

論文目録

氏名 宇野 芳文



学位論文
題

目 環境中の非変異・がん原性物質に対する早期
検出法の検討—ラット肝複製DNA合成(RDS)
試験法の確立—

学位論文の基礎となる学術論文

題 目 In vivo-in vitro replicative DNA synthe-
sis (RDS) test using perfused rat livers
as an early prediction assay for non-
genotoxic hepatocarcinogens: I. estab-
lishment of a standard protocol

著 者 名 Uno, Y., Takasawa, H., Miyagawa, M.,
Inoue, Y., Murata, T., Ogawa, M. and
Yoshikawa, K.

学術雑誌名 Toxicology Letters に(発表)・発表予定
(巻・号・頁) (63・2・191~199)
発行年月 1992年 11月

題 目 In vivo-in vitro replicative DNA synthe-
sis (RDS) test using perfused rat livers
as an early prediction assay for non-
genotoxic hepatocarcinogens: II. assess-
ment of judgement criteria

著 者 名 Uno, Y., Takasawa, H., Miyagawa, M.,
Inoue, Y., Murata, T., Ogawa, M. and
Yoshikawa, K.

学術雑誌名 Toxicology Letters に(発表)・発表予定
(巻・号・頁) (63・2・201~209)
発行年月 1992年 11月

題 目 An in vivo-in vitro replicative DNA syn-
thesis (RDS) test using rat hepatocytes
as an early prediction assay for non-
genotoxic hepatocarcinogens: screening of
22 known positives and 25 noncarcinogens

著 者 名 Uno, Y., Takasawa, H., Miyagawa, M.,
Inoue, Y., Murata, T. and Yoshikawa, K.

学術雑誌名 Mutation Research に発表・発表予定
(巻・号・頁) (in press)
発行年月 1993年 12月

既発表学術論文

題 目 変異原性試験実施の立場から—ラット肝複製DNA合成(RDS)試験の推奨—

著 者 名 宇野芳文, 岩瀬裕美子, 吉川邦衛

学術雑誌名 環境変異原研究 に(発表)・発表予定
(巻・号・頁) (14・1・85~92)
発行年月 1992年 6月

題 目

著 者 名

学術雑誌名 〃 に発表・発表予定
(巻・号・頁) (・・~)
発行年月 年 月

題 目

著 者 名

学術雑誌名 〃 に発表・発表予定
(巻・号・頁) (・・~)
発行年月 年 月

題 目

著 者 名

学術雑誌名 〃 に発表・発表予定
(巻・号・頁) (・・~)
発行年月 年 月

環境中の非変異・がん原性物質に対する
早期検出法の検討 ―ラット肝複製
DNA合成(RDS)試験法の確立―

1993年

岐阜大学大学院
総合数理学研究科
(東京農工大学)

宇野芳文

環境中の非変異・がん原性物質に対する
早期検出法の検討 —ラット肝複製
DNA合成(RDS)試験法の確立—

宇 野 芳 文

目次

序論	1
第1章 ラット肝複製DNA合成 (replicative DNA synthesis, RDS) 試験法における肝細胞培養密度および肝RDS自然誘発率の検討	3
第1節 緒言	3
第2節 実験材料および実験方法	4
第3節 実験結果	9
3-1 非変異・肝がん原性物質によるラット肝RDS誘発に対する肝細胞培養密度の影響	9
3-2 各種週齢のラットから分離した肝細胞におけるRDS自然誘発率の測定	10
3-3 9週齢のラットから分離した肝細胞における肝RDS自然誘発率の分布	11
第4節 考察	11
第5節 結語	13
第2章 ラット肝RDS試験法の判定基準の検討	17
第1節 緒言	17
第2節 実験材料および実験方法	18
第3節 実験結果	21
3-1 化学物質による肝RDS誘発に対する経時変化の測定	21
3-2 化学物質による肝RDS誘発に対する用量反応性の測定	22

第 4 節	考 察	23
第 5 節	結 語	25
第 3 章	ラット肝 RDS 試験法の評価 —22 種類の非変異・肝がん 原性物質と 25 種類の非がん原性物質に対するスクリー ニング結果	29
第 1 節	緒 言	29
第 2 節	実験材料および実験方法	29
第 3 節	実験結果	33
3-1	非変異・肝がん原性物質の肝 RDS 試験の結果	33
3-2	非がん原性物質の肝 RDS 試験の結果	35
第 4 節	考 察	36
第 5 節	結 語	41
結 論		56
謝 辞		57
文 献		59

序論

環境化学物質のがん原性は、現在げっ歯類を用いるがん原性試験で評価されている。このがん原性試験は検体を1.5～2年間動物に継続して投与し、病理学的に検索するため、結果を得るには約3年を必要とする。したがって、環境中に放出される全ての新規化学物質に現行のがん原性試験を適用することは不可能である。

このがん原性物質の短期スクリーニングとして、変異原性試験が国際的にも広く普及し、医薬や農薬の開発ならびに環境汚染のモニタリングに実績をあげてきた。しかしながら現在では、変異原性試験（特にAmes試験）の結果が陰性を示しながらも、げっ歯類にがん原性を誘発する、いわゆる非変異原性のがん原性物質（非変異・がん原性物質）が既知がん原性物質の30～40%をも占めることが判明するに至り(62)、その短期検出法の確立が急務となっている(24)。

このような非変異・がん原性物質の存在が多数報告されるに至った主原因は、変異原性試験が、多段階発がん誘発説に基づく発がんイニシエーション作用のみにその検出スペクトルをおき、発がんプロモーション作用を見逃してきたためと推察される(62)。本論文では、発がんプロモーション作用を指標とした非変異・がん原性物質の検出法の確立とその妥当性を検討した。

近年、発がんプロモーターの主作用として細胞増殖作用が注目されており(10, 57)、その細胞増殖作用をみる指標としてはproto-oncogenesの発現、プロテインキナーゼCやオルニチン脱炭酸酵素の活性化など(22, 47)が報告されている。しかしながら、これらの指標には例外もあり、そのため著者はこれらの指標をみるよりも直接細胞増殖を指標にした非変異・がん原性物質の短期検出法の方が有効と考え、細胞増殖作用を複製DNA合成(replicative DNA

synthesis, RDS) の促進の有無から判定する手法を選択した。この方法を用いるに至った理由の1つは、発がんプロモーターが標的臓器に対して細胞増殖を誘発し、この現象ががん原性の誘発と極めて密接に関連している事実がある (7, 10, 24, 31, 57)。さらに、上述の発がんプロモーターのもつ各種の生化学的特徴が総合的かつ最終的な生物指標としてRDSの誘発に集約されるものと判断され、また非変異・がん原性物質の短期検出法として各種臓器を用いたRDS試験法の可能性を指摘している報告もみられる (6, 14, 15, 19, 32, 35)。

非変異・がん原性物質は、その32%がラットの、また76%がマウスの肝にがん原性を示すこと (21) から、特に非変異・肝がん原性物質による肝RDS誘発に対する測定法を確立することがスクリーニングには有効と思われた。そこで本研究においては、ラット肝におけるRDS誘発測定法を確立すること、ならびにその非変異・肝がん原性物質に対する検出精度の検討を行った。

最初に、ラット肝RDS試験に最適な実験条件を確立する目的で、肝細胞培養密度とラットの週齢ならびに肝RDS自然誘発率の分布と範囲について検討した (63)。次に、代表的な非変異・肝がん原性物質と非がん原性物質を使用して、肝RDS自然誘発率に基づく判定基準を設定した (64)。最後に、ラット肝RDS試験に22種類の非変異・肝がん原性物質と25種類の非がん原性物質を使用して本RDS試験に対する総合検出率を算出し、本試験の非変異・肝がん原性物質に対する短期スクリーニングとしての妥当性を評価した (65)。

第1章 ラット肝複製DNA合成 (replicative DNA synthesis, RDS) 試験法における肝細胞培養密度および肝RDS自然誘発率の検討

第1節 緒言

ラット肝RDS試験は、従来のin vivo-in vitro肝不定期DNA合成 (unscheduled DNA synthesis, UDS) 試験に付随して実施されてきた。UDS試験はある化学物質がDNA損傷を起こした場合、その損傷部位にDNA除去修復が誘導され、そこで合成されたDNAを[methyl-³H]thymidineで標識し、化学物質がもつ変異原性（発がんイニシエーション活性）をDNA修復合成の測定という手段で検出する方法である。その具体的手法は、最終的にオートラジオグラフ上で観察される細胞核内のグレイン数から核と同一面積の細胞質内のグレイン数を減じて評価されているため、UDS試験の肝細胞培養条件は肝細胞質中のグレイン数（バックグラウンド）を低く抑えることを目的に設定されてきた（8）。しかしながら、その培養条件が肝RDSの観察にそのまま適用できるか否かは不明である。

特に、正常な初代培養肝細胞の増殖には肝細胞の培養密度が密接に関与し、subconfluentな状況では肝細胞は盛んに増殖するが、confluentな状況では増殖しないことが報告されている（43）。つまり肝細胞が相互に密着した状態では増殖が抑制されることから、化学物質のin vivo処理後のin vitroでの肝細胞のRDS誘発にも細胞培養密度が深く関与していることが予想された。しかしながら、既報では、RDSの観察に際してこの点を十分に検討しているものは極めて少ない。

また、既報におけるラット肝RDSの自然誘発率（コントロール値）は報告者によりかなり異なっており（5, 9, 33, 40, 41, 60）、そ

の主原因は使用するラットの週齢が画一化されていないためと推測された。したがって、ラット肝RDS試験を非変異・肝がん原性物質のスクリーニング法として使用するには、コントロール値が安定していること、ならびにその分布と範囲を把握することが必要である。

本研究では、

- (1) 肝RDS誘発が最も感度良く検出される肝細胞培養密度を検討するために、雄性F344ラットに対して3種類の非変異・肝がん原性物質(carbon tetrachloride, clofibrateおよびdiethylstilbestrol)を投与し、肝RDS誘発率を調べた(63)。
- (2) 5~13週齢の雄性F344ラットを用い、肝RDSの自然誘発率が一定の値を示すラットの週齢について検討した(63)。
- (3) 検体の投与により誘発された肝RDSが明らかな陽性反応であることを判定する基準を設定するために、上記(1)、(2)の結果に基づき9週齢の雄性F344ラットの肝RDSの自然誘発率の分布と範囲を検討した(63)。

第2節 実験材料および実験方法

2-1 動物

本研究では、がん原性試験で最も汎用される雄性のF344ラット(日本チャールスリバー)を使用した。入手したラットは、室温20-24℃、湿度40-70%、照明7:00 am-7:00 pmの環境下で飼育し、実験動物用固形飼料MF(オリエンタル酵母工業)および水道水を自由摂取させ、入手後10日間以上馴化および検疫したのち供試した。

異なった週齢のラットの肝RDS自然誘発率を測定する目的で、5週齢(体重:89-100 g)、7週齢(体重:149-178 g)、8週齢(体重:188-

215 g), 9週齡 (体重:217-243 g), 10週齡 (体重:233-264 g), 11週齡 (体重:256-293 g)および13週齡 (体重:278-310 g)のラットを用いた。以上の実験は, 異なった時期に各週齡4匹の動物を入手して計3回実施した。他の2つの実験では, すべて9週齡のラットを使用した。

2-2 被験物質

最適の肝細胞培養密度を検討する目的で, 肝RDSを誘発することが知られている既知の非変異・肝がん原性物質 (31, 61, 66) carbon tetrachloride (純正化学), clofibrateおよびdiethylstilbestrol (東京化成) を使用した。これらは各々異なる肝毒性作用, すなわちcarbon tetrachlorideは肝細胞傷害性 (71), clofibrateは肝ペルオキシゾーム増殖性 (61), diethylstilbestrolはホルモン様作用 (25) をもつことで既に知られている。

これらの被験物質はすべてコーン油 (ハヤシケミカル) で用時に懸濁して使用した。

2-3 被験物質の投与

体重別層化無作為抽出法により, ラットを必要に応じて1群4または5匹に群分けしたのち, 金属性胃ゾンデを用いて各被験物質または陰性対照物質 (コーン油または精製水) を単回で強制経口投与 (10 ml/kg体重) した。投与用量は各被験物質のLD50値の $\frac{1}{2}$ 量 (maximum tolerated dose, MTD) あるいは $\frac{1}{4}$ 量 ($\frac{1}{2}$ MTD)を用いた。すなわち, carbon tetrachlorideは700 mg/kg体重を, clofibrateは235 mg/kg体重を, diethylstilbestrolは1,000 mg/kg体重を動物に投与した。

各化学物質を投与した動物はcarbon tetrachloride投与例では48時間後に、clofibrateまたはdiethylstilbestrol投与例では24時間後に屠殺し、以下に示す方法で肝細胞を採取した。これらの屠殺時期は、予備実験の結果に基づき、肝RDSの最大誘発値が認められる時間を選択した。

2-4 試薬の調製

中村 (44) およびSawadaら (56)の方法を参考にして、肝細胞の分離用にHanks液、前灌流液およびコラゲナーゼ液を、培養用にWilliams' E (WE)培養液を調製した。調製に必要な試薬はすべて特級を使用した。

Hanks液は、NaClの8 g, KClの400 mg, KH_2PO_4 の60 mg, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の90 mg, D-glucoseの1 gおよびphenol redの10 mgを蒸留水に溶解して1ℓにメスアップし、1N NaOHでpH 7.2-7.3に調整したのちミリポアフィルター (0.22 μm) で濾過滅菌して調製した。試薬はすべて純正化学のものを使用した。

前灌流液は、EGTA (Sigma) の195 mg, HEPES (和光純薬) の2.39 g および NaHCO_3 (純正化学) の350 mgをHanks液 1ℓに溶解し、10N NaOHでpH 7.2-7.3に調整したのちミリポアフィルター (0.22 μm) で濾過滅菌して調製した。

コラゲナーゼ液は、牛血清アルブミン (Armour Pharmaceutical) の10 g, HEPES (和光純薬) の2.39 g, trypsin inhibitor type II (Sigma) の50 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (純正化学) の560 mgおよび NaHCO_3 (純正化学) の350 mgをHanks液1ℓに溶解して10N NaOHでpH7.2-7.3に調整した溶液にcollagenase type IV (和光純薬)の500 mgを添加してスターラーで約1 h 攪拌溶解し、10N NaOHでpH7.5 に調整後ミ

リポアフィルター (0.22 μ m) で濾過滅菌して調製した。

WE培養液は, Williams' E 粉末培地 (Flow Laboratories) の 10.99 g, NaHCO_3 (純正化学) の 1.5 g, カナマイシン溶液 (5 mg/ml, Flow Laboratories) の 20 ml, ファンギソン溶液 (Flow Laboratories) の 10 ml およびインシュリン (Sigma) の 4 mg を蒸留水に溶解して 1 ℓ にメスアップし, さらに牛胎仔血清 (Bio cell) の 100 ml を添加したのち 1N HCl で pH 7.2 に調整し, ミリポアフィルター (0.22 μ m) で濾過滅菌して調製した。

上述の溶液はすべて使用時まで 4°C で保管した。

2-5 肝細胞の分離, 培養, 固定ならびに染色

肝細胞の分離, 培養は, Seglen (59) および中村 (44) の方法に多少改良を加え実施した。

肝細胞分離のための肝灌流用装置を Fig. 1 に示す。前灌流液およびコラゲナーゼ液は事前にウォーターバスで 42-45°C に加温し, 室温 25°C 以上の部屋で肝灌流を実施した。ラットに Nembutal (Abbott) の 0.2 ml/匹を腹腔内投与し, 麻酔下でラットの正中線にそって皮膚および腹膜を切開したのち, 肝門脈を露出させた。肝門脈をピンセットで保持し, 留置針 (ハッピーキャス Z 18G, メディキャット) を肝門脈内に刺入し, 動脈クレンメで留置針を固定した。ペリスタポンプのスイッチをいれ, 前灌流液を流速 14 ml/分で流し始め, その直後に腹大動脈を切開して肝を脱血した。肝を前灌流液で 5 分間灌流したのち三方活栓のコックを切り換え, 引き続きコラゲナーゼ液で 7 分間灌流した。灌流終了後, 肝を摘出し, Hanks 液を入れたシャーレ内で手術用メスを用いて肝を細切した。シャーレに冷 Hanks 液を約 30ml 添加して, これを肝細胞濾過器 (池本理化) に入れて濾

過することにより、単離肝細胞の浮遊液を得た。この浮遊液を低速 ($50 \times g$) で1 分間遠心分離し上清を捨て、沈渣に冷Hanks 液を加えて再度遠心分離した。同様な洗浄操作をさらに2 回繰り返す、最終的に得られた肝細胞をWE培養液中に浮遊させ肝細胞懸濁液とした。この低速遠心法で得られたものは96-98%が肝実質細胞であることが知られている (44)。

肝細胞はtrypan blue 溶液 (Flow) で染色し、Burker-Turk 型血球計算板を用いて生存細胞および致死細胞数をカウントし、細胞生存率を算出した。

