrazine sulfate にも同様の induction 作用が認められるが、PEH にはない⁶⁸⁾。著者らが行った結果では、PH 及び PEH ともに陽性を示したことは興味深い。

INH は、1952 年以来結核治療薬として世界中で広く使用されている。米国 (1970 年) では、10 万 kg、インド (1971 年) 11.8 万 kg、イタリア (1969 年) 27 万 kg、日本 (1971 年) 46 万 kg の量が年間生産されている⁴⁾。この物質の動物による発がん実験は、Juhász ら²⁾により初めて報告されて以来、Mori ら³⁾や他の研究者達⁴⁾により報告

されているが、いずれもマウスに肺腫瘍の発生が報告されているだけで、ラットやハムスターでの発がん性は報告されていない。

INH は体内で代謝され、発がん性のある⁸⁾ 1-Acetyl-2-isonicotinoyl hydrazine になることは、ヒトやサル尿中で証明されている⁶⁹⁾が、Isonicotinic acid や H への代謝は証明されていない。しかし微生物のある種のものでは、INH を H と Isonicotinic acid へ変えることができる⁷⁰⁾ことから、動物種による代謝の違いのあることが示唆され、これが発がん性と関係のあることが推測される。

一方 INH の突然変異原性に関しては、*E. Coli* では陰性⁶⁷⁾、prophage induction も示さない⁶⁸⁾が、*Salmonella* を用いた Host-mediated assay では陽性^{49,50)}を示し、さらに INH を投与したラット尿中代謝物の中に TA1535 で陽性を示す変異原物質の存在することが報告⁷¹⁾された。しかし、*in vitro* で H は陽性を示すのに対し、INH は陰性であることから、INH はラットやマウスの体内で H に代謝されるためと推測されるが、Dominant lethal test では H も INH もともに陰性^{50,51)}であった。

INH の細胞毒性や動物での発がん性は、まだ十分納得のいく結果が得られたとはいえないが、INH の投与を受けた結核患者の疫学調査では、いずれも統計的に有意な肺がんの発生は認められない。しかしこれら調査そのものが結核治療を始めて 15 年間という短期間の調査結果であることから、ヒトでの発がん作用を全く否定できない⁴⁾とも言われ、子供に対する予防投薬も、発がん作用の有無が明らかになるまで控えた方がよい²²⁾という意見もある。

2HE は、パイナップル農場で発育促進剤として大量に散布され、弱い発がん性が証明されている^{20,21)}。突然変異性については、*Salmonella* TA1535 と TA100 で弱陽性¹¹⁾を示したが、prophage induction 作用はない⁶⁸⁾。

24D は、今回検討した 26 種類中最も強い変異原性を示した物質で、しかも S-9 Mix の有無にかかわらず 3 菌株ですべて陽性を示したが、prophage induction 作用は陰性を示している⁶⁸⁾。ベンチジン誘導体で、アミノ基の代りにニトロ基の入った 4,4'-Dinitrodiphenyl や 4-Nitrodiphenyl では、いずれも TA98 と TA100 で S-9 Mix の有無にかかわらず強い変異原性のあることを報告した⁷²⁾が、24D の場合の変異原性は、ヒドラジン基よりむしろニトロ基の存在によるものと考えられる。

Ames らの開発・分離した *Salmonella* 菌を用いた突然変異誘起性テストでの McCann や Sugimura 等の報

告^{11,12)}では，動物実験ですでに発がん性の証明された化学物質の85～90%が同時に突然変異誘起性を示し，発がん性が示されなかった物質の73～87%は同時に変異原性も証明されなかったという。しかしヒドラジン化合物に限ってみた場合の著者らの結果では，発がん性が証明された18物質中，変異原性を示した物質は7種類(38.8%)であった。特に，強い発がん性を示したメチル化合物では，いずれも変異原性が検出されなかったことは興味深い。

