

ラットの肝におけるジエチルニトロサミンと フェノバルビタールによる前癌病変の発生に 対する食餌性鉄欠乏の抑制効果

奈良県立医科大学附属がんセンター

腫瘍病理学教室

衣 笠 哲 雄

INHIBITORY EFFECT OF DIETARY IRON DEFICIENCY ON THE INDUCTION OF PUTATIVE PRENEOPLASTIC FOCI IN THE LIVER OF RATS TREATED WITH DIETHYLNITROSAMINE FOLLOWED BY PHENOBARBITAL

TETSUO KINUGASA

Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University

Received July 25, 1991

Summary: The effects of dietary iron deficiency on induction of γ -glutamyltransferase (GGT)-positive foci in the liver of rats treated with diethylnitrosamine (DEN) followed by phenobarbital (PB) were studied.

The following results were obtained.

- 1) Dietary iron deficiency for 4 weeks induced an iron deficient anemia and a hepatic iron deficiency in rats. Both the iron deficient anemia and the hepatic iron deficiency were reversed by a 2-week feeding of the basal diet.
- 2) Dietary iron deficiency for 4 weeks did not alter a hepatic content of cytochrome P450, that of GSH or a peroxidative state of hepatocellular membrane lipids in rats.
- 3) Induction of GGT-positive foci in the liver of rats initiated with DEN and promoted by PB was significantly inhibited by dietary iron deficiency from 4 weeks before DEN administration throughout the experimental period.

Index Terms

dietary iron deficiency, diethylnitrosamine, γ -glutamyltransferase, phenobarbital, rat

I. はじめに

鉄は、ヒトの生存に必須なミネラルのひとつであり、ヘモグロビンなどの含鉄蛋白の主要構成要素として、また、各種の生理的反応の触媒として、生体内で種々の重要な役割を果している。ヒトにおける鉄欠乏は鉄欠乏性

貧血を惹起し、その過剰は血色素症を惹起するが、中でも、先天性血色素症患者における高率な肝細胞癌の発生が報告され¹⁾、鉄の肝細胞癌発生に対するなんらかの役割が示唆されている。一方、実験的には、三価鉄の低分子キレート体である鉄-ニトリロ三酢酸の腎に対する毒性と発癌性が報告され²⁾⁻⁴⁾、癌の発生に対する鉄の関与が

見出されている。

近年、鉄が酸化性ストレス反応系における最も重要な触媒のひとつである⁹⁾ことから、鉄の発癌における役割は、酸化性ストレスとの関連で捕らえられんとしている。発癌過程は、質的に異なる多段階より成ることは明白で、鉄の関与する酸化性ストレスの発癌における関与は、発癌における段階的变化の各段階において捕らえなければならぬ。

本研究は、食餌性鉄欠乏のラット肝における前癌病変の発生に対する影響について、鉄欠乏の生体に惹起せしめる変化を明確にした条件下で、肝発癌におけるジェチルニトロサミン (DEN) によるイニシエーションとフェノバルビタール (PB) によるプロモーションのプロトコルを用いて検索した。

II. 材料と方法

1. 動物

動物は3週齢のフィッシャー344系雄ラット (日本 SLC 株式会社, 浜松) を用いた。ラットは、鉄を含まないプラスチック・ケージに収容し、空調下 25°C, 12 時間毎の明暗サイクルの条件下で飼育した。飲料水と食餌は、自由に摂取せしめた。実験は、ラットをオリエンタル MF (固形基礎食) (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) 投与にて1週間馴化した後、18時間絶食せしめ、実験飼料を投与した。

2. 化学物質と飼料

DEN は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入したものを 0.9% 塩化ナトリウム水溶液にて希釈し、100 mg/ml の濃度に調製した。鉄欠乏 (ID) 食と鉄添加 (IS) 食は、粉末食として、オリエンタル酵母に受注生産させた。ID および IS 食の組成を Table 1 に示す。IS 食の鉄含有量は、180 ppm で、基礎食と同じ組成とした。ID 食も同様であるが、鉄含有量のみを 5 ppm 以下とした。なお、ID および IS 食の熱量は、いずれも基礎食と同じであった。PB は、丸石製薬株式会社 (大阪) より購入したものを ID または IS 食に 0.05% の濃度で混入した PB 食を作製し、投与した。