細胞培養密度と肝RDS 誘発との関連を検索する実験では、 1.5×10^4 、 5.0×10^4 、 1.5×10^5 および 5.0×10^5 生存肝細胞/ml の濃度に調製した肝細胞懸濁液を400 μ l でプラスチック製スライドグラス (Lab-Tek chamber, Nunc) の各well (8.9×8.9 mm) に播種した。上述の濃度で肝細胞を播種した場合、細胞培養密度は各々 7.5×10^3 、 2.5×10^4 、 7.5×10^4 および 2.5×10^5 生存肝細胞/cm²であった。他の2つの実験では、 2.5×10^4 生存肝細胞/cm²の密度を使用した。肝細胞は、370 kBq/ml の [methyl-³H]thymidine (NEN) を含むWE培養液中で、5% CO₂存在下、37℃で4 時間培養した。培養後上清を捨て、冷WE培養液中で2 回細胞を洗浄したのち、肝細胞を1%クエン酸ナトリウム水溶液 (純正化学) で10分間低張処理し、酢酸—エタノールの1:3 (v/v) 溶液で30分間固定した。肝細胞を固定したスライドグラスを一昼夜風乾したのち、写真乳剤 (NR-M2, コニカ) に浸漬して暗箱に入れ、4℃の冷蔵庫内で約1週間露光後、現像しオートラジオグラフを作製した。オートラジオグラフは、肝細胞に核染色を施すためヘマトキシリン溶液に約5分間浸漬した。

2-6 肝細胞のRDS誘発率の測定ならびに統計学的検定

オートラジオグラフを光学顕微鏡下で観察し、動物1匹あたり2,000個の肝細胞をカウントした。その中で[methyl-³H]thymidineを取り込み黒色化した核を有する肝細胞の出現頻度を算出した(RDS誘発率, %)。RDS誘発率の統計学的検定にはStudentのt検定あるいはWelchの検定を用いた($\alpha=0.05$)。

第3節 実験結果

3-1 非変異・肝がん原性物質によるラット肝RDS誘発に対する肝細胞培養密度の影響

非変異・肝がん原性物質により誘発されるラット肝RDSが、最も感度良く検出される肝細胞培養密度を検索する目的で、3種類の非変異・肝がん原性物質をラットに投与し、そのラットの肝を用いて調製した密度の異なる肝細胞の培養条件下で肝RDSの誘発を測定した。また陰性対照としてラットにコーン油を投与した群を設けた。

陰性対照群においては、肝細胞の培養密度の相違によって肝RDS誘発率に統計学的な有意差は認められなかった(Table 1)。Carbon tetrachloride投与群では、 2.5×10^4 生存肝細胞/cm²の肝細胞の培養密度でのみ陰性対照群に対して有意な肝RDS誘発が示された(Table 1)。Clofibrate投与群では、 2.5×10^5 生存肝細胞/cm²を除く他の細胞培養密度で陰性対照群に対して有意な肝RDSが誘発され、 7.5×10^3 、 2.5×10^4 および 7.5×10^4 生存肝細胞/cm²での陽性反応間には有意差は認められなかった(Table 1)。Diethylstilbestrol投与群では、すべての細胞培養密度で有意な肝RDSの上昇が示されたが、最も顕著な反応は 2.5×10^4 および 7.5×10^4 生存肝

細胞/cm²の細胞培養密度の場合であった (Table 1)。これらの実験における肝細胞の生存率はすべて70%以上を示し、統計学的な有意差は認められなかった。

以上の結果から、非変異・肝がん原性物質による肝RDSを高感度で検出するには、 2.5×10^4 生存肝細胞/cm²の肝細胞の培養密度が最適であることが判明した。したがって、以後の実験はすべて 2.5×10^4 生存肝細胞/cm²を使用することにした。

3-2 各種週齢のラットから分離した肝細胞におけるRDS自然誘発率の測定

肝RDSの自然誘発率が一定値を示すラットの週齢を検索する目的で、異なる週齢 (5, 7, 8, 9, 10, 11および13週齢) の雄性F344ラットを使用して肝RDSの自然誘発率を測定した。測定は、入手時期の異なる動物を使用して計3回実施した (Fig. 2)。

肝RDSの自然誘発率は、ラットの週齢の増加とともに減少し、9週齢以降は0.5%前後の一定した値を示した (Fig. 2)。5, 7および8週齢ラットに対する肝RDSの自然誘発率は、同一実験内の個体間で顕著な変動を示した (Fig. 2)。また、5および7週齢ラットの肝RDS自然誘発率は、同一週齢であっても実験間で統計学的な有意差が認められた (Fig. 2)。

以上の結果から、9週齢以上の雄性F344ラットにおける肝RDSの自然誘発率は一定値を示し、さらに個体間における変動も安定していた。したがって、以後の実験はすべて9週齢の動物を使用することにした。

3-3 9週齢のラットから分離した肝細胞における肝RDS 自然誘発率の分布

RDS試験における陽性または陰性の判定基準を確立する目的で、9週齢の雄性F344ラットを使用し、肝RDSの自然誘発率の分布を検討した。これらの動物には、被験物質を溶解または懸濁する際に使用するコーン油または精製水を単回で強制経口投与した。この実験を105回（1回の実験あたり4または5匹のラットを使用、動物数計422匹）繰り返し、各実験で肝RDS誘発率の平均値を算出した。

105回の実験から得られた肝RDS誘発率の平均値の分布をFig. 3に示す。その $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ は $0.4 \pm 0.18\%$ であった。また、肝細胞の生存率は $71 \pm 9.7\%$ ($\text{mean} \pm \text{S.E.}$)を示し、動物の体重は $230 \pm 8.8 \text{ g}$ ($\text{mean} \pm \text{S.E.}$)であった。

以上の結果から、9週齢雄性F344ラットの肝RDS自然誘発率の平均値は、99.7%の確率で $0.00-0.94\%$ ($\text{mean} \pm 3 \times \text{S.E.}$)の範囲内にあるものと考えられた。実際105回の実験をとおして、自然誘発率の平均値はすべてこの範囲内であった。すなわち、陰性対照群の9週齢雄性F344ラットの肝RDS自然誘発率の平均値は常に1%未満であった。したがって、化学物質の投与によりこの数値以上の肝RDSの誘発率が得られた場合、この化学物質は肝RDS誘発の能力をもつものと判断した。

第4節 考察

雄性F344ラットを使用して肝RDSを測定した既知報告に関する肝細胞の培養密度および肝RDSの自然誘発率をTable 2に示した。今回の成績から、3種類の非変異・肝がん原性物質の全てを検出する

ためには肝細胞の培養密度を既報のものより低密度にする必要性が認められた (Table 1および2)。これら 3種の被験物質は異なる肝毒性を示す代表的な非変異・肝がん原性物質であることから、ラット肝RDS試験をより広範な特徴を有する非変異・肝がん原性物質に適用した場合でも 2.5×10^4 生存肝細胞/cm²の培養密度が最適と考えられる。したがって、従来からUDS試験に付随して実施されてきた既報の肝細胞培養密度を肝RDS誘発の測定にそのまま用いることは不適切である。また、confluentな培養密度 (2.5×10^5 生存肝細胞/cm²) ではRDSの検出感度が最も劣っていたことから (Table 1)、高密度の培養条件下では正常肝細胞と同様に化学物質を投与したのちに分離された肝細胞の増殖も抑制されることが示唆された。

肝RDSの自然誘発率は、雄性F344ラットの場合、9週齢以上で安定した値を示した (Fig. 2)。8週齢以前のラットで自然誘発率が個体間および実験間で大きく変動する原因は、肝が8週齢までは成長期にあるためと推察される。ラット肝RDS試験を非変異・肝がん原性物質のスクリーニング法として使用するためには、安定した自然誘発率が得られることが必須条件であることから、ラット肝RDS試験には9週齢の動物を選択した。

9週齢の動物の肝RDS自然誘発率は1%未満であった (Fig. 3)。著者の実験回数や使用した動物数は極めて多く、また既報のRDSの数値および変動範囲は全てこの9週齢ラットの肝RDS自然誘発率の変動範囲内に含まれていた (Table 2)。このことから、本研究で得られた自然誘発率の範囲がかなり正確に母集団の分布を反映しているものと考えられる。

第5節 結語

- (1) 非変異・肝がん原性物質によるラット肝RDSの誘発を高感度を検出するためには、 2.5×10^4 生存肝細胞/cm²で調べることが最も有効であることを明らかにした。
- (2) 雄性F344ラットに対する肝RDSの自然誘発率は9週齢以上であれば、週齢にかかわらず低率で一定した値を示すことを明らかにした。
- (3) 9週齢の雄性F344ラットに対する肝RDSの自然誘発率は $0.4 \pm 0.18\%$ (mean \pm S.E., n=105)で、その平均値の上限は1%未満であることを明らかにした。したがって、この数値を越えたときRDS誘発の事象が生じたものと判断した。

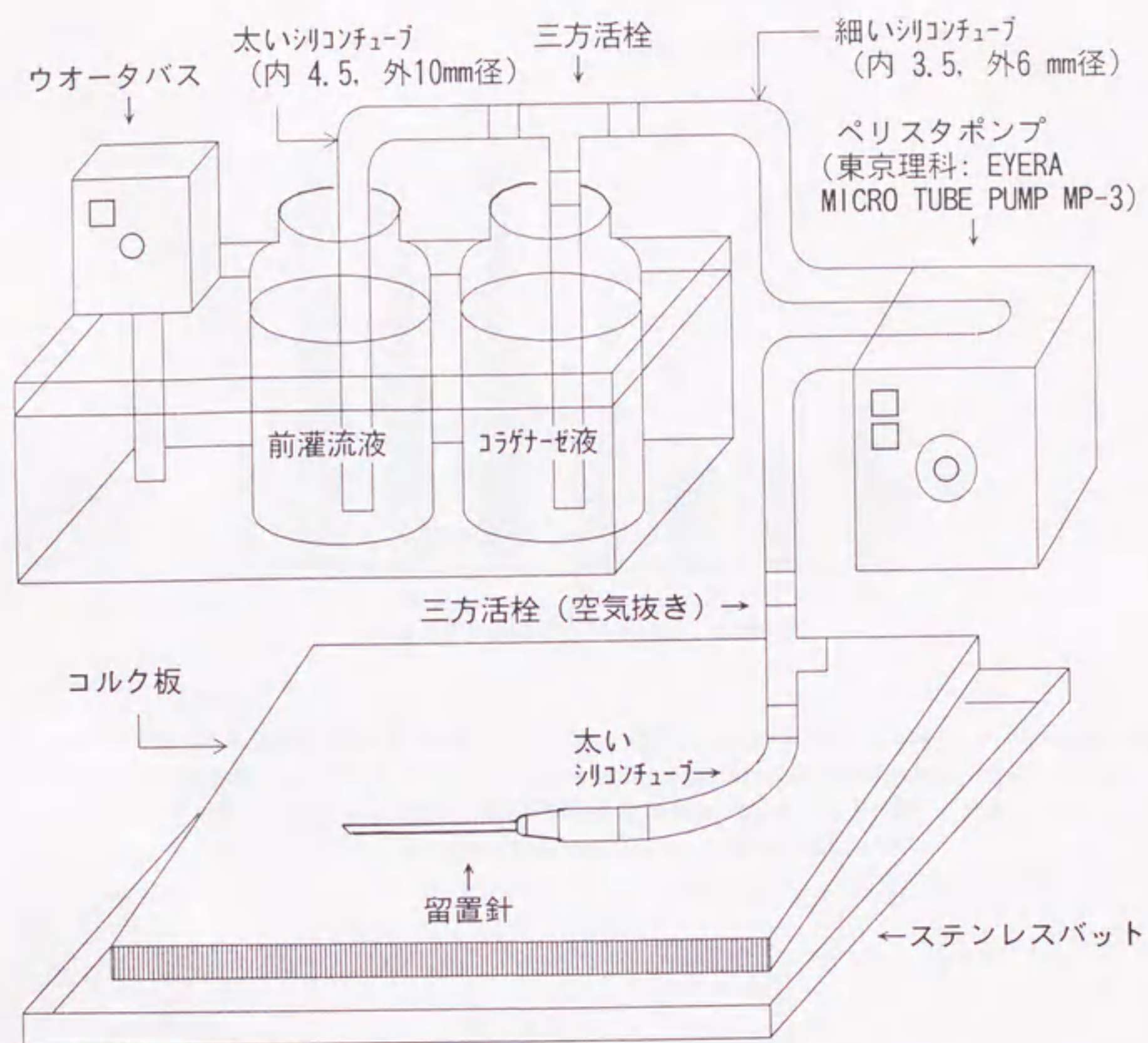


Fig. 1 Perfusion apparatus to prepare isolated hepatocytes from rat livers.

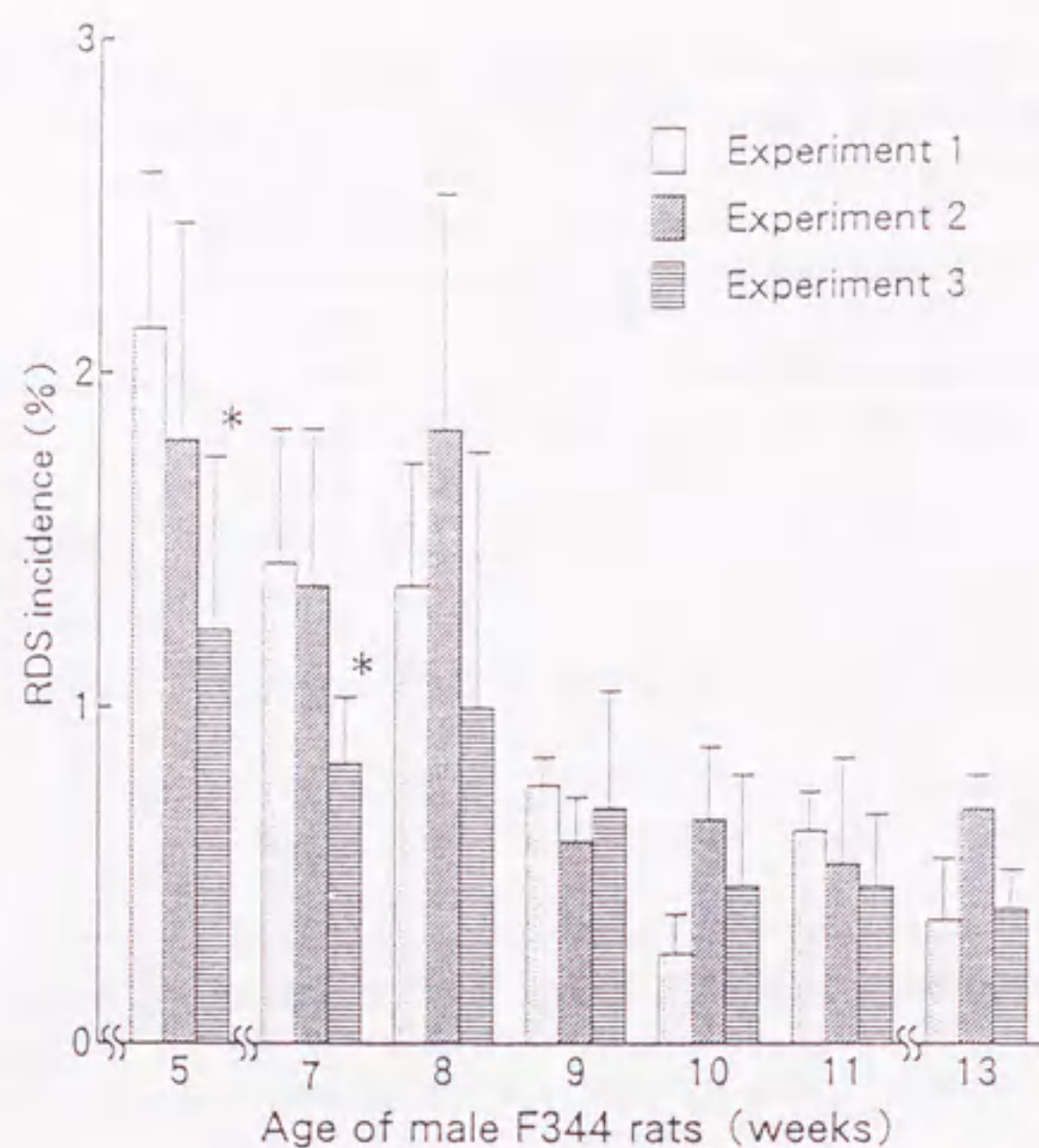


Fig. 2 Spontaneous RDS incidences in hepatocytes from different aged male F344 rats. The study was repeated three times (Expts. 1, 2 and 3) and animals aged 9 weeks or older consistently showed constant results. In 5- and 7-week-old rats, significant differences between values for Expts. 1 and 3 were found (* $P < 0.05$). Each column represents mean \pm SD data ($n = 4$).