今日数多くのヒドラジン化合物が幅広く使用されているにもかかわらず，人では数例の中毒および，死亡事故⁷³⁻⁷⁶⁾と，ロケット燃料取扱い作業者に肝の生化学的変化と脂肪肝の発生の報告⁷⁷⁾があるにすぎず，発がんの報告はない。ヒドラジン化合物は，近代化学工業に伴って出現した man-made の化学物質であるというだけでなく，自然界にも天然の食用キノコ類の中に⁹⁾，或いはタバコの煙中⁷⁸⁾にも存在することから，注意を払う必要がある。

食品添加物である亜硝酸とアミンの反応で動物に強い発がん性を示すニトロ化合物が生成されることはよく知られた事実であるが，Ames の原法では，突然変異原性を検出することはできなかった。しかし，この Ames の原法に，さらに preincubation の方法を取り入れることにより，それが可能となった。今後さらに，S-9 Mix の改良，菌株の種類の選択，pH の調整，incubation time の検討等，条件を種々検討し，もっと検出率を上げるべく研究を進めていきたい。

V. 結 語

Hydrazine およびその誘導体は，今日工業化学物質としてのみならず医薬品，農業等の原料あるいは中間原料として幅広く使用されている。著者らは，これら26種類の化合物について，最近微生物の突然変異性を示標として発がん物質の第一次 screening test として実用化されている Ames の *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1537 の3菌株を用いて，その突然変異誘起性と発がん性との関係を検討した結果，次のような結果を得た。

1. 塩基置換型変異原物質によって変異を生ずる TA-100 では，2-Hydroxyethylhydrazine, Phenylhydrazine HCl, *p*-Tolylhydrazine HCl, β -Phenylethylhydrazine sulfate, 2,4-Dinitrophenylhydrazine, Butylhydrazine oxalate, *p*, *p'*-Oxybisbenzen disulfonylhydrazide の7種類が，S-9 Mix を加えても加えなくても陽性を示した。

Hydrazine hydrate 及び Hydrazine sulfate の2種類

は，S-9 Mix を加えた時のみ陽性を示した。

2. フレームシフト型変異原物質によって変異を生ずる TA98 及び TA1537 では，ともに，Phenylhydrazine HCl, *p*-Tolylhydrazine HCl, 2,4-Dinitrophenylhydrazine の3化合物でのみ，S-9 Mix の有無にかかわらず陽性を示した。但し Phenylhydrazine HCl, *p*-Tolylhydrazine HCl の2物質は，TA98 で S-9 Mix を加えた時のみ陽性を示した。

3. 26種の Hydrazine 化合物のうち，動物実験により発がん性の証明されている物質は18種類，一方突然変異誘起性を示したものは9種類であった。発がん性の証明された18種類のうち突然変異誘起性と一致したものは7種類(38.8%)であった。残り2種類の化合物の発がん性は，まだ検討されていない。

謝 辞

稿を終るに当り，本研究に用いた化学物質を提供下さった Prof. Bela Toth (Eppley Cancer Institute, University of Nebraska, USA) に，また，サルモネラ菌を分与下さった杉村隆教授(国立ガンセンター所長)に深く感謝いたします。

本研究に終止御協力下さった教室の各位に感謝いたします。

本研究の一部は，文部省の科学研究費によった。

文 献

- 1) Audrieth, L. F. and Ogg, B. A.: The chemistry of Hydrazine. John Wiley & Sonc, Inc., New York, (1951).
- 2) Juhász, J., Baló, J. and Kendrey, G.: Über die geschwulsterzeugende Wirkung des Isonicotinsäurehydrazid (INH), Z. Krebsforsch., **62**, 188-196 (1957).
- 3) Mori, K. and Yasuno, A.: Preliminary note on the induction of pulmonary tumors in mice by Isonicotinic acid hydrazide feeding, Gann, **50**, 107-110 (1959).
- 4) IARC Monographs: Hydrazine and derivatives. In "Evaluation of carcinogenic risk, Vol. 4", p. 125-172, International Agency for Research on Cancer, Lyon (1974).
- 5) Juhász, J., Baló, J. and Szende, B.: Tumour inducing effect of hydrazine in mice, Nature (Lond.), **310**, 1377 (1966).
- 6) Roe, F. J. C., Grant, G. A. and Milligan, D. M.:

- Carcinogenicity of hydrazine and 1,1-dimethylhydrazine for mouse lung, *Nature (Lond.)*, **216**, 375 (1967).
- 7) Toth, B.: The biological effect of oral administration of isonicotinic acid in mice, *Arch. environm. Hlth.*, **20**, 343-349 (1970).
- 8) Toth, B. and Shimizu, H.: Lung carcinogenesis with 1-Acetyl-2-isonicotinoylhydrazine, the Major metabolite of Isoniazid, *Europ. J. Cancer*, **9**, 285-289 (1973).
- 9) Toth, B.: Synthetic and Naturally Occurring Hydrazines as Possible Cancer Causative Agents, *Cancer Res.*, **35**, 3693-3697 (1975).
- 10) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test, *Mut. Res.*, **31**, 347-364 (1975).
- 11) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135-5139 (1975).
- 12) Sugimura, T., Sato, S., Nagao, M., Yahagi, T., Matsushima, T., Seino, Y., Takeuchi, M. and Kawachi, T.: Overlapping of Carcinogens and Mutagens. In "Foundamentals in Cancer Prevention" (Editor: P. N. Magee et. al.), p. 191-215, University of Tokyo Press, Tokyo/University Park Press, Baltimore (1976).
- 13) 矢作多貴江: 環境中の発がん物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について, 蛋白質・核酸・酵素, **20**, 1178-1189 (1975).
- 14) Sugimura, T., Yahagi, T., Nagao, M., Takeuchi, M., Kawachi, T., Hara, K., Yamasaki, E., Matsushima, T., Hashimoto, Y. and Okada, M.: Validity of mutagenicity tests using microbes as a rapid screening method for environmental carcinogens. In "Screening test in chemical carcinogenesis, IARC Scientific Publication No. 12" (Editor: R. Montesano, et. al.), p. 81-101, International Agency for Research on Cancer, Lyon (1976).
- 15) Ames, B. N., Lee, F. D. and Durston, W. E.: An improved bacterial test system for the detection and classification of Mutagens and Carcinogens, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 782-786 (1973).
- 16) 清水英佑, 橋田ちせ, 竹村 望: Hydrazine hydrate によるマウス肺および血管系腫瘍の発生と突然変異性について, 第36回日本癌学会総会記事, p. 46 (1977).
- 17) Toth, B.: Lung tumor induction and inhibition of breast adenocarcinomas by Hydrazine sulfate in mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, **42**, 469-475 (1969).
- 18) Biancifiori, C., Giornell-Santill, F. E., Millia, U. and Severi, L.: Pulmonary tumours in rats induced by oral Hydrazine sulfate, *Nature*, **212**, 414-415, (1966).
- 19) Shimizu, H., Nagel, D. and Toth, B.: Ethylhydrazine hydrochloride as a tumor inducer in mice, *Int. J. Cancer*, **13**, 500-505 (1974).
- 20) Innes, J. R. M., Ulland, B. M., Valerio, M. G., Petrucell, L., Fishbein, L., Hart, E. R., Pallotta, A. J., Bates, R. R., Falk, H. L., Gart, J. J., Klein M., Mitchell, I. and Peters, J.: Bioassay of Pesticides and Industrial Chemicals for Tumorigenicity in Mice: A Preliminary Note, *J. Natl. Cancer Inst.*, **42**, 1101-1114 (1969).
- 21) Shimizu, H. and Toth, B.: Effect of lifetime administration of 2-Hydroxyethylhydrazine on tumorigenesis in Hamsters and Mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**, 903-906 (1974).
- 22) Clayson, D. B., Biancifiori, C., Milia, U. and Giornelli-Santilli, F. E.: The induction of pulmonary tumors in BALB/c/Cb/Se mice by derivatives of hydrazine In "Lung Tumors in Animals" (Editor: L. Severi), p. 869-880, *Proc. Quadremn. Conf. on Cancer*, Perugia, Italy (1966).
- 23) Toth, B. and Shimizu, H.: Tumorigenic effects of chronic administration of Benzylhydrazine dihydrochloride and Phenylhydrazine hydrochloride in Swiss mice, *Z. Krebsforsch.*, **87**, 267-273 (1976).
- 24) Toth, B.: Tumorigenicity of β -Phenylethylhydrazine sulfate in mice, *Cancer Res.*, **36**, 917-921 (1976).
- 25) Toth, B., Tompa, A. and Patil, K.: Tumorigenic effect of 4-Methylphenylhydrazine Hydrochloride in Swiss mice, *Z. Krebsforsch.*, **89**, 245-252 (1977).
- 26) Nagel, D., Shimizu, H. and Toth, B.: Tumor induction studies with *n*-Butyl- and *n*-Propyl-hy-