3. 実験プロトコル

1) ラット肝における γ -glutamyltransferase (GGT) 陽性巢の発生に対する食餌性鉄欠乏の影響

第一から四群は、各群 9 匹のラットに ID 食を 12 週間投与した群とした。第一群は実験開始後 4 週に 200 mg/kg 体重の DEN を腹腔内へ投与し、6 週から 12 週までの期間に PB を投与した群、第二群は実験開始後 4 週に第一群と同量の DEN のみを投与した群、第三群は DEN

Table 1. Composition of the ID and IS diets

Ingredient(%)	ID=IS
Corn Starch	32
Casein	22
Cellulose	5
Sucrose	30
Vegetable Oil	5
AIN-76 Vitamin Mix	4
Modified AIN-76 Mineral Mix ^a	2

The IS diet contained 180 ppm of iron by ferric citrate supplementation whereas the ID diet had less than 5 ppm of iron. Both diets were designated to be practically identical regarding composition and calorific content to the basal diet.

^aIron was omitted.

の替わりにその溶媒である 0.9% 塩化ナトリウム水溶液を投与した後に PB を投与した群、第四群は第三群と同様に 0.9% 塩化ナトリウム水溶液のみを投与した群とした。第五から八群は、各群 8 匹のラットに IS 食を 12 週間投与した群とした。第五、六、七および八群におけるその他の処置は、それぞれ、第一、二、三および四群と同様とした。実験開始後 12 週に、エーテル麻酔下で全てのラットを開腹し、腹部大動脈より脱血して屠殺し、肝を摘出した。

摘出した肝の主要 3 葉より幅 5 mm の切片を切り出した。切片は、脱水エチルアルコールと濃酢酸の氷冷混合液 (19:1) 中に 3 時間固定後、99.5% エチルアルコール内に移し、4°C にて 24 時間放置した後、パラフィン包埋した。各標本より連続切片 2 枚を切り出し、その 1 枚は常法にしたがってヘマトキシリン・エオジン染色をおこない、これを病理組織学的検索に供した。残る一枚は、Rutenberg らの方法⁷⁾に基いて組織化学的に GGT 染色をおこない、電子計算機 (Desktop Computer System-45; Hewlett Packard Co., Fort Collins, Colorado, USA) 接続下において、イメージアナライザー (Model HTB-C995; 浜松フォトニクス株式会社, 浜松) を用いて、GGT 陽性巢の数と大きさについての定量的解析をおこなった。

2) ラットにおける血清鉄濃度、血清総鉄結合能 (TIBC)、血液中赤血球数・ヘモグロビン濃度・ヘマトクリット値、肝鉄・チトクローム P450・還元型グルタチオン (GSH) 含有量および肝脂質過酸化状態に対する食餌性鉄欠乏の影響

実験は、2 群を作製し、各群 35 匹のラットを使用した。第一群は ID 食を、第二群は IS 食を、それぞれ、4 週間投与した群とし、いずれの群にもさらに 2 週間基礎

食を投与した。実験開始時とその後1, 2, 4, 4³/₇, 5および6週に各群5匹ずつ無作為的に選び、エーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈分枝部から血液を採取した後、肝を摘出した。血液は、室温にて凝固せしめた後、3,000 x gにて20分間遠心して血清を分離した。なお、実験開始後4週に採取した血液においては、血清分離に先だつて一部を採取直後に抗凝固剤存在下に保存した。

血清鉄濃度・TIBCの測定：分離した血清を試料とし、Bondaの方法⁹⁾によって測定した。

血液中赤血球数・ヘモグロビン濃度・ヘマトクリット値の測定：抗凝固剤存在下に保存した血液を試料とし、臨床生化学的常法にしたがって測定した。

肝鉄含有量の測定：肝の約1.5gを100°Cにての24時間放置により灰化せしめ、これを濃硝酸に溶解し、その鉄含有量を、Atomic Absorption Spectrometer Z-9000（日立製作所、東京）を用いて原子吸光分光測光により解析した。