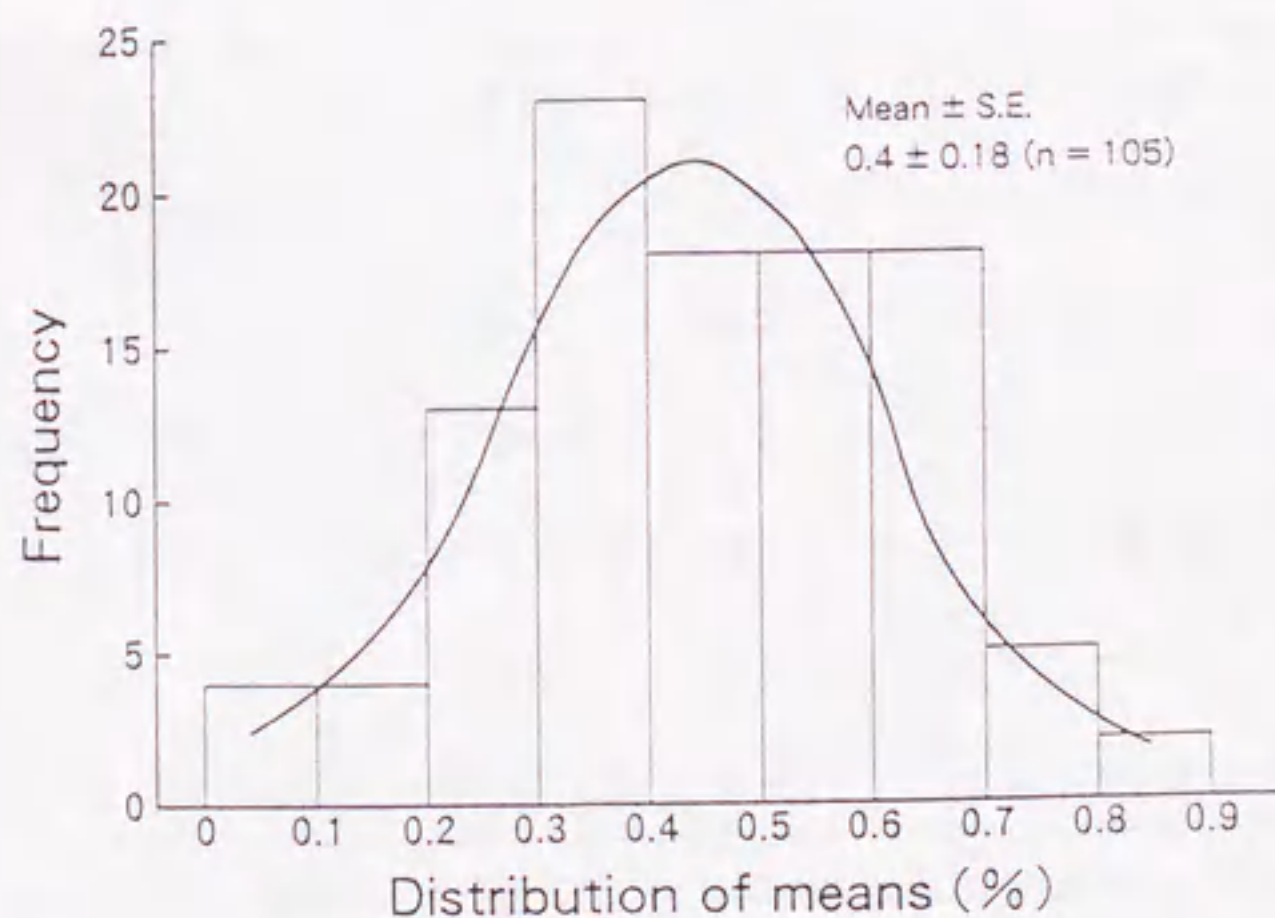


Fig. 3 Mean distribution of spontaneous RDS incidences in 9-week-old male F344 rat hepatocytes, obtained from 105 experiments (4-5 animals/experiment). The mean values in all experiments were less than 1.0%.

TABLE 1 Effect of cell density on RDS induction in isolated rat hepatocytes after in vivo treatment with carbon tetrachloride, clofibrate and diethylstilbestrol

Test chemical (mg/kg)	Cell density (viable cells/cm ²)			
	7.5 × 10 ³	2.5 × 10 ⁴	7.5 × 10 ⁴	2.5 × 10 ⁵
Corn oil	0.18 ± 0.13 ^a	0.18 ± 0.11	0.20 ± 0.06	0.04 ± 0.05
Carbon tetrachloride (700)	0.39 ± 0.13	1.53 ± 0.81 ^b	1.10 ± 0.58	0.35 ± 0.29
Clofibrate (235)	2.44 ± 0.80 ^b	2.28 ± 0.99 ^b	2.51 ± 0.32 ^b	0.39 ± 0.68
Diethylstilbestrol (1,000)	3.84 ± 2.00 ^b	6.20 ± 1.99 ^b	7.25 ± 1.14 ^b	4.58 ± 1.07 ^b

^a RDS incidence is given as the percentage of labelled hepatocytes counted in 2,000 hepatocytes/liver ± S.D. (n=4).

^b Significant increase as compared to the control level (P<0.05).

TABLE 2 Comparison of spontaneous RDS incidences in male F344 rat hepatocytes between previous reports and this study

Body weight (g)	Age (week)	Number of experiments	Number of animals	Cell density (× 10 ⁴ cells/ cm ²)	RDS incidence (%)	Reference
200-325	NA ^a	1	5	6.2	0.05 ± 0.02 ^b	41
NA	NA	1	3	6.2	0.07 ± 0.09 ^c	9
174-304	NA	1	3	6.2	0.10 ± 0.08 ^b	60
180-300	NA	NA	9	6.2	0.12 ± 0.04 ^b	40
200-300	NA	1	6	4.2	0.35 ^d	33
200-280	NA	1	4	4.2	0.37	5
230 ± 8.8	9	105	4-5	2.5	0.4 ± 0.18 ^b	Our data

^a Not available; ^b % ± S.E.; ^c % ± S.D.; ^d This value was read from a graph.

第2章 ラット肝RDS試験法の判定基準の検討

第1節 緒言

非変異・肝がん原性物質の単回投与によって、ラット肝RDSが誘発されたか否かは、陰性対照群と被験物質投与群との間における肝RDS誘発率を統計学的に比較検定することが必要とされる(15, 33, 35, 58)。しかしながら、判定方法に関して他のin vivo またはin vivo-in vitro の変異原性試験の例においては、陽性判定に際し統計学的な検定の他に陰性対照群の背景データとの比較を考慮することが常に求められる。例えば、マウス小核試験では、陰性対照群との統計学的な比較検定のみならず背景データとの比較検定によりその評価がなされている(23)。また、ラット・マウスを用いる肝UDS試験では、統計学的な検定によらず正味のグレイン数が5個以上の場合を陽性と判定しており、これも陰性対照群の背景データの蓄積から設定されたものである(8)。

このように、マウス小核試験および肝UDS試験では、得られた結果を評価する際に、常に背景データとの比較が必要となるが、ラット肝RDSの測定で背景データを考慮した判定方法を明確に記載した報告は少ない。Mirsalisら(41)が示したラットおよびマウス肝RDS試験の判定基準においては、陰性対照動物の肝RDS誘発率が0.2%未満の場合、被験物質投与動物の誘発率が0.5%未満のときを陰性、0.5~1.0%のときを疑陽性、1.0%以上のときを陽性と判定している。これは背景データを参考に設定されたものと推察されるが、明確な設定根拠の記載はない。

第1章で明らかにしたように、9週齢の雄性F344ラットにおける肝RDS自然誘発率の平均値($n=4\sim5$)は、105回の実験ですべて1%

未満であった。したがって、本研究において被験物質の投与により1%以上の肝RDSが誘発された場合は、陰性対照群の平均値との間に統計学的な有意差が示されないときでも、背景データと比較して陽性反応として判定することが可能であるものと考えた。しかしながら、化学物質を動物に投与した場合のRDS誘発率が、何らかの原因で偶然1%以上を示す可能性が懸念される。したがって、以下に示す2つの判定基準を仮に設定することにした。すなわち、2%以上のRDS誘発率が得られた場合は無条件に陽性と判定し、それが1~2%の場合はRDS誘発の再現性を確認したのち判定する方法である。

本研究では、代表的な4種類の非変異・肝がん原性物質(carbon tetrachloride, clofibrate, D,L-ethionine, phenobarbital sodium)と3種類の非がん原性物質(butylated hydroxytoluene, lithocholic acid, 2,6-toluenediamine)を選び、これらのラット肝RDS誘発性を測定し、上述の判定基準の仮説に正統性があるか否かを検討した(64)。

第2節 実験材料および実験方法

2-1 動物

9週齢の雄性F344ラット(体重:233-264 g, 日本チャールスリバー)を使用し、室温 20-24℃, 湿度40-70%, 照明7:00 am-7:00 pmの環境下で飼育した。ラットには実験動物用固形飼料MF(オリエンタル酵母工業)および水道水を自由摂取させ、入手後10日間以上馴化および検疫したのち供試した。

2-2 被験物質

既知の4種類の非変異・肝がん原性物質として、carbon tetrachloride (純正化学)、clofibrate (東京化成)、phenobarbital sodium (東京化成) およびD,L-ethionine (和光純薬) を使用した。3種類の既知非がん原性物質として、butylated hydroxytoluene, lithocholic acid および2,6-toluenediamine (東京化成) を使用した。

これらの化学物質のうち、第1章で記載した(pp. 6) carbon tetrachloride およびclofibrate以外の化学物質は以下に示すように異なる肝毒性をもつものとして選択した。すなわち、がん原性物質のうち、D,L-ethionine は肝細胞壊死および脂肪変性(71)、phenobarbital sodium は肝薬物代謝酵素誘導(50)を、非がん原性物質のうち、butylated hydroxytolueneはラット肝にプロモーション作用(34, 49, 52)、lithocholic acidはラット大腸にプロモーション作用(52, 54)、2,6-toluenediamineはAmes試験で陽性(4)を示す化学物質である。

Phenobarbital sodiumと2,6-toluenediamineは精製水に溶解し、他の被験物質はすべてコーン油 (ハヤシケミカル) で懸濁または溶解した。これらの調製は用時に行った。

2-3 被験物質の投与用量の設定

各被験物質ごとに1用量あたり2または3匹の動物を用いて簡易の急性経口毒性試験を実施し、概略のLD50値を求めた。投与液量は10 ml/kg体重とした。このLD50値の $\frac{1}{2}$ 量を各被験物質の最大耐量(MTD)と規定し、肝RDS試験の最高投与量として設定した。LD50値が4,000 mg/kg体重を超える場合は、2,000 mg/kg体重をMTDの上限とした。

2-4 肝RDS誘発の測定

マウス小核試験は、最初に化学物質のMTDを投与したのち経時的に小核誘発を観察しその結果、最大の小核誘発率が得られた時間で用量反応性の有無を検討する手段が用いられている(23)。また、げっ歯類を用いるUDS試験は、MTDと1/5 MTDを投与し2および12~16時間後にUDSを観察する方法が推奨されている(8)。いずれの試験法においてもMTDを投与する理由は化学物質のもつ変異原性を高感度に検出するためで、またMTD投与後、経時的に観察するのは化学物質によって変異原性が誘発される時間が異なるためである。さらに用量反応性を観察するのは主に陽性反応の再現性を確認するためである。

以上の動物を使用した変異原性試験を参考にして、以下に示す手法で肝RDS誘発を観察した。

2-4-1 肝RDS誘発の経時変化の測定

体重別層化無作為抽出法により、ラットを1群4匹に群分けしたのち、各被験物質または陰性対照物質（コーン油または精製水）を単回で強制経口投与した。投与用量はMTDを用い、投与液量は10 ml/kg体重とした。動物は各被験物質を投与後15, 24, 39, 48および63時間で屠殺し肝RDSを測定した。陰性対照物質を投与した動物は、投与後24時間で屠殺し肝RDSを測定した。

2-4-2 肝RDS誘発の用量反応性の測定

2-4-1と同様な方法で、ラットにclofibrate, D,L-ethionine, lithocholic acidおよびphenobarbital sodiumを単回で強制経口投与した。投与用量はMTD, 1/2 MTDおよび1/4 MTD, ならびに例外的に2MTD

を用いた。動物は、肝RDS誘発の経時変化を測定し、最大のRDS誘発率を示した時間で屠殺して肝RDSを測定した。

2-5 肝細胞のRDS誘発率の測定ならびに統計学的検定

肝細胞の分離および培養は、第1章2-4に示した方法で実施した。すなわち、ラットの肝を酵素液で灌流し肝細胞を分離したのちtrypan blue染色法で肝細胞の生存率を求めた。肝細胞を 2.5×10^4 生存肝細胞/cm²の密度になるように播種し、370 kBq/mlの [methyl-³H]thymidineを含むWE培地中で4時間培養した。肝細胞を固定後、オートラジオグラフを作製し、光学顕微鏡下で動物1匹あたり2,000個の肝細胞を観察してRDS誘発率を算出した。

RDS誘発率および細胞生存率の統計学的検定にはStudentのt検定あるいはWelchの検定を用いた ($\alpha=0.05$)。

第3節 実験結果

3-1 化学物質による肝RDS誘発に対する経時変化の測定

簡易の急性経口毒性試験の結果判明した各被験物質のMTDを用い、ラットに単回で強制経口投与し、15、24、39、48および63時間後に肝細胞のRDS誘発率を測定した (Table 3)。Butylated hydroxytolueneは投与後39時間に、carbon tetrachlorideは投与後24、39、48および63時間に、陰性対照群と比較して統計学的に有意な肝RDSを誘発した。Carbon tetrachlorideの肝RDS誘発のピークは投与後48時間であり、既報と一致する結果であった (30)。これらの2種類の化学物質は2%以上のRDS誘発率を示したため、肝RDS試験陽性と判定した。また、2,6-toluenediamineはいずれの測定時間におい

でも、陰性対照と比較して有意な肝RDSを誘発せず、また1%未満の誘発率であった。したがって、2,6-toluenediamineは肝RDS試験陰性と判定した。D,L-Ethionine およびphenobarbital sodiumは投与後39時間に陰性対照群に対して統計学的に有意な肝RDSを誘発し、その値は前者は1.2%、後者は1.5%であった。Clofibrateおよびlithocholic acidは陰性対照群に対して統計学的に有意な肝RDSを誘発しなかったが、前者は投与後39時間に1.1%の、後者は投与後48時間に1.1%の肝RDS誘発率を示した。

肝細胞の生存率は、全ての被験物質についていずれの測定時間においても、陰性対照に対して有意な差を示さなかった (Table 3)。

3-2 化学物質による肝RDS誘発に対する用量反応性の測定

ラット肝RDS誘発の経時的測定の結果、1~2%の一過性の肝RDS誘発率を示した4物質 (clofibrate, D,L-ethionine, lithocholic acid, phenobarbital sodium) に対して、RDS誘発の再現性を確認する目的で用量反応性を測定した。上記4物質の2MTD, MTD, $\frac{1}{2}$ MTD および $\frac{1}{4}$ MTDをラットに単回で強制経口投与し、clofibrate, D,L-ethionineおよびphenobarbital sodiumは39時間後に、lithocholic acidは48時間後に肝RDS誘発率を測定した (Table 4)。その結果、clofibrateは $\frac{1}{4}$ MTDで統計学的に有意な、また $\frac{1}{2}$ MTDとMTDで有意差はないが1%以上の肝RDSを誘発し、その誘発率はMTDより $\frac{1}{2}$ MTD投与時に高値を示した。Clofibrateの2MTDの投与では4匹中3匹のラットが死亡し、残存のラットで肝RDSの誘発は観察されていない。Phenobarbital sodiumは $\frac{1}{4}$ MTDとMTDで統計学的に有意な、さらに $\frac{1}{2}$ MTDで有意差はないが1%以上の肝RDSを誘発し、そのRDS誘発率はほぼ一定であった。2MTDのphenobarbital sodium投与群では4匹中1匹の

ラットが死亡し、3匹の残存ラットは1%未満のRDS誘発率を示した。一方、D,L-ethionine と lithocholic acid は2MTDを含むすべての投与用量において1%未満の肝RDS誘発率であり、再現性は確認されなかった。以上の結果から、1%以上の肝RDSの誘発が再現された clofibrate と phenobarbital sodium が陽性と判定された。

肝細胞の生存率は、すべての被験物質に関していずれの投与用量においても、陰性対照に対して有意な差は示されなかった (Table 4)。

第4節 考察

第1章で明らかにしたように、9週齢雄性F344ラットの肝RDS自然誘発率の平均値は1%未満であった。したがって、被験物質の投与により1%以上の肝RDSが誘発された場合は、統計学的な有意差が認められないときでも、背景データと比較して陽性反応に判定することが可能であるとの仮説をまず立てた。この仮説の正統性を確認する目的で、代表的な4種類の非変異・肝がん原性物質と3種類の非がん原性物質を用いて肝RDSを測定した。

肝RDS誘発の経時変化および用量反応性の測定において、butylated hydroxytoluene, carbon tetrachloride および phenobarbital sodium は、統計学的な有意差検定あるいは背景データとの比較のいずれの判定法を用いても陽性と判定可能であった (Table 3 および 4)。一方、2,6-toluenediamine はいずれの判定法を用いても陰性と判定された (Table 3)。

Clofibrate は、その経時変化の測定において統計学的に有意なRDSを誘発しなかった (Table 3)。しかしながら、RDSの最大誘発率

が1.1%であった(Table 3) ため、再現性を確認する目的で用量反応性の測定を実施した。その結果、RDS の誘発に再現性が認められ (Table 4) , 最終的に陽性と判定された。このclofibrateのケースは、有意差検定よりも背景データに基づく判定基準が有効なことを示唆していた。統計学的な有意差検定では不十分な理由の 1つとして、実験に使用する動物数が1 群あたり4または5匹と少ないため、陰性対照群と化学物質の投与群の平均値の間に有意差がつきにくい可能性が考えられる。

D,L-Ethionine は経時変化の測定において統計学的に有意な肝RDS を誘発しその値は1.2%であった(Table 3) が、用量反応性の測定ではその再現性が確認されなかった(Table 4) 。また、lithocholic acidも経時変化の測定では1.1%のRDS を誘発した(Table 3) が、用量反応性の測定ではその再現性が確認されなかった(Table 4) 。これらの結果から、化学物質の投与により1%を僅かに越えるRDS の誘発が観察された場合、その再現性を確認する必要性があることが判明した。