- drazine hydrochlorides in Swiss mice, *Europ. J. Cancer*, **11**, 473-478 (1975).
- 27) Toth, B.: Hydrazine, Methylhydrazine and Methylhydrazine sulfate carcinogenesis in Swiss mice. Failure of Ammonium hydroxide to interfere in the development of tumors, *Int. J. Cancer*, **9**, 109-118 (1972).
- 28) Toth, B. and Shimizu, H.: Methylhydrazine tumorigenesis in Syrian Golden Hamsters and the Morphology of Malignant Histiocytomas, *Cancer Res.*, **33**, 2744-2753 (1973).
- 29) Toth, B.: 1,1-Dimethylhydrazine (Unsymmetrical) carcinogenesis in Mice. Light microscopic and ultrastructural studies on neoplastic blood vessels, *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**, 181-194 (1973).
- 30) Druckrey, H., Preussmann, R., Matzkies, F. and Ivankovic, S.: Selektive Erzeugung von Darmkrebs bei Ratten durch 1, 2-Dimethylhydrazin, *Naturwissenschaften*, **54**, 285-286 (1967).
- 31) Toth, B. and Wilson, R. B.: Blood vessel tumorigenesis by 1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride (Symmetrical), *Am. J. Path.*, **64**, 585-600 (1971).
- 32) Toth, B., Shimizu, H. and Erickson, J.: Carbamylhydrazine hydrochloride as a lung and blood vessel tumor inducer in Swiss mice, *Europ. J. Cancer*, **11**, 17-22 (1975).
- 33) Toth, B. and Tompa, A.: Tumor induction with Succinic acid 2, 2-dimethylhydrazide, A plant growth regulant, *Proc. Am. J. Path.*, **86**, 25a-26a (1977).
- 34) Toth, B.: Benzoylhydrazine carcinogenesis in Lungs and Lymphoreticular tissues of Swiss mice, *Europ. J. Cancer*, **8**, 341-345 (1972).
- 35) Toth, B. and Shimizu, H.: 1-Carbamyl-2-phenylhydrazine tumorigenesis in Swiss mice. Morphology of Lung Adenomas, *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**, 241-251 (1974).
- 36) 未発表.
- 37) Boyland, E.: A. Chemist's view of cancer Prevention, *Proc. R. Soc. Med.*, **60**, 93-99 (1967).
- 38) Shubik, P. and Clayson, D. B.: Environmental Cancer and Chemical Agents 1976, *Ann. Int. Med.*, **85**, 120-122 (1976).
- 39) Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E. and Lee, F. D.: Carcinogens are Mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2281-2285 (1973).
- 40) Miller, E. C. and Miller, J. A.: The mutagenicity of chemical carcinogens-correlations, problems, and interpretation. In "Chemical Mutagens-Principles and methods for their detection, Vol. 1" (Editor: A. Hollaender) p. 83, Plenum Press, New York (1971).
- 41) Raphaelian, L. A.: Hydrazine and its derivatives, In "Encyclopedia of Chemical Technology, 2nd edition, Vol. 11" (Editors: R. E. Kirk & D. F. Othmer), p. 164-196, John Wiley & Sons, Inc., New York (1966).
- 42) Plunkett, E. R.: Handbook of Industrial Toxicology, Chemical Publishing Co., Inc., New York, N. Y. (1976).
- 43) Freese, E., Bautz, E. and Freese, E. B.: The chemical and mutagenic specificity of hydroxylamine, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **47**, 845-855 (1961).
- 44) Chu, B. C. F., Brown, D. M. and Burdon, M. G.: Effect of nitrogen and of catalase on hydroxylamine and hydrazine mutagenesis, *Mut. Res.*, **20**, 265-270 (1973).
- 45) Freese, E. B., Gerson, J., Taber, H., Rhaese, H. J. and Freese, E.: Inactivating DNA alterations induced by peroxides and peroxide-producing agents, *Mut. Res.*, **4**, 517-531 (1967).
- 46) Jain, H. K. and Shukla, P. T.: Locus specificity of mutagens in Drosophila, *Mut. Res.*, **14**, 440-442 (1972).
- 47) Kimball, R. F.: The mutagenicity of hydrazine and some of its derivatives, *Mut. Res.*, **39**, 111-126 (1977).
- 48) Jain, H. K. and Raut, R. N.: Differential response of some Tomato genes to base-specific mutagens, *Nature*, **211**, 652 (1966).
- 49) Kehler, E., Röhrborn, G., Propping, P. and Buselmaier, W.: Zur Mutagenität des INH, *Pneumologie*, **148**, 223-226 (1973).
- 50) Röhrborn, G., Propping, P. and Buselmaier, W.: Mutagenic activity of isoniazid and hydrazine in