肝チトクロームP450含有量の測定：実験開始後4週に採取した肝よりCurtisら⁹⁾の方法に基いて小胞体分画を調製し、これを試料としてJohannesenとDePierreのアスコルビン酸塩・エト硫酸フェナジン法¹⁰⁾にて測定した。

肝GSH含有量の測定：実験開始後4週に採取した肝を試料とし、SedlakとLindsayの方法¹¹⁾にて測定した。

肝脂質過酸化状態の測定：実験開始後4週に採取した肝を試料とし、Yagiの方法¹²⁾にて、マロンジアルデヒド(MDA)を対照に用いて測定した。

4. 統計学的解析

定量値の各群間の統計学的有意差の有無は、Studentのpaired *t*-testによって検定した。

III. 結 果

1. ラット肝におけるGGT陽性巣の発生に対する食餌性鉄欠乏の抑制効果（実験1）

実験終了時における、ラットの体重、体重100g当りの相対肝重量およびGGT陽性巣の単位面積当りの個数と大きさ（平均面積）は、Table 2に示す。実験期間を通じて、各群間の平均食餌摂取量は差はなかった。実験終了時の体重は、第一群では第三群に比べ、第五群では第八群に比べ、それぞれ、減少していたが、その他の群では各群間の体重に増減はみられなかった。相対肝重量は、第一、二、三および四群では第五、六、七および八群に比べてそれぞれ減少し、第一、三、五および七群では第二、四、六および八群に比べてそれぞれ増加していた。

肝においては、GGT陽性の変異を示す肝細胞の小増殖巣の発生が、全ての実験群にみられた。これらの小増殖巣は、注意深く観察するとヘマトキシリン・エオジン染色にても組織学的に識別可能(Plate 1)であったが、組織化学的にGGT陽性巣として処理すると、より明確かつ正確な識別が可能(Plate 2)であった。その数は、DENを投与していない第三、四、七および八群においては、DENを投与した第一、二、五および六群に比べ、有意に少数であった。ID食の影響は、DEN投与後にPBを投与した第一群と第五群を比較すると、第一群では1

Table 2. Effective number, body and liver weights and the number and area of GGT-positive hepatocyte foci in the liver of rats fed the ID diet with or without DEN followed by PB

Group	Diet	DEN	PB	Effective Number of Rats	Final Body Weight (g)	Liver Weight (g/100g Body Weight)	GGT-Positive Hepatocyte Foci	
							Number/cm ²	Size (Mean Area; mm ² × 10 ²)
1	ID	+	+	9	272 ± 11 ^{a,b}	6.70 ± 0.37 ^{c,d}	6.3 ± 3.6 ^{b,c}	7.0 ± 0.9
2	ID	+	-	9	276 ± 10	5.77 ± 0.23 ^c	3.4 ± 2.2 ^b	7.4 ± 0.8
3	ID	-	+	9	294 ± 14	7.03 ± 0.33 ^{c,d}	0.7 ± 0.5	6.8 ± 3.3
4	ID	-	-	9	289 ± 29	6.02 ± 0.36 ^c	0.4 ± 0.2	6.8 ± 1.5
5	IS	+	+	8	269 ± 13 ^b	7.26 ± 0.36 ^d	14.2 ± 4.4 ^{b,d}	7.0 ± 1.1
6	IS	+	-	8	284 ± 14	6.55 ± 0.56	5.9 ± 2.6 ^b	7.4 ± 0.7
7	IS	-	+	8	299 ± 11	8.24 ± 0.67 ^d	0.5 ± 0.2	6.8 ± 0.8
8	IS	-	-	8	296 ± 15	6.99 ± 0.75	0.4 ± 0.3	6.7 ± 1.5

^a Results are means ± standard deviations.

^b Significantly different from the respective DEN-unadministered groups (Groups 3, 4, 7 and 8 for Groups 1, 2, 5 and 6, respectively) (p < 0.01).

^c Significantly different from the respective iron-supplemented groups (Groups 5, 6, 7 and 8 for Groups 1, 2, 3 and 4, respectively) (p < 0.01).