肝RDS 誘発の経時変化を測定した結果 (Table 3) , 全ての被験物質の肝RDS 最大誘発率は投与後24時間、39時間および48時間のいずれかであった。既報においても、単回投与による肝RDS はいずれもこれらの観察時間に誘発されていた (6, 9, 38, 39, 40, 41) 。したがって、ラット肝RDS の測定は以上の3 点で行う必要がある。

肝RDS誘発の用量反応性を測定した結果 (Table 4) , clofibrateはMTD投与より $\frac{1}{2}$ MTD投与で高いRDS 値を示し、さらにclofibrateとphenobarbital sodiumの2MTD投与 (致死量) では肝RDS 値は抑制された (Table 4) 。これらの事実から、肝RDS は必ずしも用量相関的に誘発されるのではなく、高用量投与では動物または細胞に

何らかの毒性的な障害をもたらし、その結果、肝RDSはむしろ抑制されるものと推察される。したがって、今後肝RDSの経時変化の測定はMTDおよび $\frac{1}{2}$ MTDの投与で実施する必要がある。

本研究で使用した化学物質による肝RDSの誘発原因についての考察は第3章に一括して記載した。

第5節 結語

ラット肝RDSの測定方法および背景データに基づく判定基準を以下のように設定した。

- (1) ラット肝RDSは被験物質の投与後24、39および48時間の3点で測定することが必要である。
- (2) これら3点の測定時間のうち、1点以上で2%以上の肝RDS誘発が観察された場合は陽性と判定する。また、いずれの点でも1%未満の肝RDS誘発が観察された場合は陰性と判定する。
- (3) ラット肝RDSの経時変化を測定し1%以上2%未満の肝RDS誘発が観察された場合は、さらにMTD、 $\frac{1}{2}$ MTDおよび $\frac{1}{4}$ MTDを用いて用量反応性を測定し、再度1%以上の誘発率が得られたときのみを陽性、1%未満のときを陰性と判定する。

TABLE 3 Results of RDS test time-course experiments using rat hepatocytes

Test chemical (CAS No. ^a)	Dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^b (%±S.D.)	Cell viability (%±S.D.)
Butylated hydroxytoluene (128-37-0)	0	24	0.7±0.23	80± 3.2
	900	15	0.7±0.18	71± 6.6
		24	2.5±4.12*	78±14.1
		39	9.2±6.02***	75± 6.4
		48	0.8±0.30	76± 5.6
		63	0.6±0.20	72± 7.7
Carbon tetrachloride (56-23-5)	0	24	0.4±0.27	70± 3.0
	1,400	15	0.1±0.07	71± 1.2
		24	13.6±4.76***	65± 8.1
		39	12.4±5.75***	78± 5.7
		48	14.9±2.15***	73± 9.2
		63	1.6±0.38**	68± 8.4
Clofibrate (637-07-0)	0	24	0.8±0.16	67± 9.2
	470	15	0.1±0.06	77± 4.8
		24	0.1±0.07	74± 6.3
		39	1.1±0.94*	64±16.4
		48	0.8±0.29	75± 2.1
		63	0.4±0.27	78± 7.4
D,L-Ethionine (67-21-0)	0	24	0.3±0.05	66±10.0
	2,000	15	0.1±0.05	77±10.7
		24	0.1±0.02	74± 3.6
		39	1.2±0.12**	56±10.0
		48	0.5±0.23	66± 7.7
		63	0.1±0.08	64±13.3
Lithocholic acid (434-13-9)	0	24	0.6±0.20	79± 7.7
	2,000	15	0.4±0.34	79± 6.9
		24	0.3±0.24	75± 6.7
		39	0.6±0.74	79± 3.7
		48	1.1±0.49*	82± 2.1
		63	0.9±0.11	74± 8.7
Phenobarbital sodium (57-30-7)	0	24	0.4±0.21	89± 3.4
	75	15	0.8±0.50	81± 6.0
		24	0.1±0.02	81± 4.3
		39	1.5±0.33**	82± 2.2
		48	0.6±0.09	83± 7.7
		63	0.6±0.21	73±18.0

TABLE 3 (continued)

Test chemical (CAS No. ^a)	Dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^b (%±S.D.)	Cell viability (%±S.D.)
2,6-Toluenediamine (823-40-5)	0	24	0.7±0.12	67±12.6
	250	15	0.1±0.06	79± 6.1
		24	0.1±0.05	60±11.5
		39	0.2±0.11	64±13.5
		48	0.1±0.03	76± 5.7
		63	0.1±0.03	74± 2.2
Control ^c	-	-	0.4±0.18	71± 9.7

^a Chemical abstracts service registry number.

^b RDS incidences are the percentage of RDS hepatocytes calculated from data for 2,000 hepatocytes/liver±S.D. (n=4).

^c Control level was the mean±S.E. obtained from 105 experiments using 422 rats.

* Not significant but showing 1% or more RDS incidence.

** Significant increase of RDS between 1.0 and 2.0% (P<0.05).

*** Significant increase of RDS being 2.0% or more (P<0.05).

TABLE 4 Results of dose-response experiments of RDS test using rat hepatocytes

Test chemical	Dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^a (%±S.D.)	Cell viability (%±S.D.)
Clofibrate	0	39	0.4±0.12	75± 9.7
	118(1/4MTD)	39	1.0±0.34**	79± 3.5
	235(1/2MTD)	39	3.0±1.05*	80± 6.0
	470(MTD)	39	1.7±2.31*	73± 5.2
	940(2MTD) ^b	39	0.0	65
D,L-Ethionine	0	39	0.5±0.26	68±12.7
	500(1/4MTD)	39	0.5±0.27	67±16.7
	1,000(1/2MTD)	39	0.2±0.21	71±12.0
	2,000(MTD)	39	0.7±0.44	70± 9.2
	4,000(2MTD)	39	0.8±0.36	74± 8.3
Lithocholic acid	0	48	0.2±0.13	71±12.8
	500(1/4MTD)	48	0.2±0.11	72±13.1
	1,000(1/2MTD)	48	0.5±0.37	68± 2.0
	2,000(MTD)	48	0.8±0.39	66± 7.7
	4,000(2MTD)	48	0.8±0.24	69± 7.9
Phenobarbital sodium	0	39	0.5±0.23	71± 8.9
	19 (1/4MTD)	39	1.4±0.67**	67± 7.4
	38 (1/2MTD)	39	1.0±0.50*	69±11.8
	75 (MTD)	39	1.5±0.66**	73± 6.0
	150(2MTD) ^b	39	0.3±0.16	76± 3.8

^a RDS incidences are the percentage of RDS hepatocytes calculated from data for 2,000 hepatocytes/liver±S.D. (n=4).

^b These incidences are calculated from one (clofibrate) or three (phenobarbital sodium) rats because rats died after treatment with 2×MTD.

* Not significant but showing 1% or more RDS incidence.

** Significant increase of RDS between 1.0 and 2.0% (P<0.05).

第3章 ラット肝RDS試験法の評価－22種類の非変異・肝がん原性物質と25種類の非がん原性物質に対するスクリーニング結果

第1節 緒言

環境化学物質のがん原性を短期間で予測するための試験系が有用であるか否かを評価するためには、がん原性物質を陽性に検出する陽性検出率（感受性）と非がん原性物質を陰性に検出する陰性検出率（特異性）を算出し、両者の平均値、つまり総合検出率（正確度）が高いことを証明する必要がある（29）。その理由は、仮に陽性検出率が高い試験法を確立してもその陰性検出率が低ければ、得られた陽性反応ががん原性とどのような因果関係にあるのかが極めて不明となるためである。

肝がん原性物質によるラット肝RDSの誘発は、これまで数種類の被験物質を使用して報告されているに過ぎず、したがって上述したような検出率を正確に算出した報告は見当たらない。特に、既報では肝がん原性物質のみを使用して検討したものが多く、非がん原性物質を使用したものは稀である（3, 5）。

本研究は、既知の非変異・肝がん原性物質22種類と非がん原性物質25種類を使用してラット肝RDS試験を実施し、その陽性検出率と陰性検出率ならびに総合検出率を算出し、本試験法の有用性を評価する目的で行った（65）。

第2節 実験材料および実験方法

2-1 動物

9週齢の雄性F344ラット（日本チャールスリバー）を使用し、室温20-24℃、湿度40-70%、照明7:00 am-7:00 pmの環境下で飼育し、

実験動物用固形飼料MF（オリエンタル酵母工業）および水道水を自由摂取させ，入手後10日間以上馴化および検疫したのち供試した。

2-2 被験物質

22種類の既知非変異・肝がん原性物質と，25種類の既知非がん原性物質を使用した。非変異・肝がん原性物質は，ラットの肝にがん原性を示すことが報告されている化学物質の内，国内で入手可能なものを選択した。非がん原性物質は，米国National Toxicology Program (NTP) で実施されたラット・マウスのがん原性試験で陰性結果を示した化学物質（4）の内，変異原性試験で陽性結果を示すものを中心に無作為に選択した。

非変異・肝がん原性物質は，chlorendic acid, clofibrate, dehydroepiandrosterone, diethylstilbestrol, 1,4-dioxane, D,L-ethionine, 17 α -ethynylestradiol, phenobarbital sodium, safroleおよびurethaneを東京化成より，acetaminophen, *p,p'*-DDT(dichlorodiphenyltrichloroethane), di(2-ethylhexyl)phthalate, α -hexachlorocyclohexane, methyl carbamate, tannic acidおよびthioacetamideを和光純薬より，carbon tetrachlorideおよびchloroformを純正化学より，11-aminoundecanoic acidをAldrichより，polybrominated biphenylsを関東化学より入手した。また，Wy-14,643は東京薬科大須賀教授より分与して戴いた。

非がん原性物質は，*o*-anthranilic acid, benzoin, benzyl alcohol, ϵ -caprolactam, 2-chloroethanol, dimethoate, geranyl acetate, lindane, D-mannitol, 4-nitro-*o*-phenylenediamine, phenolおよびL-tryptophanを和光純薬より，butylated hydroxytoluene, 3-chloro-*p*-toluidine, 8-hydroxyquinoline, litho-

cholic acid, D,L-menthol, *p*-phenylenediamine dihydrochloride, 4-nitroanthranilic acid および 2,6-toluenediamine を東京化成より, halothane, methoxychlor および 2,5-toluenediamine sulfate をAldrichより, L-ascorbic acid および sulfisoxazole をSigmaより入手した。

被験物質は, 精製水, 0.5% carboxymethylcellulose sodium (CMC, 丸石製薬) 溶液またはコーン油 (純正化学) のいずれかの中から適切な溶媒を選び, 動物への投与時に懸濁または溶解して調製した。L-Ascorbic acid, ϵ -caprolactam, D-mannitol, methyl carbamate, phenobarbital sodium, tannic acid, 2,6-toluenediamine および urethane は精製水を, Wy-14,643 は 0.5% CMC 溶液を, またその他の被験物質はコーン油を溶媒とした。

2-3 被験物質の投与用量の設定

各被験物質ごとに概略のLD₅₀値あるいは最少致死量を求め (第2章, 2-3), その $\frac{1}{2}$ 量を各被験物質の最大耐量 (MTD) と規定し, 肝RDS試験の最高投与量として設定した。投与液量は10 ml/kg体重とした。最少致死量が2,000 mg/kg体重を超える場合は, 2,000 mg/kg体重を上限とした。なお, 陰性対照物質は各溶媒を10 ml/kg体重で投与した。

2-4 肝RDS誘発の経時変化試験

体重別層化無作為抽出法により, ラットを1群4匹に群分けしたのち, 各被験物質または陰性対照物質 (コーン油, 精製水または0.5% CMC 溶液) を単回で強制的に経口投与した。なお, tannic acid についてはさらに皮下投与を行った。投与用量はMTD および $\frac{1}{2}$ MTD を

用い、投与液量は10 ml/kg体重とした。動物は被験物質を投与した場合は24、39および48時間後に、また陰性対照物質を投与した場合は、24時間後に屠殺し肝RDSの測定を実施した。

2-5 肝RDS誘発の用量反応性の測定

肝RDS誘発の経時的観察ののち、1%以上2%未満のRDS誘発率が得られた場合、その最大誘発率が認められた時間を固定して用量反応性を調べた。2-4と同様な方法で、ラットにその被験物質をMTD、 $\frac{1}{2}$ MTDおよび $\frac{1}{4}$ MTDで投与し、所定の時間で動物を屠殺して肝RDSを測定した。陰性対照物質を投与した動物についてもこれと同一の時間で肝RDSの測定を行った。

2-6 肝細胞のRDS誘発率の測定ならびに統計学的検定

肝細胞の分離および培養は、第1章2-4に示した方法で実施した。すなわち、ラットの肝を酵素液で灌流し肝細胞を分離したのちtrypan blue染色法を用いその生存率を求めた。肝細胞を 2.5×10^4 生存肝細胞/cm²の細胞培養密度で、370 kBq/mlの[methyl-³H]thymidineを含むWE培地中で4時間培養した。肝細胞を固定後、オートラジオグラフを作製し、光学顕微鏡下で動物1匹あたり2,000個の肝細胞を観察してRDS誘発率を算出した。

RDS誘発率および細胞生存率の統計学的検定にはStudentのt検定あるいはWelchの検定を用いた ($\alpha = 0.05$)。

第3節 実験結果

3-1 非変異・肝がん原性物質の肝RDS試験の結果

各被験物質のMTDおよび $\frac{1}{2}$ MTDをラットに単回で強制経口投与し、24、39および48時間後に肝のRDS誘発率を測定した。Table 5に示すように、16種類の物質はMTDおよび $\frac{1}{2}$ MTD、またはそのいずれかの用量で2%以上の肝RDSを誘発したことから陽性と判定した。*p,p'*-DDT, 1,4-dioxane, D,L-ethionine および methyl carbamate は1~2%の肝RDS誘発率を示し、用量反応性試験で再現性を確認する必要がある。11-Aminoundecanoic acid および chlorendic acid はいずれの投与用量および観察時間においても1%未満の肝RDS誘発率を示したことから陰性と判定した。

以上のRDSの経時変化試験の結果を投与量別に見ると、陽性と判定された大部分の化学物質は、 $\frac{1}{2}$ MTDよりMTDの投与でRDS誘発率が高値を示したが、dehydroepiandrosterone, di(2-ethylhexyl)phthalate, 17α -ethynylestradiol および tannic acid は $\frac{1}{2}$ MTDとMTDとで一定値を示した。また、clofibrate および phenobarbital sodium は、MTDより $\frac{1}{2}$ MTDで高いRDS誘発率を示した。

またこれを投与後の時間別に見ると、明確な肝RDSの誘発は16検体中11検体で投与後24時間から観察されたが、chloroform, α -hexachlorocyclohexane および tannic acid は投与後39時間から、safrole および urethane は各々投与後39時間と48時間のみに肝RDSを誘発した。肝RDSの最大誘発が観察された投与後の時間は以下のとおりであった。24時間：clofibrate, dehydroepiandrosterone, di(2-ethylhexyl)phthalate, diethylstilbestrol, 17α -ethynylestradiol, phenobarbital sodium および polybrominated biphenyls; 39時間：acetaminophen, safrole, tannic acid および Wy-14,643;

48時間：carbon tetrachloride, chloroform, α -hexachlorocyclohexane, thioacetamide および urethane。

ラット肝RDS誘発の経時的測定の結果、1～2%の肝RDS誘発率を示した p,p' -DDT, 1,4-dioxane, D,L-ethionineおよびmethyl carbamateに対して、RDS誘発の再現性を確認する目的で用量反応性試験を実施した。上記4物質のMTD, $\frac{1}{2}$ MTDおよび $\frac{1}{4}$ MTDをラットに単回で強制経口投与し、肝RDSの誘発率を測定した。その結果、 p,p' -DDTおよびmethyl carbamateは再度1%以上の肝RDSを誘発したことから陽性と最終判定したが、他の2検体は肝RDS誘発に再現性が認められず陰性と最終判定した (Table 7)。

以上のRDS誘発における経時変化試験と用量反応性試験の結果から、acetaminophen, carbon tetrachloride, chloroform, safrole, tannic acid, thioacetamideおよびurethaneは投与後39または48時間に肝RDSの最大誘発率を示した。これらはラット肝細胞に壊死および脂肪変性を引き起こすことが知られている (71)。一方、投与後24時間に肝RDS最大誘発率を示した被験物質には、ペルオキシゾーム増生物質 [clofibrate, dehydroepiandrosterone, di(2-ethylhexyl)phthalate], ホルモン様物質 (dehydroepiandrosterone, diethylstilbestrol, 17α -ethynylestradiol), ならびに薬物代謝酵素誘導物質 (phenobarbital sodium) が含まれており、これらは肝細胞毒性を示さないことが一般的に知られている。Tannic acidは、経口投与では肝RDSを誘発しなかったが、皮下投与により明確な誘発を起こした。この結果は、その肝がん原性が皮下投与のみで報告されている事実 (28) と一致していた。