- mammalian test systems, *Mut. Res.*, **16**, 189-194 (1972).
- 51) Epstein, S. S., Arnold, E., Andrea, J., Bass, W. and Bishop, Y.: Detection of chemical mutagens by the dominant lethal assay in the mouse, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **23**, 288-325 (1972).
- 52) Rosenkranz, H. S., Speck, W. T. and Gutter, B.: Microbial assay procedures, Experience with two systems: In "In vitro metabolic activation in mutagenesis testing" (Editors: F. J. de Serres, J. R. Fouts, J. R. Bend, and R. M. Philpot), p. 337-363, North-Holland Publishing Co., Amsterdam-New York-Oxford (1976).
- 53) Brown, D. M., McNaught, A. D. and Schell, P.: The chemical basis of hydrazine mutagenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 967-971 (1966).
- 54) Greenhouse, G.: Evaluation of the teratogenic effects of Hydrazine, Methylhydrazine and Dimethylhydrazine on Embryos of *Xenopus laevis*, the South African Clawed Toad, *Teratology*, **13**, 167-178 (1976).
- 55) Krop, S.: Toxicology of Hydrazine, *Arch. Indust. Hyg. Occup. Med.*, **9**, 199-204 (1954).
- 56) Comstock, C. C., Lawson, L. H., Greene, E. A. and Oberst, F. W.: Inhalation toxicity of Hydrazine vapor, *Arch. Indust. Hyg. Occup. Med.*, **10**, 476-490 (1954).
- 57) Prescott, B., Kauffmann, G. and James, W. D.: A means of reducing Hydrazine toxicity in Mice, *Arch. Indust. Hlth.*, **13**, 24-28 (1956).
- 58) Lingens, V. F.: Erzeugung biochemischer Mangelmutanten von *Escherichia coli* mit Hilfe von Hydrazin und Hydrazinderivaten, *Z. Naturforschung*, **19b**, 151-156 (1964).
- 59) Wyrobeck, A. J. and Bruce, W. R.: Chemical induction of sperm abnormalities in mice, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 4425-4429 (1975).
- 60) Wu, K. D. and Grant, W. F.: Chromosomal aberrations induced by a plant growth retarding chemical (B-995) in barley (*Hordeum vulgare*), *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **8**, 191-198 (1967).
- 61) Moroson, H. and Furlan, M.: Single-strand breaks in DNA of Ehrlich ascites tumor cells produced by methylhydrazine, *Radiat. Res.*, **40**, 351-365 (1969).
- 62) Kanagalingam, K. and Balis, M. E.: Chemically induced damage of rat intestinal DNA and its apparent repair in vivo, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **15**, 46 (1974).
- 63) Therman, E.: Chromosome breakage by 1-Methyl-2-benzylhydrazine in Mouse Cancer Cells, *Cancer Res.*, **32**, 1133-1136 (1972).