^d Significantly different from the respective PB-unadministered groups (Groups 2, 4, 6 and 8 for Groups 1, 3, 5 and 7, respectively) (p < 0.02 in Liver Weight and p < 0.001 in Number/cm²).

cm²あたり6.3個であったのに対し、第五群では、14.2個であった。DEN投与後にPBを投与しなかった第二群と第六群を比較すると、第二群では3.4個であったのに対し、第六群では5.9個であった。一方、GGT陽性巣の大きさは、各群間に差はみられなかった。

2. 食餌性鉄欠乏による可逆性の鉄欠乏性貧血および肝鉄欠乏の誘発(実験2)

実験期間を通じて、第一、二群間に平均摂食量、体重、肝重量の差はなかった。

第一群の血清鉄濃度は、ID食投与開始後2週以内に低下し、基礎食への移行後1週にいたるまで低値を維持し、

その後1週で対照値まで回復したのに対し、第二群の血清鉄濃度には、実験期間を通じて有意な変化を認めなかった(Fig. 1, 左)。血清TIBCの変化は血清鉄濃度の変化とは反対に、第一群ではID食投与開始後2週以内に増加し、基礎食への移行後1週にいたるまで高値を維持し、その後1週で対照値まで回復したのに対し、第二群では実験期間を通じて有意に変化しなかった(Fig. 1, 中)。実験開始後4週における第一群の血液中赤血球数・ヘモグロビン濃度・ヘマトクリット値は、いずれについても、第二群に比し、有意に低値を示した(Table 3)。第一群の肝鉄含有量は、ID食投与開始後1週より直線

Table 3. Number of red blood cells, hemoglobin concentration and hematocrit score in rats fed the ID or IS diet for 4 weeks

Group	Diet	Number of Red Blood Cells (10 ⁴ /μl)	Hemoglobin Concentration (mg/ml)	Hematocrit Score (%)
1	ID	731 ± 11 ^{a,b}	130 ± 10 ^b	34 ± 3 ^b
2	IS	855 ± 17	150 ± 0	44 ± 1

^a Results are means ± standard deviations of determinations for 5 individual rats.

^b Significantly lower than Group 2 value (p < 0.05).

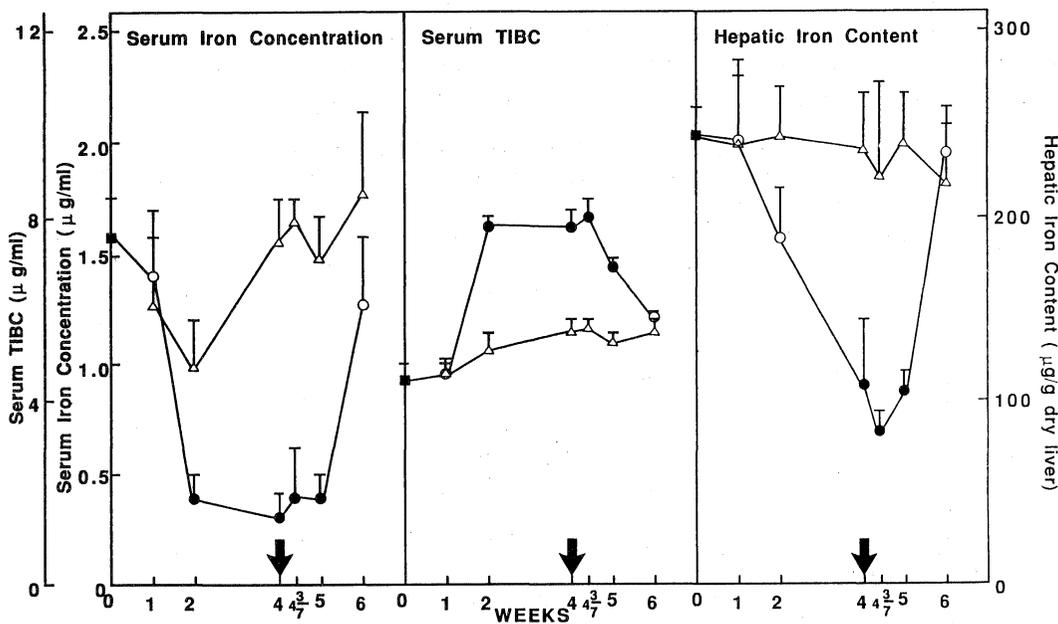


Fig. 1. Serum iron concentration, serum TIBC and hepatic iron content of rats fed the ID or IS diet as the function of time.