上記の被験物質投与群に対する肝細胞の生存率は、全般的に陰性対照群のそれと差が見られなかった (Table 5および7)。しかしな

がら，肝RDSの経時変化試験において11-aminoundecanoic acid, chloroform, D,L-ethionine, safrole, thioacetamideおよびurethaneのMTD処理群，ならびに1,4-dioxaneのMTDおよび $\frac{1}{2}$ MTD処理群では統計学的に有意な肝細胞の生存率の低下が観察された (Table 5)。これらのうち，11-aminoundecanoic acidについては報告がないので不明であるが，他の5検体はすべて肝毒性物質であることが知られている (68)。特に，chloroformの1,000 mg/kg体重投与群は，最も顕著で持続的な肝細胞生存率の低下を投与後24時間から示し，それに引き続いて肝RDSの顕著な誘発が投与後39時間および48時間に観察されている。一方，その低用量投与群 (250および500 mg/kg体重群) では肝細胞の生存率低下もRDS誘発も観察されなかった。

3-2 非がん原性物質の肝RDS試験の結果

25種類の非がん原性物質をMTDと $\frac{1}{2}$ MTDを使用した肝RDSの経時変化試験で評価した結果，17種類の物質がすべての投与用量および観察時間で1%未満の肝RDS誘発率を示したことから，陰性と判定された (Table 6)。また，lithocholic acid, methoxychlorおよび4-nitro-*o*-phenylenediamineの3種類は1~2%の肝RDS誘発率を示したことから，用量反応性試験においてその再現性を確認した。残りの5種類の非がん原性物質，benzoin, butylated hydroxytoluene, 3-chloro-*p*-toluidine, geranyl acetateおよびD,L-mentholは2%以上の肝RDSを誘発したことから陽性と判定した (Table 6)。

Butylated hydroxytolueneおよびgeranyl acetateは用量相関的なRDS誘発を引き起こしたが，benzoinおよび3-chloro-*p*-toluidineは $\frac{1}{2}$ MTDの投与群でのみ陽性反応が観察され，D,L-mentholはMTDよ

りも $\frac{1}{2}$ MTD の投与時に高い肝 RDS 値を示した (Table 6)。これらの被験物質投与による肝 RDS の最大誘発時間は, butylated hydroxy-toluene の投与後 39 時間を除き, すべて投与後 24 時間であった (Table 6)。

ラット肝 RDS 誘発の経時的測定の結果, 1~2% の肝 RDS 誘発率を示した lithocholic acid, methoxychlor, 4-nitro-*o*-phenylenediamine に対して, RDS 誘発の再現性を確認する目的で用量反応性試験を実施した。その結果, 上記の 3 検体は肝 RDS 誘発に再現性が認められず陰性と最終判定した (Table 7)。

上記の被験物質投与群における肝細胞の生存率は, benzyl alcohol および lindane 投与群を除き, 陰性対照群のそれと差がなかった (Table 6 および 7)。

以上の試験成績を要約すると, ラット肝 RDS 試験は 22 種類の非変異・肝がん原性物質の 18 種類を陽性に検出し, 非変異・肝がん原性物質に対する陽性検出率は 82% であった。一方, 25 種類の非がん原性物質の 20 種類を陰性に検出し, 非がん原性物質に対する陰性検出率は 80% であった。したがって, 本ラット肝 RDS 試験に対する総合検出率は 81% ($(18+20)/(22+25)$) であった。

第 4 節 考察

本研究で使用した非変異・肝がん原性物質および非がん原性物質に対する変異原性試験とラット肝 RDS 試験の成績を Table 8 および 9 に示す。Ames 試験, *in vitro* 染色体異常試験およびマウス小核試験は, がん原性物質の早期検出のために, 日本で最も広く使用されている代表的な変異原性試験である。また, ラットの肝を用いる *in*

vivo-in vitro 不定期DNA 合成 (UDS)試験は、肝がん原性物質をより特異的に検出する変異原性試験である。本研究で使用したすべての肝がん原性物質はAmes試験で陰性結果を示す化学物質である。その一部はUDS 試験でも検出することが不可能である。一方、染色体異常試験および小核試験は数種類の肝がん原性物質を陽性に検出している。これらの試験成績と比較して、ラット肝RDS 試験はより高感度にAmes試験陰性の非変異・肝がん原性物質を検出することが可能であった (Table 8)。

また、RDS 試験は25種類の非がん原性物質の20種類を陰性と判定した (Table 9)。これらのRDS 陰性の非がん原性物質の11種類は、上述の変異原性試験で陽性結果を示す化学物質であった。逆に、RDS 試験で陽性と判定した5 種類の非がん原性物質は、変異原性試験で陰性を示した。これらの知見から、RDS 試験は非変異原性の化学物質に対して変異原性試験と明らかに異なる検出スペクトルを有することが判明した。RDS 試験の総合検出率が81%であったことから、肝RDS 誘発は非変異・肝がん原性物質により誘導される特異的な変化であると考えられる。

本研究で使用した9 種類の肝傷害性の肝がん原性物質のうち1,4-dioxaneとD,L-ethionineを除く7 種類の化学物質 (acetaminophen, carbon tetrachloride, chloroform, safrole, tannic acid, thioacetamideおよびurethane) は明確な肝RDS を誘発した (Table 5)。このRDS誘発は、肝細胞の壊死に続いて肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) が肝非実質細胞などから分泌され、その増殖刺激により再生性の肝細胞増殖が誘導されたものと考えられる (Fig. 4)。この場合、肝再生の機序からRDS の最大誘発を示す時間は被験物質の投与後48時間前後であるものと推察され、このことはcarbon

tetrachloride を用いた実験でも報告されている (30)。本研究において陽性結果を示した肝傷害性物質は、すべて投与後39または48時間にRDSの最大誘発を示したことから、carbon tetrachloride以外の肝傷害性物質も同様な作用機序でRDSを誘発するものと推察される。特に、chloroformによるRDS誘発は肝細胞の生存率を著しく低下させたMTD群のみで観察され、肝細胞の壊死に伴うRDS誘導であることを裏付けていた (Table 5)。

再生性の肝細胞増殖と肝がん原性の関連については次のような事実が報告されている。Columbanoら(12)は、carbon tetrachlorideを肝細胞壊死を起こす用量で投与した場合、diethylnitrosamineでイニシエーションされた肝細胞はその増殖が促進され、前がん病変(γ -glutamyltransferase陽性細胞巣)が形成されることを報告している。また、部分肝切除を施したB6C3F1マウスで自然発生性の肝腫瘍の頻度が上昇することが報告されている (45)。これらの事実を踏まえて、再生性の肝細胞増殖が肝腫瘍の発生を強く増強するという概念が一般的に受け入れられている。

肝RDS試験陽性を示す非傷害性の肝がん原性物質として、ペルオキシゾーム増生物質 [clofibrate, dehydroepiandrosteroneおよびdi(2-ethylhexyl)phthalate], ホルモン様物質 (dehydroepiandrosterone, diethylstilbestrolおよび 17α -ethynylestradiol) および薬物代謝酵素誘導物質 (phenobarbital sodium) を検討した結果、すべてが投与後24時間の早期にRDSを誘発した。この早期RDS誘発を考慮すると、肝RDSの誘発にはなんらかの直接的な増殖刺激が作用した可能性が考えられる。YusofとEdwards(68)は、clofibrateやphenobarbitalなどの肝に対して発がんプロモーション作用をもつ化学物質はin vitroで初代培養肝細胞のRDSを上昇させ、肝発が

んプロモーション作用をもたないものはこれを上昇させないことを報告している。これらの事実は、いくつかの非傷害性の肝がん原性物質は直接的に肝細胞の増殖を刺激する分裂促進物質 (mitogens) であることを示唆している (Fig. 4)。

上述したように、肝RDSの最大誘発時間を基準にRDS試験陽性と判定した化学物質を見ると、投与後24時間に肝RDSの最大誘発率を示したものと投与後39あるいは48時間に最大誘発率を示したものに大きく分類でき、前者には肝細胞に非傷害性の化学物質が、後者には傷害性の化学物質が多く含まれていた (Table 5)。このことから、未知の化学物質を本試験で評価し陽性結果が得られた場合、その肝RDS最大誘発時間から未知の化学物質が肝細胞傷害性を有するか否かをも判定可能と考える。

非変異・肝がん原性物質の11-aminoundecanoic acid, chlorendic acid, 1,4-dioxaneおよびD,L-ethionineは本研究において陰性と判定された (Table 5および7)。その原因は本RDS試験が被験物質の単回投与により実施されているため、微弱なRDS誘発能をもつ化学物質に対してその感受性が低いことも考えられ、連続投与による検討が今後必要と思われる。

一方、非がん原性物質のうちbenzoin, butylated hydroxytoluene, geranyl acetate, D,L-mentholおよび3-chloro-*p*-toluidineは投与後24または39時間に明らかな肝RDSを誘発した (Table 6)。この早期の肝RDS誘発から判断して、非肝傷害性の肝細胞増殖、すなわち被験物質のもつ肝細胞の分裂促進活性を検出したものと考えられる。これらの5種類の非がん原性物質のうちbutylated hydroxytolueneはラットを用いるイニシエーション・プロモーションの2段階発がん実験で肝に対して発がんプロモーション作用をもつこ

とがすでに報告されている (34, 49, 52)。また, butylated hydroxytolueneはその単独投与でも2世代にわたってラットに投与を継続した場合に肝にがん原性を示すことが知られている (48)。したがって, 他の4種類のRDS陽性の非がん原性物質も弱い肝発がんプロモーション活性や肝がん原性を潜在的に有する可能性があると考えられる。

しかしながら, Shulte-Hermannら (58) は, phenobarbitalなどをラットに連続投与した場合, 肝RDSは正常な肝組織中にある肝細胞より前がん病変部と認識された部位にある肝細胞で強く誘発されることを報告している。ある種の肝がん原性物質が変異肝細胞のみを選択的に増殖させるものと仮定した場合, RDS試験のような正常肝細胞を使用した試験系での陽性結果は必ずしも肝がん原性に関連しない可能性がある。それゆえ, 上述のRDS試験陽性の非がん原性物質が変異肝細胞をも増殖させるか否かの検討が今後必要であろう。

変異原性試験陽性の非がん原性物質 (変異・非がん原性物質) は, 変異原性陽性の意味を解釈する上で問題にされる化学物質である。本研究において使用された25種類の非がん原性物質のうち11種類がAmes試験, 染色体異常試験または小核試験で陽性を示す変異・非がん原性物質であった (benzyl alcohol, 2-chloroethanol, dimethoate, 8-hydroxyquinoline, lithocholic acid, 4-nitroanthranilic acid, 4-nitro-*o*-phenylenediamine, phenol, *p*-phenylenediamine dihydrochloride, 2,5-toluenediamine sulfateおよび2,6-toluenediamine)。これらの変異・非がん原性物質は全て本RDS試験で陰性結果を示した (Table 6)。これらの中には5種類の芳香族アミン系化学物質 (4-nitroanthranilic acid, 4-nitro-*o*-phenylenediamine, *p*-phenylenediamine dihydrochloride, 2,5-toluene-

diamine sulfate および 2,6-toluenediamine) が含まれている。特に、2,4-および 2,6-toluenediamine はラット肝 UDS 試験において肝に対して同等の変異原性を示すにもかかわらず、前者は肝がん原性物質であり後者は非がん原性物質である。Cunningham ら (13) は、この 2 種類の化学物質の差は前者のみが肝細胞の増殖を誘発することにあると指摘している。11 種類の変異・非がん原性物質がラット肝にがん原性を誘発しない理由に限れば、これらの化学物質が肝に対して RDS 誘発の能力が欠失していることに起因しているかもしれない。しかしながら、本ラット肝 RDS 試験は少なくとも変異原性陰性の肝がん原性物質を早期に検出する新しい試験法として開発した。したがって、上述の変異原性陽性を示すがん原性物質と RDS 誘発との関連は今後の研究の課題としなければならない。

第 5 節 結語

- (1) ラット肝 RDS 試験は、Ames 試験陰性の非変異・肝がん原性物質の 82% (18/22) を陽性に検出した。
- (2) ラット肝 RDS 試験は、非がん原性物質の 80% (20/25) を陰性に検出した。
- (3) ラット肝 RDS 試験の総合検出率は 81% (38/47) であった。

以上の事実から、本ラット肝 RDS 試験は非変異・肝がん原性物質の早期検出法として有用であることを明らかにした。

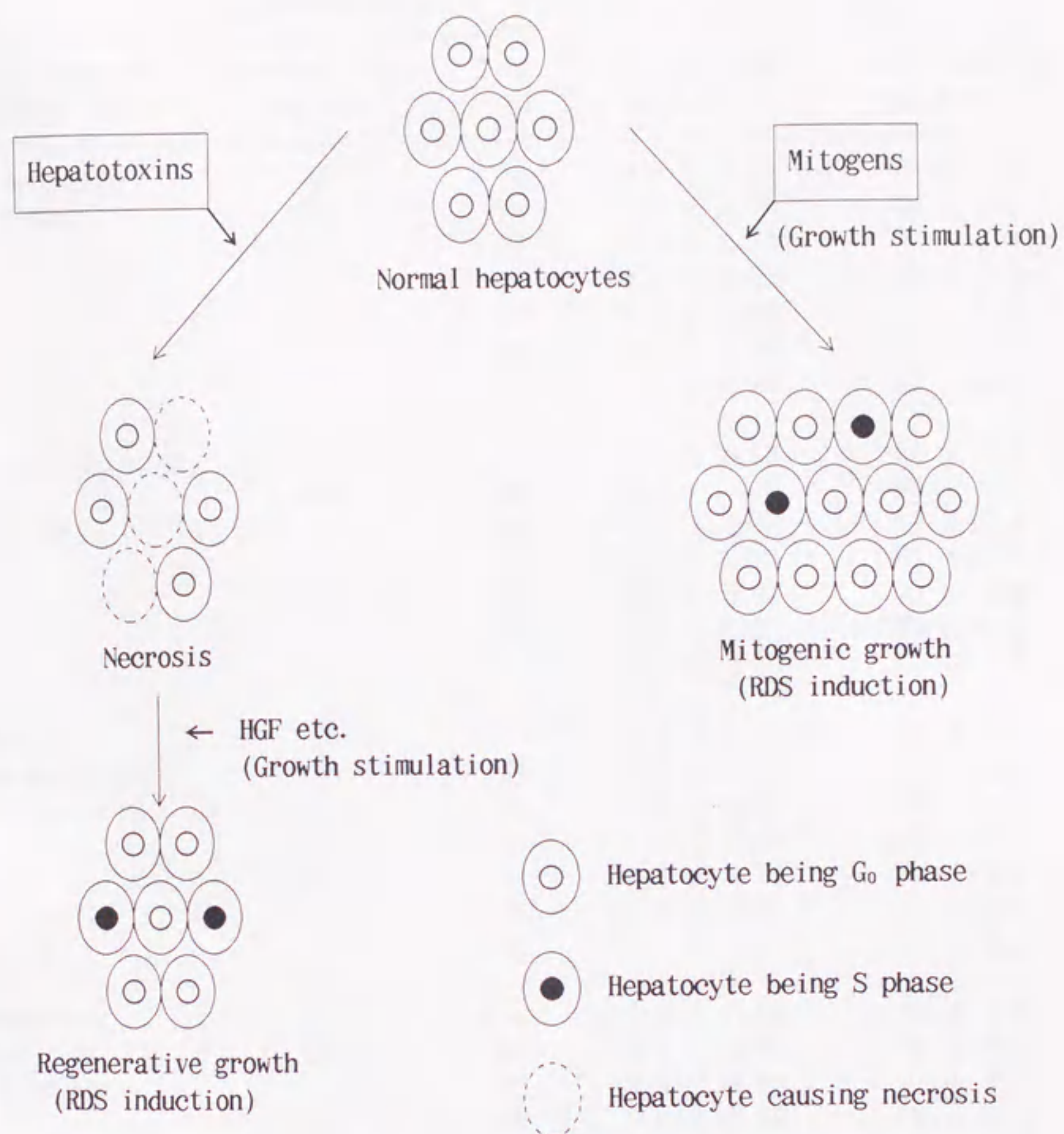


Fig. 4 Mechanism of RDS induction by nongenotoxic hepatocarcinogens in rat hepatocytes (hypothesis).