- 64) 森谷正明, 加藤貴美江, 太田敏博, 渡辺佳津子, 渡辺淑子, 白須泰彦: 宿主経路試験による 1, 2-dimethylhydrazine の突然変異誘起性の検出, 日本環境変異原研究会第6回研究発表会, 予稿集, p. 29 (1977).
- 65) Smith, E. B. and Clark, D. A.: The absorption of Monomethylhydrazine through canine skin, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **131**, 226-232 (1969).
- 66) Clark, D. A. and Fortney, S. R.: Methemoglobinemia as an indicator of exposure to Monomethylhydrazine, *Aerospace Med.*, **38**, 1230-1234 (1967).
- 67) Szybalski, W.: Special microbiological systems. II. Observations on chemical mutagenesis in microorganisms, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **76**, 475-489 (1958).
- 68) Heinemann, B.: Prophage induction in Lysogenic *Escherichia coli* with simple Hydroxylamine and Hydrazine Compounds, *Appl. Microbiol.*, **21**, 726-731 (1971).
- 69) Hughes, H. B.: On the metabolic fate of Isoniazid, *J. Pharma. Exp. Ther.*, **109**, 444-452 (1953).
- 70) Toida, I.: Isoniazid-Hydrolyzing enzyme of microbacteria, *Am. Rev. resp. Dis.*, **85**, 720-726 (1962).
- 71) Stoltz, D. R. and Miller, C. T.: Mutagenic activity in urine concentrates from rats orally dosed with a chemical which itself is inactive in the Ames test with microsomal activation, *Mut. Res.*, **31**, 325-326 (1975).
- 72) 清水英祐, 竹村 望: 芳香族アミノおよびニトロ化合物の変異性と発がん性についての検討, *産業医学*, **18**, 138-139 (1976).
- 73) Frost, J. and Hjorth, N.: Contact dermatitis from Hydrazine hydrochloride in Soldering Flux. Cross sensitization to Apresoline and Isoniazid, *Acta Dermato-Venereologica*, **39**, 82-86 (1959).
- 74) Wheeler, C. E., Penn, S. R., Cawley, E. P. and

- Hill, C.: Dermatitis from Hydrazine hydrobromide Solder Flux, *Arch. Dermat.*, **91**, 235-239 (1965).
- 75) Høvdig, G.: Occupational dermatitis from Hydrazine hydrate used in boiler protection, *Acta Dermato-Venereologica*, **47**, 293-297 (1967).
- 76) Sotaniemi, E., Hirvonen, J., Isomaki, H., Takku-men, J. and Kaila, J.: Hydrazine toxicity in the human, *Ann. Chemical Res.*, **3**, 30-33 (1971).
- 77) Petersen, P., Bredahl, E., Lauritsen, O. and Laur-sen, T.: Examination of the liver in personnel working with liquid rocket propellant, *Brit. J. industr. Med.*, **27**, 141-146 (1970).
- 78) Liu, Y. Y., Schmeltz, I. and Hoffman, D.: Chemical studies on Tobacco Smoke. Quantitative analysis of Hydrazine in Tobacco and Cigarette Smoke, *Anal. Chem.*, **46**, 885-889 (1974).

(受付 1977年12月5日)