TABLE 5 Results of RDS test time-course experiments using rat hepatocytes with nongenotoxic hepatocarcinogens

Test chemical (CAS No. ^a)	Treatment dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^b (%±S.D.)	Cell viability ^c (%±S.D.)
Acetaminophen (103-90-2)	0	—	0.6 ± 0.17	79 ± 7.0
	500 ^d	24	2.2 ± 1.30 ^P	86 ± 8.6
		39	0.5 ± 0.11	88 ± 2.0
		48	0.3 ± 0.09	87 ± 4.4
	1,000 ^e	24	0.1 ± 0.15	80 ± 6.0
		39	9.4 ± 4.98 ^P	73 ± 7.7
		48	9.1 ± 5.24 ^P	52 ± 26.4
11-Aminoundecanoic acid (2432-99-7)	0	—	0.4 ± 0.08	80 ± 7.4
	1,000 ^d	24	0.2 ± 0.19	85 ± 7.6
		39	0.5 ± 0.19	67 ± 19.0
		48	0.1 ± 0.04	71 ± 10.7
	2,000 ^e	24	0.1 ± 0.03	72 ± 6.9
		39	0.2 ± 0.20	63 ± 24.8
		48	0.1 ± 0.08	53 ± 17.2 *
Carbon tetrachloride (56-23-5)	0	—	0.4 ± 0.27	70 ± 3.0
	700 ^d	24	0.1 ± 0.15	68 ± 8.9
		39	0.2 ± 0.09	72 ± 4.5
		48	1.5 ± 0.81 ^E	73 ± 9.8
	1,400 ^e	24	13.6 ± 4.76 ^P	65 ± 8.1
		39	12.4 ± 5.75 ^P	78 ± 5.7
		48	14.9 ± 2.15 ^P	73 ± 9.2
Chlorendic acid (115-28-6)	0	—	0.7 ± 0.33	72 ± 4.8
	450 ^d	24	0.1 ± 0.05	77 ± 3.7
		39	0.1 ± 0.05	71 ± 7.0
		48	0.1 ± 0.05	78 ± 6.6
	900 ^e	24	0.1 ± 0.04	78 ± 1.2
		39	0.1 ± 0.03	74 ± 4.8
		48	0.1 ± 0.03	68 ± 9.7
Chloroform (67-66-3)	0	—	0.5 ± 0.05	80 ± 7.3
	250 ^f	24	0.3 ± 0.07	84 ± 4.4
		39	0.4 ± 0.18	81 ± 6.8
		48	0.3 ± 0.24	73 ± 3.9
	500 ^d	24	0.3 ± 0.04	81 ± 4.7
		39	0.6 ± 0.09	64 ± 8.3 *
		48	0.3 ± 0.19	75 ± 7.0
	1,000 ^e	24	0.2 ± 0.02	49 ± 18.0 *
		39	7.5 ± 3.86 ^P	53 ± 12.5 *
		48	10.2 ± 2.66 ^P	56 ± 11.0 *

TABLE 5 (continued)

Test chemical (CAS No. ^a)	Treatment dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^b (%±S.D.)	Cell viability ^c (%±S.D.)
Clofibrate (637-07-0)	0	—	0.8 ± 0.16	84 ± 9.2
	235 ^d	24	2.3 ± 0.99 ^P	87 ± 1.6
		39	0.2 ± 0.18	86 ± 3.4
		48	0.1 ± 0.07	79 ± 11.9
	470 ^e	24	0.1 ± 0.07	74 ± 6.3
		39	1.1 ± 0.94 ^E	64 ± 16.2
		48	0.8 ± 0.29	75 ± 2.1
<i>p, p'</i> -DDT (50-29-3)	0	—	0.8 ± 0.38	70 ± 9.8
	50 ^d	24	1.3 ± 0.22 ^E	73 ± 10.8
		39	0.8 ± 0.22	67 ± 7.5
		48	0.6 ± 0.33	72 ± 13.6
	100 ^e	24	1.2 ± 0.51 ^E	63 ± 11.5
		39	0.4 ± 0.38	71 ± 10.2
		48	0.5 ± 0.34	62 ± 11.7
Dehydroepiandrosterone (53-43-0)	0	—	0.2 ± 0.08	73 ± 11.3
	500 ^d	24	8.7 ± 1.26 ^P	73 ± 10.2
		39	2.7 ± 1.38 ^P	63 ± 11.8
		48	1.1 ± 0.74 ^E	67 ± 12.7
	1,000 ^e	24	8.1 ± 2.10 ^P	65 ± 8.7
		39	3.1 ± 0.55 ^P	62 ± 13.7
		48	1.3 ± 0.36 ^E	62 ± 3.5
Di(2-ethylhexyl) phthalate (117-81-7)	0	—	0.5 ± 0.11	81 ± 9.7
	1,000 ^d	24	2.6 ± 0.55 ^P	83 ± 6.8
		39	0.7 ± 0.42	75 ± 6.8
		48	0.3 ± 0.13	64 ± 11.6
	2,000 ^e	24	2.1 ± 0.56 ^P	79 ± 10.3
		39	0.9 ± 0.51	72 ± 11.3
		48	0.3 ± 0.16	68 ± 7.8
Diethylstilbestrol (56-53-1)	0	—	0.7 ± 0.10	72 ± 11.4
	500 ^d	24	2.9 ± 0.70 ^P	77 ± 4.5
		39	0.8 ± 0.25	75 ± 3.6
		48	0.5 ± 0.29	72 ± 9.1
	1,000 ^e	24	7.9 ± 2.44 ^P	63 ± 8.6
		39	5.8 ± 1.53 ^P	65 ± 5.2
		48	1.0 ± 0.46 ^E	66 ± 1.5

TABLE 5 (continued)

Test chemical (CAS No. ^a)	Treatment dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^b (%±S.D.)	Cell viability ^c (%±S.D.)
1,4-Dioxane (123-91-1)	0	—	0.4 ± 0.32	89 ± 3.9
	1,000 ^d	24	0.4 ± 0.40	82 ± 5.4
		39	0.3 ± 0.25	73 ± 10.7 *
		48	0.3 ± 0.16	74 ± 9.7 *
	2,000 ^e	24	1.1 ± 0.43 ^E	79 ± 10.1
		39	0.4 ± 0.42	74 ± 10.2 *
		48	0.7 ± 0.43	71 ± 16.4
D,L-Ethionine (67-21-0)	0	—	0.5 ± 0.11	81 ± 7.1
	1,000 ^d	24	0.1 ± 0.05	73 ± 13.2
		39	0.7 ± 0.27	72 ± 6.4
		48	0.5 ± 0.18	76 ± 5.5
	2,000 ^e	24	0.1 ± 0.05	63 ± 15.3
		39	1.2 ± 0.23 ^E	67 ± 6.9 *
		48	0.4 ± 0.24	67 ± 5.0
17 α -Ethinylestradiol (57-63-6)	0	—	0.5 ± 0.24	79 ± 9.8
	500 ^d	24	9.0 ± 1.55 ^P	86 ± 4.3
		39	2.5 ± 0.57 ^P	82 ± 5.7
		48	2.2 ± 0.95 ^P	73 ± 7.0
	1,000 ^e	24	9.5 ± 2.34 ^P	78 ± 12.1
		39	2.6 ± 1.56 ^P	77 ± 16.1
		48	1.0 ± 0.09 ^E	78 ± 2.9
α -Hexachloro- cyclohexane (319-84-6)	0	—	0.2 ± 0.13	85 ± 7.2
	1,000 ^d	24	0.7 ± 0.34	87 ± 3.0
		39	1.8 ± 0.54 ^E	79 ± 3.6
		48	2.9 ± 0.97 ^P	63 ± 3.3 *
	2,000 ^e	24	0.4 ± 0.13	75 ± 9.0
		39	2.5 ± 1.39 ^P	80 ± 4.2
		48	4.4 ± 1.37 ^P	81 ± 9.1
Methyl carbamate (598-55-0)	0	—	0.7 ± 0.26	72 ± 6.1
	1,000 ^d	24	1.1 ± 0.17 ^E	74 ± 1.4
		39	0.5 ± 0.19	73 ± 8.1
		48	0.5 ± 0.18	83 ± 5.9
	2,000 ^e	24	0.2 ± 0.15	81 ± 6.1
		39	0.1 ± 0.11	72 ± 6.3
		48	0.1 ± 0.07	53 ± 30.4

TABLE 5 (continued)

Test chemical (CAS No. ^a)	Treatment dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^b (%±S.D.)	Cell viability ^c (%±S.D.)
Phenobarbital sodium (57-30-7)	0	—	0.4 ± 0.21	73 ± 8.5
	38 ^d	24	2.0 ± 0.92 ^P	77 ± 4.8
		39	1.1 ± 0.49 ^E	69 ± 11.8
		48	0.6 ± 0.39	73 ± 6.0
		75 ^e	24	0.1 ± 0.02
	39	1.1 ± 0.17 ^E	82 ± 2.2	
	48	0.6 ± 0.09	83 ± 7.7	
Polybrominated biphenyls (67774-32-7)	0	—	0.3 ± 0.10	71 ± 13.1
	1,000 ^d	24	2.6 ± 0.94 ^P	76 ± 7.4
		39	1.6 ± 0.24 ^E	72 ± 5.9
		48	3.0 ± 1.19 ^P	77 ± 6.1
	2,000 ^e	24	4.5 ± 0.96 ^P	77 ± 8.6
		39	1.7 ± 0.92 ^E	69 ± 5.5
		48	1.4 ± 0.22 ^E	77 ± 6.4
Safrole (94-59-7)	0	—	0.5 ± 0.11	79 ± 4.5
	500 ^d	24	0.4 ± 0.05	77 ± 7.5
		39	1.5 ± 0.32 ^E	75 ± 0.7
		48	0.4 ± 0.14	73 ± 10.1
	1,000 ^e	24	0.1 ± 0.24	78 ± 4.0
		39	4.7 ± 2.20 ^P	72 ± 8.0
		48	0.9 ± 0.70	70 ± 5.3 *
Tannic acid ^g (1041-55-4)	0	—	0.6 ± 0.20	76 ± 14.6
	375 ^d	24	0.7 ± 0.56	60 ± 18.4
		39	12.7 ± 9.92 ^P	65 ± 3.8
		48	9.1 ± 3.54 ^P	59 ± 5.0
	750 ^e	24	0.9 ± 0.61	60 ± 10.7
		39	7.7 ± 2.78 ^P	66 ± 5.8
		48	10.0 ± 2.30 ^P	69 ± 1.5
	1,000 ^e	24	0.5 ± 0.41	71 ± 7.1
		39	0.4 ± 0.39	64 ± 9.1
		48	0.2 ± 0.16	61 ± 13.9
Thioacetamide (62-55-5)	0	—	0.5 ± 0.19	79 ± 8.6
	75 ^d	24	2.4 ± 0.96 ^P	85 ± 5.0
		39	2.7 ± 1.11 ^P	72 ± 18.2
		48	2.7 ± 1.17 ^P	71 ± 3.9
	150 ^e	24	0.2 ± 0.15	62 ± 7.3 *
		39	12.1 ± 1.23 ^P	66 ± 2.9 *
		48	13.8 ± 1.23 ^P	66 ± 8.6

TABLE 5 (continued)

Test chemical (CAS No. ^a)	Treatment dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^b (%±S.D.)	Cell viability ^c (%±S.D.)
Urethane (51-79-6)	0	—	0.6 ± 0.17	79 ± 8.6
	250 ^d	24	1.0 ± 0.29 ^e	84 ± 6.0
		39	0.4 ± 0.37	85 ± 4.6
		48	0.5 ± 0.12	89 ± 3.8
	500 ^e	24	0.2 ± 0.03	70 ± 7.0
		39	0.3 ± 0.22	84 ± 2.5
		48	13.2 ± 3.02 ^f	60 ± 9.4 [*]
Wy-14,643 (50892-23-4)	0	—	0.6 ± 0.32	79 ± 4.2
	1,000 ^d	24	3.8 ± 2.24 ^f	83 ± 3.7
		39	4.1 ± 0.81 ^f	80 ± 4.1
		48	3.0 ± 0.78 ^f	84 ± 2.0
	2,000 ^e	24	2.7 ± 1.78 ^f	62 ± 18.3
		39	3.3 ± 1.04 ^f	73 ± 13.6
		48	1.2 ± 0.57 ^e	77 ± 3.6

^a Chemical abstracts service registry number.

^b RDS incidences are the percentages of RDS positive hepatocytes calculated from data for 2,000 hepatocytes/liver±S.D. (n=4). Based on our judgement criteria, incidences of 2.0% or more are judged as positive responses (P), those between 1.0 and 2.0% being equivocal (E) and those less than 1.0% being negative.

^c Cell viability was determined by the trypan blue exclusion test. Asterisks (*) indicate significant decrease compared to the relevant control (P<0.05).

^d 1/2 MTD; ^e MTD; ^f 1/4 MTD.

^g Tannic acid gave positive responses with s.c. injection (375 and 750 mg/kg), but not after single gavage (1,000 mg/kg).

TABLE 6 Results of RDS test time-course experiments using rat hepatocytes with noncarcinogens

Test chemical (CAS No. ^a)	Treatment dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^b (%±S.D.)	Cell viability ^c (%±S.D.)
<i>o</i> -Anthranilic acid (118-92-3)	0	—	0.5 ± 0.09	73 ± 4.6
	1,000 ^d	24	0.5 ± 0.27	80 ± 0.6
		39	0.7 ± 0.35	70 ±10.5
		48	0.3 ± 0.17	73 ± 3.1
		2,000 ^e	24	0.1 ± 0.07
		39	0.1 ± 0.10	77 ± 4.1
		48	0.2 ± 0.08	76 ± 3.8
		L-Ascorbic acid (50-81-7)	0	—
1,000 ^d	24		0.4 ± 0.34	73 ± 2.0
	39		0.2 ± 0.15	75 ± 6.8
	48		0.3 ± 0.24	68 ± 8.3
	2,000 ^e		24	0.1 ± 0.09
	39		0.5 ± 0.17	70 ± 2.0
	48		0.4 ± 0.32	69 ±11.3
	Benzoin (119-53-9)		0	—
1,000 ^d		24	9.6 ± 1.07 ^p	76 ± 2.2
		39	0.5 ± 0.16	77 ± 6.2
		48	0.4 ± 0.13	81 ± 3.1
		2,000 ^e	24	0.0
		39	0.2 ± 0.10	78 ± 5.8
		48	0.2 ± 0.10	62 ±19.1
		Benzyl alcohol (100-51-6)	0	—
300 ^d	24		0.3 ± 0.23	70 ± 5.0
	39		0.3 ± 0.18	67 ± 6.6 *
	48		0.2 ± 0.16	66 ± 5.9 *
	600 ^e		24	0.5 ± 0.33
	39		0.3 ± 0.18	72 ± 8.9
	48		0.3 ± 0.14	69 ± 4.7 *
	Butylated hydroxytoluene (128-37-0)		0	—
450 ^d		24	0.3 ± 0.19	75 ± 3.3
		39	1.2 ± 0.20 ^e	68 ± 9.9
		48	0.2 ± 0.09	71 ± 8.0
		900 ^e	24	2.5 ± 4.12 ^p
		39	9.2 ± 6.02 ^p	75 ± 6.4
		48	0.8 ± 0.30	76 ± 5.6

TABLE 6 (continued)

Test chemical (CAS No. ^a)	Treatment dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^b (%±S.D.)	Cell viability ^c (%±S.D.)
ϵ -Caprolactam (105-60-2)	0	—	0.5 ± 0.16	86 ± 1.6
	350 ^d	24	0.4 ± 0.27	81 ± 10.7
		39	0.3 ± 0.13	81 ± 1.8
		48	0.2 ± 0.08	82 ± 9.1
	700 ^e	24	0.0 ± 0.05	85 ± 3.2
		39	0.1 ± 0.03	89 ± 0.4
		48	0.1 ± 0.05	81 ± 7.6
2-Chloroethanol (107-07-3)	0	—	0.5 ± 0.19	68 ± 12.0
	18 ^d	24	0.2 ± 0.16	71 ± 3.4
		39	0.2 ± 0.14	73 ± 11.2
		48	0.2 ± 0.09	69 ± 9.9
	35 ^e	24	0.0 ± 0.03	66 ± 5.8
		39	0.2 ± 0.08	72 ± 3.3
		48	0.2 ± 0.19	70 ± 10.6
3-Chloro- <i>p</i> -toluidine (95-74-9)	0	—	0.6 ± 0.19	67 ± 9.6
	375 ^d	24	3.0 ± 0.85 ^P	75 ± 10.2
		39	1.3 ± 0.37 ^E	73 ± 2.6
		48	0.5 ± 0.23	67 ± 6.1
	750 ^e	24	0.1 ± 0.17	54 ± 22.0
		39	0.9 ± 0.45	68 ± 1.0
		48	0.1 ± 0.10	76 ± 4.6
Dimethoate (60-51-5)	0	—	0.4 ± 0.15	79 ± 2.7
	130 ^d	24	0.1 ± 0.05	85 ± 1.2
		39	0.1 ± 0.05	75 ± 8.2
		48	0.0	80 ± 7.6
	260 ^e	24	0.0 ± 0.03	83 ± 4.0
		39	0.0 ± 0.03	72 ± 8.8
		48	0.0 ± 0.03	72 ± 5.1
Geranyl acetate (105-87-7)	0	—	0.3 ± 0.28	75 ± 8.7
	1,000 ^d	24	2.4 ± 1.05 ^P	84 ± 7.3
		39	0.3 ± 0.11	74 ± 11.6
		48	0.2 ± 0.09	70 ± 10.1
	2,000 ^e	24	5.7 ± 1.73 ^P	77 ± 8.0
		39	0.4 ± 0.15	70 ± 10.6
		48	0.1 ± 0.06	81 ± 6.0

TABLE 6 (continued)

Test chemical (CAS No. ^a)	Treatment dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^b (%±S.D.)	Cell viability ^c (%±S.D.)
Halothane (151-67-7)	0	—	0.6 ± 0.24	72 ± 7.3
	1,000 ^d	24	0.4 ± 0.12	69 ± 16.9
		39	0.5 ± 0.42	59 ± 13.4
		48	0.4 ± 0.16	75 ± 4.8
	2,000 ^e	24	0.3 ± 0.27	68 ± 6.1
		39	0.5 ± 0.22	67 ± 11.1
		48	0.2 ± 0.11	69 ± 9.3
8-Hydroxyquinoline (148-24-3)	0	—	0.6 ± 0.25	73 ± 8.6
	300 ^d	24	0.3 ± 0.25	68 ± 4.0
		39	0.1 ± 0.07	68 ± 15.5
		48	0.1 ± 0.10	65 ± 24.3
	600 ^e	24	0.1 ± 0.03	65 ± 13.7
		39	0.1 ± 0.00	72 ± 14.9
		48	0.1 ± 0.10	64 ± 10.6
Lindane (58-89-9)	0	—	0.6 ± 0.10	86 ± 7.7
	20 ^d	24	0.6 ± 0.18	82 ± 4.3
		39	0.2 ± 0.06	80 ± 8.7
		48	0.3 ± 0.11	73 ± 5.8 *
	40 ^e	24	0.1 ± 0.05	79 ± 10.7
		39	0.2 ± 0.14	65 ± 6.4 *
		48	0.1 ± 0.08	82 ± 2.5
Lithocholic acid (434-13-9)	0	—	0.6 ± 0.20	72 ± 13.8
	1,000 ^d	24	0.2 ± 0.09	64 ± 5.0
		39	0.8 ± 0.63	55 ± 10.5
		48	0.1 ± 0.14	66 ± 5.0
	2,000 ^e	24	0.3 ± 0.24	75 ± 6.7
		39	0.6 ± 0.74	79 ± 3.7
		48	1.1 ± 0.49 ^e	82 ± 2.1
D-Mannitol (69-65-8)	0	—	0.6 ± 0.05	75 ± 10.1
	1,000 ^d	24	0.1 ± 0.15	70 ± 7.5
		39	0.7 ± 0.55	70 ± 3.4
		48	0.3 ± 0.04	74 ± 9.5
	2,000 ^e	24	0.1 ± 0.03	65 ± 5.3
		39	0.1 ± 0.11	72 ± 12.0
		48	0.2 ± 0.12	65 ± 6.2

TABLE 6 (continued)

Test chemical (CAS No. ^a)	Treatment dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^b (%±S.D.)	Cell viability ^c (%±S.D.)	
D,L-Menthol (15356-70-4)	0	—	0.7 ± 0.20	76 ±14.6	
	725 ^d	24	6.0 ± 2.15 ^p	75 ± 9.0	
		39	0.8 ± 0.48	74 ± 4.0	
		48	0.6 ± 0.34	67 ± 7.2	
		1,450 ^e	24	0.6 ± 0.31	66 ± 9.0
	39		3.9 ± 0.57 ^p	72 ± 5.6	
	48		0.5 ± 0.16	73 ± 6.1	
	Methoxychlor (72-43-5)	0	—	0.4 ± 0.19	72 ±13.8
		1,000 ^d	24	0.9 ± 0.60	68 ± 8.6
39			0.8 ± 0.32	64 ± 5.7	
48			0.6 ± 0.26	77 ± 4.9	
2,000 ^e			24	0.7 ± 0.20	73 ± 8.7
		39	1.1 ± 0.08 ^E	66 ± 7.9	
		48	0.6 ± 0.07	76 ± 6.5	
4-Nitroanthranilic acid (619-17-0)		0	—	0.4 ± 0.11	63 ± 7.7
		160 ^d	24	0.3 ± 0.18	61 ± 9.2
	39		0.2 ± 0.03	56 ±28.0	
	48		0.2 ± 0.09	72 ± 4.8	
	320 ^e		24	0.5 ± 0.09	57 ± 4.8
		39	0.3 ± 0.20	60 ± 3.0	
		48	0.4 ± 0.36	65 ± 3.6	
	4-Nitro- <i>o</i> - phenylenediamine (99-56-9)	0	—	0.4 ± 0.08	70 ± 8.6
		170 ^d	24	0.3 ± 0.16	73 ±13.1
39			0.7 ± 0.31	65 ±10.4	
48			0.2 ± 0.12	61 ±16.0	
340 ^e			24	0.1 ± 0.06	70 ±11.1
		39	1.2 ± 1.34 ^E	59 ± 6.1	
		48	0.2 ± 0.05	62 ± 5.5	
Phenol (108-95-2)		0	—	0.7 ± 0.11	76 ± 6.8
		80 ^d	24	0.3 ± 0.18	78 ± 5.7
	39		0.2 ± 0.07	75 ± 7.1	
	48		0.1 ± 0.08	65 ±16.1	
	160 ^e		24	0.1 ± 0.05	77 ±10.5
		39	0.2 ± 0.10	73 ±13.7	
		48	0.1 ± 0.05	71 ± 4.2	

TABLE 6 (continued)

Test chemical (CAS No. ^a)	Treatment dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^b (%±S.D.)	Cell viability ^c (%±S.D.)
<i>p</i> -Phenylenediamine dihydrochloride (624-18-0)	0	—	0.4 ± 0.15	67 ± 4.9
	38 ^d	24	0.4 ± 0.34	65 ± 7.9
		39	0.2 ± 0.29	59 ±18.8
		48	0.2 ± 0.05	63 ±13.9
		75 ^e	24	0.5 ± 0.30
	39		0.1 ± 0.03	71 ±12.3
	48		0.1 ± 0.10	68 ±10.1
	Sulfisoxazole (127-69-5)	0	—	0.8 ± 0.27
1,000 ^d		24	0.4 ± 0.41	74 ±12.9
		39	0.1 ± 0.05	76 ± 6.3
		48	0.2 ± 0.15	76 ± 5.3
		2,000 ^e	24	0.1 ± 0.05
39			0.3 ± 0.29	74 ± 5.6
48			0.3 ± 0.13	76 ± 6.4
2,5-Toluenediamine sulfate (6369-59-1)		0	—	0.2 ± 0.18
	30 ^d	24	0.7 ± 0.45	72 ± 8.8
		39	0.2 ± 0.09	65 ±10.0
		48	0.1 ± 0.10	64 ± 8.7
		60 ^e	24	0.2 ± 0.13
	39		0.1 ± 0.09	66 ±25.7
	48		0.1 ± 0.10	71 ± 9.0
	2,6-Toluenediamine (823-40-5)	0	—	0.7 ± 0.12
125 ^d		24	0.1 ± 0.06	75 ± 9.7
		39	0.1 ± 0.05	62 ±18.6
		48	0.1 ± 0.05	67 ± 2.0
		250 ^e	24	0.1 ± 0.05
39			0.2 ± 0.11	64 ±13.5
48			0.1 ± 0.03	76 ± 5.7
L-Tryptophan (73-22-3)		0	—	0.5 ± 0.14
	1,000 ^d	24	0.6 ± 0.18	78 ± 8.5
		39	0.5 ± 0.30	75 ± 3.5
		48	0.4 ± 0.21	74 ± 7.2
		2,000 ^e	24	0.3 ± 0.06
	39		0.9 ± 0.13	69 ± 5.6
	48		0.9 ± 0.18	70 ±11.6

^a Chemical abstracts service registry number.

^b RDS incidences are the percentages of RDS positive hepatocytes calculated from data for 2,000 hepatocytes/liver±S.D. (n=4). Based on our judgement criteria, incidences of 2.0% or more are judged as positive responses (P), those between 1.0 and 2.0% being equivocal (E) and those less than 1.0% being negative.

^c Cell viability was determined by the trypan blue exclusion test. Asterisks (*) indicate the significant decrease compared to the relevant control (p<0.05).

^d 1/2 MTD; ^e MTD.

TABLE 7 Results of RDS test dose-response experiments using rat hepatocytes with nongenotoxic hepatocarcinogens or noncarcinogens showing equivocal responses in time-course experiments

Test chemical	Treatment dose (mg/kg)	Time (h)	RDS incidence ^a (%±S.D.)	Cell viability ^b (%±S.D.)
<i>Hepatocarcinogens</i>				
<i>p,p'</i> -DDT	0	24	0.2 ± 0.08	71 ± 9.8
	25 ^c	24	1.1 ± 0.16 ^P	73 ± 12.2
	50 ^d	24	1.4 ± 0.58 ^P	70 ± 8.2
	100 ^e	24	1.3 ± 0.46 ^P	71 ± 10.5
1,4-Dioxan	0	24	0.5 ± 0.27	77 ± 10.0
	500 ^c	24	0.5 ± 0.26	75 ± 4.1
	1,000 ^d	24	0.4 ± 0.19	79 ± 3.0
	2,000 ^e	24	0.1 ± 0.13	71 ± 16.4
D,L-Ethionine	0	39	0.5 ± 0.26	68 ± 12.7
	500 ^c	39	0.5 ± 0.27	67 ± 16.0
	1,000 ^d	39	0.2 ± 0.21	71 ± 12.0
	2,000 ^e	39	0.7 ± 0.44	70 ± 9.2
Methyl carbamate	0	24	0.5 ± 0.25	87 ± 5.3
	500 ^c	24	0.7 ± 0.29	75 ± 15.2
	1,000 ^d	24	1.1 ± 0.14 ^P	68 ± 27.1
	2,000 ^e	24	0.1 ± 0.08	69 ± 22.9
<i>Noncarcinogens</i>				
Lithocholic acid	0	48	0.2 ± 0.13	71 ± 12.8
	500 ^c	48	0.2 ± 0.11	72 ± 13.1
	1,000 ^d	48	0.5 ± 0.37	68 ± 2.0
	2,000 ^e	48	0.8 ± 0.39	66 ± 7.7
Methoxychlor	0	39	0.3 ± 0.13	72 ± 1.8
	500 ^c	39	0.7 ± 0.26	74 ± 4.9
	1,000 ^d	39	0.9 ± 0.03	72 ± 14.8
	2,000 ^e	39	0.7 ± 0.25	75 ± 9.6
4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine	0	39	0.3 ± 0.14	71 ± 10.7
	85 ^c	39	0.7 ± 0.34	70 ± 16.0
	170 ^d	39	0.8 ± 0.15	66 ± 16.8
	340 ^e	39	0.7 ± 0.18	68 ± 6.0

^a RDS incidences are the percentages of RDS positive hepatocytes calculated from data for 2,000 hepatocytes/liver±S.D. (n=5). Based on our final judgement criteria, incidences of 1.0% or more are judged as positive responses (P), those less than 1.0% being negative.

^b Cell viability was determined by the trypan blue exclusion test.

^c 1/4 MTD; ^d 1/2 MTD; ^e MTD.

TABLE 8 Summary of mutagenicity and RDS test results for the 22 rat hepatocarcinogens

Test chemical	Mutagenicity test				RDS test	Reference
	SAL	CA	MN	UDS		
Acetaminophen	—	+			+	20, 27
11-Aminoundecanoic acid	—	—		—	—	4, 41, 69
Carbon tetrachloride	—	—	—	—	+	20, 27, 38, 42
Chlorendic acid	—				—	4
Chloroform	—	—	—		+	20, 27
Clofibrate	—	+			+	20, 27, 61
<i>p, p'</i> -DDT	—	+	—		+	4, 20, 27
Dehydroepiandrosterone	—				+	51
Di(2-ethylhexyl)phthalate	—	—	—	—	+	4, 9, 42, 67, 69
Diethylstilbestrol	—	+	+		+	25, 27, 36
1,4-Dioxane	—		—		—	4, 42
D,L-Ethionine	—	—			—	16, 17, 20, 27, 70
17 α -Ethinylestradiol	—	—			+	26, 27
α -Hexachlorocyclohexane	—		—		+	20, 31, 42
Methyl carbamate	—	—			+	4, 70
Phenobarbital sodium	—	+			+	20, 27, 37, 50
Polybrominated biphenyls	—	—		—	+	4, 40, 69
Safrole	—	+	—	—	+	20, 27, 39
Tannic acid	—				+	28, 31
Thioacetamide	—	—	+		+	18, 27, 36
Urethane	—	+	+		+	1, 27, 36
Wy-14,643	—			—	+	11, 31, 53

SAL, Ames test; CA, in vitro chromosome aberration test; MN, in vivo micronucleus test; UDS, in vivo-in vitro rat liver unscheduled DNA synthesis test; +, positive; —, negative.

TABLE 9 Summary of mutagenicity and RDS test results for the 25 noncarcinogens

Test chemical	Mutagenicity test				RDS test	Reference
	SAL	CA	MN	UDS		
<i>o</i> -Anthranilic acid	—				—	4
L-Ascorbic acid	—	—	—		—	4, 27
Benzoin	—	—			+	4, 69
Benzyl alcohol	—	+			—	4, 69
Butylated hydroxytoluene	—	—			+	4, 27, 48
ϵ -Caprolactam	—	—			—	4, 69
2-Chloroethanol	+	+			—	4, 69
3-Chloro- <i>p</i> -toluidine	—				+	4
Dimethoate	+	+	+		—	4, 27, 36
Geranyl acetate	—	—			+	4, 69
Halothane	—				—	46
8-Hydroxyquinoline	+	+		—	—	4, 69
Lindane	—				—	4
Lithocholic acid	—	+			—	4, 27
D-Mannitol	—	—			—	4, 69
D,L-Menthol	—	—			+	4, 69
Methoxychlor	—				—	4
4-Nitroanthranilic acid	+				—	4
4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine	+	+	—		—	4, 27
Phenol	—	+			—	4, 69
<i>p</i> -Phenylenediamine dihydrochloride	+	+	—		—	4, 27
Sulfisoxazole	—	—			—	4, 69
2,5-Toluenediamine sulfate	+				—	4
2,6-Toluenediamine	+	+		—	—	4, 39, 69
L-Tryptophan	—	—			—	4, 27

SAL, Ames test; CA, in vitro chromosome aberration test; MN, in vivo micronucleus test; UDS, in vivo-in vitro rat liver unscheduled DNA synthesis test; +, positive; —, negative.

結 論

環境中の非変異・がん原性物質に対する早期検出法を開発する目的で、ラット肝RDS試験法の確立と本試験法における非変異・肝がん原性物質に対する有用性について研究した。

第1章において、本試験法に最適の肝細胞の培養密度(2.5×10^4 生存肝細胞/cm²)を設定することで肝RDSの誘発肝細胞が高感度に検出できること、9週齢以上の雄性F344ラットを使用することで安定した肝RDSの自然誘発率が得られること、ならびに9週齢の雄性F344ラットの肝RDSの自然誘発率は1%未満であることを明らかにした。

第2章において、化学物質投与後の肝RDS誘発を経時的および用量反応的に検索することにより、肝RDS誘発率が1%以上の場合を陽性、1%未満の場合を陰性とするラット肝RDS試験法の判定基準を確立した。

第3章において、ラット肝RDS試験法は、22種類の非変異・肝がん原性物質の18種類を陽性（陽性検出率:82%）に、25種類の非がん原性物質の20種類を陰性（陰性検出率:80%）に検出し、総合検出率が81%であることを示した。

以上のように、第1章ではラット肝RDS試験法に最適の実験条件を明らかにした。第2章では本試験法の判定基準を明らかにした。第3章では本試験法が非変異・肝がん原性物質の短期検出法として極めて有用なことを明らかにした。したがって、本試験法を多数の環境化学物質に適用することにより、簡便かつ高精度ながん原性予測が可能になると考えられる。

今後残された課題として、肝RDSの誘発機構に対する詳細な解明と肝がん原性の誘発との関連性を明らかにする必要がある。

謝 辞

本研究において、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東京農工大学小川益男教授と三菱化成総合研究所吉川邦衛博士に深甚なる謝意を表します。また、終始変わらぬ御助言と御協力をいただきました岩手大学松坂尚典教授、東京農工大学金子賢一助教授、林谷秀樹助手および三菱化成総合研究所井上裕章博士に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、終始御協力をいただきました三菱化成総合研究所高沢博修、井上由起、村田妙子および三菱化成安全科学研究所宮川誠の各氏に心から感謝の意を表します。

本論文は以下に示す報告を主体にして、まとめたものである。

基礎となる学術論文

- (1) Uno, Y., Takasawa, H., Miyagawa, M., Inoue, Y., Murata, T., Ogawa, M. and Yoshikawa, K. (1992). In vivo-in vitro replicative DNA synthesis (RDS) test using perfused rat livers as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: I. establishment of a standard protocol. *Toxicol. Lett.* 63, 191~199.
- (2) Uno, Y., Takasawa, H., Miyagawa, M., Inoue, Y., Murata, T., Ogawa, M. and Yoshikawa, K. (1992). In vivo-in vitro replicative DNA synthesis (RDS) test using perfused rat livers as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: II. assessment of judgement criteria. *Toxicol. Lett.* 63, 201~209.
- (3) Uno, Y., Takasawa, H., Miyagawa, M., Inoue, Y., Murata, T. and Yoshikawa, K. (1994). An in vivo-in vitro replicative

DNA synthesis (RDS) test using rat hepatocytes as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: screening of 22 known positives and 25 noncarcinogens. Mutation Res. in press.

既発表学術論文

- (1) 宇野芳文, 岩瀬裕美子, 吉川邦衛 (1992). 変異原性試験実施の立場から—ラット肝複製DNA 合成(RDS) 試験の推奨—. 環境変異原研究 14, 75~83.

文献

- 1) Adenis, L., Demaille, A. and Driessens, J. (1968).
Pouvoir cancerigene de l'urethane chez le rat Sprague.
C.R. Soc. Biol. (Paris) 162, 458~461.
- 2) Ames, B.N. and Gold, L.S. (1990). Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7772~7776.
- 3) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Beije, B. (1986). Potent mitogenic activity of 4-acetylaminofluorene to the rat liver. Mutation Res. 172, 271~279.
- 4) Ashby, J. and Tennant, R.W. (1991). Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. Mutation Res. 257, 229~306.
- 5) Bermudez, E., Smith-Oliver, T. and Delehanty, L.L. (1989). The induction of DNA-strand breaks and unscheduled DNA synthesis in F-344 rat hepatocytes following in vivo administration of caprolactam or benzoin. Mutation Res. 224, 361~364.
- 6) Busser, M.T. and Lutz, W.K. (1987). Stimulation of DNA synthesis in rat and mouse liver by various tumor promoters. Carcinogenesis 8, 1433~1437.
- 7) Butterworth, B.E. (1990). Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential. Mutation Res. 239, 117~132.
- 8) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano,

- D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A protocol and guide for the *in vivo* rat hepatocytes DNA repair assay. *Mutation Res.* 189, 123~133.
- 9) Butterworth, B.E., Bermudez, E., Smith-Oliver, T., Earle, L., Cattley, R., Martin, J., Popp, J.A., Strom, S., Jirtle, R. and Michalopoulos (1984). Lack of genotoxic activity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in rat and human hepatocytes. *Carcinogenesis* 5, 1329~1335.
- 10) Butterworth, B.E. and Goldworthy, T.L. (1991). The role of cell proliferation in multistage carcinogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198, 683~687.
- 11) Cattley, R.C., Smith-Oliver, T., Butterworth, B.E. and Popp, J.A. (1988). Failure of the peroxisome proliferator Wy-14,643 to induce unscheduled DNA synthesis in rat hepatocytes following *in vivo* treatment. *Carcinogenesis* 9, 1179~1183.
- 12) Columbano, A., Ledda-Columbano, G.M., Ennas, M.G., Curto, M., Chelo, A. and Pani, P. (1990). Cell proliferation and promotion of rat liver carcinogenesis: different effect of hepatic regeneration and mitogen induced hyperplasia on the development of enzyme-altered foci. *Carcinogenesis* 11, 771~776.
- 13) Cunningham, M.L., Foley, J., Maronpot, R.R. and Matthews, H.B. (1991). Correlation of hepatocellular proliferation with hepatocarcinogenicity induced by the mutagenic non-carcinogen:carcinogen pair - 2,6- and 2,4-diaminotoluene.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 107, 562~567.

- 14) Doolittle, D.J., Muller, G. and Scribner, H.E. (1987). Relationship between hepatotoxicity and induction of replicative DNA synthesis following single or multiple doses of carbon tetrachloride. J. Toxicol. Environ. Health. 22, 63~78.
- 15) Eldridge, S.R., Tilbury, L.F., Goldsworthy, T.L. and Butterworth, B.E. (1990). Measurement of chemically induced cell proliferation in rodent liver and kidney: a comparison of 5-bromo-2'-deoxyuridine and [³H]thymidine administered by injection or osmotic pump. Carcinogenesis 11, 2245~2251.
- 16) Farber, E. (1956). Carcinoma of the liver in rats fed ethionine. Arch. Pathol. 62, 445~453.
- 17) Farber, E. (1963). Ethionine carcinogenesis. Adv. Cancer Res. 7, 383~474.
- 18) Fitzhugh, O.G. and Nelson, A.A. (1948). Liver tumors in rats fed thiourea or thioacetamide. Science 108, 626~628.
- 19) Furihata, C., Yoshida, S., Sato, Y. and Matsushima, T. (1987). Induction of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa by glandular stomach carcinogens. Jpn. J. Cancer Res. (Gann) 78, 1363~1369.
- 20) Gold, L.S., Slone, T.H., Manley, N.B. and Bernstein, L. (1991). Target organs in chronic bioassays of 533 chemical carcinogens. Environ. Health Perspect. 93, 233~246.
- 21) Gold, L.S., Slone, T.H., Stern, B.R. and Bernstein, L.

- (1993). Comparison of target organs of carcinogenicity for mutagenic and non-mutagenic chemicals. *Mutation Res.* 286, 75~100.
- 22) Green, S. (1991). The search for molecular mechanisms of non-genotoxic carcinogens. *Mutation Res.* 248, 371~374.
- 23) 林 真 (1991). 小核試験. サイエンティスト社, 東京.
- 24) Hildebrand, B., Ashby, J., Grasso, P., Sharratt, M., Bontinck, W.J. and Smith, E. [eds.] (1991). Early indicators of non-genotoxic carcinogenesis. The joint ECETOC/IPCS workshop held in Brussels, 19-20 Jun 1990. *Mutation Res.* 248, 213~374.
- 25) IARC (1979). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans:sex hormones (II). IARC Monographs 21, 173~231.
- 26) IARC (1979). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans:sex hormones (II). IARC Monographs 21, 233~255.
- 27) Ishidate, M. Jr., Harnois, M.C. and Sofuni, T. (1988). A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. *Mutation Res.* 195, 151~213.
- 28) Korpassy, B. (1959). The hepatocarcinogenicity of tannic acid. *Cancer Res.* 19, 501~507.
- 29) 黒木登志夫 (1987). 発癌性の in vivo テスト法—特にヒト発癌物質について—. *トキシコロジーフォーラム* 10, 170~177.
- 30) Lindroos, P.M., Zarnegar, R. and Michalopoulos, G.M.

- (1991). Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 13, 743~750.
- 31) Loury, D.J., Goldsworthy, T.L. and Butterworth, B.E. (1987). The value of measuring cell replication as a predictive index of tissue-specific tumorigenic potential. *In* :Butterworth, B.E. and Slaga, T. [eds.] *Nongenotoxic Mechanisms in Carcinogenesis*, pp. 119~136. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 32) Loury, D.J., Smith-Oliver, T. and Butterworth, B.E. (1987). Assessment of unscheduled and replicative DNA synthesis in rat kidney cells exposed in vitro or in vivo to unleaded gasoline. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87, 127~140.
- 33) Loury, D.J., Smith-Oliver, T., Strom, S., Jirtle, R., Michalopoulos, G. and Butterworth, B.E. (1986). Assessment of unscheduled and replicative DNA synthesis in rat hepatocytes treated in vivo and in vitro with unleaded gasoline or 2,2,4-trimethylpentane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85, 11~23.
- 34) Maeura, Y. and Williams, G.M. (1984). Enhancing effect of butylated hydroxytoluene on the development of liver altered foci and neoplasms induced by *N*-2-fluorenylacetamide in rats. *Fd. Chem. Toxic.* 22, 191~198.
- 35) Marsman, D.S., Cattley, R.C., Conway, J.G. and Popp,

- J.A. (1988). Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl) phthalate and [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinyl-thio]acetic acid (Wy-14,643) in rats. *Cancer Res.* 48, 6739~6744.
- 36) Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gen-Tox Program. *Mutation Res.* 239, 29~80.
- 37) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B.N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72, 5135~5139.
- 38) Mirsalis, J.C. and Butterworth, B.E. (1980). Detection of unscheduled DNA synthesis in hepatocytes isolated from rats treated with genotoxic agents: an in vivo-in vitro assay for potential carcinogens and mutagens. *Carcinogenesis* 1, 621~625.
- 39) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of genotoxic carcinogens in the in vivo-in vitro hepatocyte DNA repair assay. *Environ. Mutagen.* 4, 553~562.
- 40) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K., Loh, E.K., Steinmetz, K.L., Bakke, J.P., Hamilton, C.M., Spak, D.K. and Spalding, J.W.

- (1985). Induction of hepatic cell proliferation and unscheduled DNA synthesis in mouse hepatocytes following in vivo treatment. *Carcinogenesis* 6, 1521~1524.
- 41) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K., Steinmetz, K.L., Loh, E.K., Hamilton, C.M., Bakke, J.P. and Spalding, J.W. (1989). Measurement of unscheduled DNA synthesis and S-phase synthesis in rodent hepatocytes following in vivo treatment: testing of 24 compounds. *Environ. Mol. Mutagen.* 14, 155~164.
- 42) Morita, T. (1992). The 6th collaborative study by CSGMT: the MN assay for the top 100 IARC carcinogens: correlation between micronucleus induction and carcinogenesis. *Mammalian Mutagenicity Study Group Communications* 5, 19~119.
- 43) Nakamura, T., Tomita, Y. and Ichihara, A. (1983). Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochem.* 94, 1029~1035.
- 44) 中村敏一 (1987). 初代培養肝細胞実験法. 学会出版センター, 東京.
- 45) Newberne, P.M. and Clark, A.J. (1982). Promotion of liver tumors in B6C3F1 mice by partial hepatectomy or dietary choline deficiency. *Toxicologist* 2, 63~64.
- 46) Nesnow, S., Argus, M., Bergman, H., Chu, K., Frith, C., Helmes, T., McGaughy, R., Ray, V., Slaga, T.J., Tennant, R. and Weisburger, E. (1986). Chemical carcinogens: a review and analysis of the literature of selected

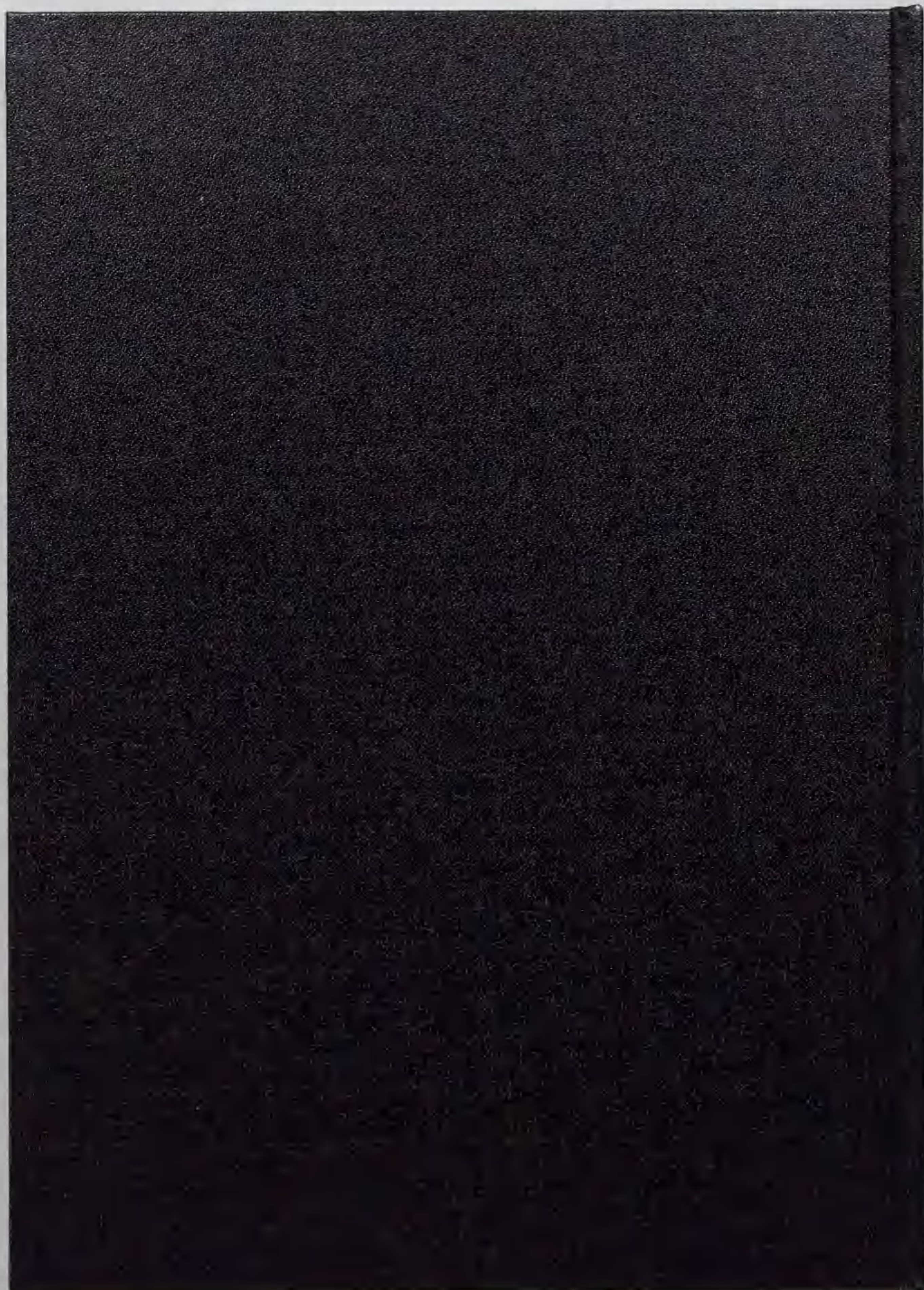
- chemicals and the establishment of the Gene-Tox Carcinogen Data Base: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res. 185, 1~195.
- 47) 大石道夫 (1984). プロモーターの細胞生物学. (林裕造, 黒木登志夫) 新しい発癌のメカニズムと評価 pp.124~134. サイエンスフォーラム, 東京.
- 48) Olsen, P., Meyer, O., Bille, N. and Wurtzen, G. (1986). Carcinogenicity study on butylated hydroxytoluene (BHT) in Wistar rats exposed *in utero*. Fd. Chem. Toxic. 24, 1~12.
- 49) Peraino, C., Fry, R.J.M., Staffeldt, E. and Christopher, J.P. (1977). Enhancing effects of phenobarbitone and butylated hydroxytoluene on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. Fd. Cosmet. Toxicol. 15, 93~96.
- 50) Ponomarev, V., Tomatis, L. and Turusov, V. (1976). The effect of long-term administration of phenobarbitone in CF-1 mice. Cancer Lett. 1, 165~172.
- 51) Rao, M.S., Subbarao, V., Yeldandi, A.V. and Reddy, J.K. (1992). Hepatocarcinogenicity of dehydroepiandrosterone in the rat. Cancer Res. 52, 2977~2979.
- 52) Rao, V.R., Woo, Y., Lai, D.Y. and Arcos, J.C. (1989). Database on promoters of chemical carcinogenesis. Envir. Carcino. Revs. 7, 145~386.
- 53) Reddy, J.K., Rao, M.S., Azarnoff, D.L. and Sell, S. (1979). Mitogenic and carcinogenic effects of a hypo-

- lipidemic peroxisome proliferator, [4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643), in rat and mouse liver. *Cancer Res.* 39, 152~161.
- 54) Reddy, B.S. and Watanabe K. (1979). Effect of cholesterol metabolites and promoting effect of lithocholic acid in colon carcinogenesis in germ-free and conventional F344 rats. *Cancer Res.* 39, 1521~1524.
- 55) Rossi, L., Ravera, M., Repetti, G. and Santi, L. (1977). Long-term administration of DDT or phenobarbital-Na in Wistar rats. *Int. J. Cancer* 19, 179~185.
- 56) Sawada, S., Furihata, C. and Matsushima, T. (1989). In vivo short-term assays of repair and replication of rat liver DNA. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 115, 345~350.
- 57) Schulte-Hermann, R. (1985). Tumor promotion in the liver. *Arch. Toxicol.* 57, 147~158.
- 58) Schulte-Hermann, R., Ohde, G., Schuppler, J. and Timmermann-Trosiener, I. (1981). Enhanced proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver following treatment with the tumor promoters phenobarbital, hexachlorocyclohexane, steroid compounds, and nafenopin. *Cancer Res.* 41, 2556~2562.
- 59) Seglen, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 13, 29~83.
- 60) Steinmetz, K.L., Tyson, C.K., Meierhenry, E.F., Spalding, J.W. and Mirsalis, J.C. (1988). Examination of genotoxicity, toxicity and morphologic alterations in hepatocytes follow-

ing in vivo or in vitro exposure to methapyrilene. Carcinogenesis 9, 959~963.

- 61) Svoboda, D.J. and Azarnoff, D.L. (1979). Tumors in male rats fed ethyl chlorophenoxyisobutyrate, a hypolipidemic drug. Cancer Res. 39, 3419~3428.
- 62) 宇野芳文, 岩瀬裕美子, 吉川邦衛 (1992). 変異原性試験実施の立場から —ラット肝複製DNA合成 (RDS) 試験の推奨—. 環境変異原研究 14, 75~83.
- 63) Uno, Y., Takasawa, H., Miyagawa, M., Inoue, Y., Murata, T., Ogawa, M. and Yoshikawa, K. (1992). In vivo-in vitro replicative DNA synthesis (RDS) test using perfused rat livers as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens (I): establishment of a standard protocol. Toxicol. Lett. 63, 191~199.
- 64) Uno, Y., Takasawa, H., Miyagawa, M., Inoue, Y., Murata, T., Ogawa, M. and Yoshikawa, K. (1992). In vivo-in vitro replicative DNA synthesis (RDS) test using perfused rat livers as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens (II): assessment of judgement criteria. Toxicol. Lett. 63, 201~209.
- 65) Uno, Y., Takasawa, H., Miyagawa, M., Inoue, Y., Murata, T., and Yoshikawa, K. (1994). In vivo-in vitro replicative DNA synthesis (RDS) test using rat hepatocytes as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: screening of 22 known positives and 25 noncarcinogens. Mutation Res. in press.

- 66) Weisburger, E.K. (1977). Carcinogenicity studies on halogenated hydrocarbons. *Environ. Health Perspect.* 21, 7~16.
- 67) Yoshikawa, K., Tanaka, A., Yamaha, T. and Kurata, H. (1983). Mutagenicity study of nine monoalkyl phthalates and a dialkyl phthalate using *S. typhimurium* and *Escherichia coli*. *Food Chem. Toxicol.* 21, 221~223.
- 68) Yusof, Y.A.M. and Edwards, A.M. (1990). Stimulation of DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures by liver tumor promoters: interactions with other growth factors. *Carcinogenesis* 11, 761~770.
- 69) Zeiger, E., Haseman, J.K., Shelby, M.D., Margolin, B.H. and Tennant, R.W. (1990). Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 16, 1~14.
- 70) Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992). Salmonella mutagenicity tests: V. results from the testing of 311 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 19, 2~141.
- 71) Zimmerman, H.J. [eds.] (1978) Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. Appleton-Century-Crofts, New York.



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