■, 0-time; ○, the ID diet; △, the IS diet; ●, the ID diet which was significantly different from the IS diet; ↓, time of the replacement of the diet from the ID or IS diet to the basal diet.

的に低下し、4週目には統計学的に有意差をもって低下した。基礎食への移行後1週までは低値を維持したが、その後1週で対照値まで回復した。第二群の肝鉄含有量には、実験期間を通じて有意な変化を認めなかった (Fig. 1, 右)。

3. 食餌性鉄欠乏の肝チトクローム P 450・GSH 含有量および肝脂質過酸化状態に対する影響 (実験 2)

肝チトクローム P 450 および GSH 含有量および肝脂質過酸化状態は、4週間の ID 食投与によっても影響を受けなかった (Table 4)。

IV. 考 察

上記の結果は、ラットに DEN を投与してイニシエーションをおこない、その後 PB を投与してプロモーションを施した時に、その肝に発生する前癌病変たる GGT 陽性巣の発生に対する食餌性鉄欠乏の抑制効果を明らかにした。

一般的に発癌修飾を論じる際、前癌病変である酵素変異肝細胞小増殖巣の発生個数の変動はイニシエーションの指標として、それらの大きさの変動はプロモーションの指標とされている¹³⁾。したがって、ID 食投与が、PB 処置の有無にかかわらず、肝における GGT 陽性巣の発生個数を低下せしめた一方、その大きさには影響を与えなかったことは、食餌性鉄欠乏がイニシエーション段階に対して抑制的に作用したことを示すものと考えられる。本実験において、イニシエーターである DEN は、ラットに ID 食を4週間投与した後に投与した。一方、ID 食の4週間投与は、ラットに可逆性の鉄欠乏性貧血および肝鉄欠乏を誘発したが、肝におけるチトクローム P 450 と GSH 含有量や脂質過酸化状態には影響しなかった。チトクローム P 450 は、種々の化学物質の代謝活性化に関係し、DEN の代謝活性化における関連も報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。GSH の量は、解毒能力の指標として広く用いられ、特に酸化性刺激に対する生体の防御能力を評価する上での指標として用いられることが多い。また、過酸化された膜脂質が、通常より酸化性刺激に対して感受性が高いこともよく知られている。したがって、4週間の食

餌性鉄欠乏は、ラット肝における DEN の代謝活性化能力や酸化性刺激に対する感受性に影響を与えなかったことが判明した。Bartsch ら¹⁶⁾は、ジメチルニトロサミンその他の数種のニトロサミンが、チトクローム P 450 依存性的または光化学的な α -ニトロサミノラジカルの形成を介して DNA 結合性代謝物に活性化される可能性を示し、ジアルキルニトロサミンによる発癌イニシエーション過程におけるフリーラジカル依存性 DNA 障害の関与を示唆した。この仮説の DEN の場合における妥当性については未だ証明されていないが、Sholtz ら¹⁷⁾によればラットにおいて DEN によるイニシエーション後に肝に発生する過形成性結節に局在する活性酸素の増量がみられたという。したがって、DEN の代謝活性化においてもフリーラジカルが介在し、DEN のイニシエーション機序に酸化性ストレスが関与する可能性が示唆されたものと考えられる。この観点から、本研究における食餌性鉄欠乏のイニシエーション段階に対する抑制効果は、酸化性ストレス反応系での活性酸素生成反応に触媒として必要とされる⁵⁾⁶⁾鉄の肝における欠乏に基く、DEN のフリーラジカルを介した代謝活性化の抑制に起因するものである可能性が示された。

PB のプロモーション活性の発現機序についての統一された見解は未だ見出されていない。しかし、著者ら¹⁸⁾はアラキドン酸カスケードの関与を示唆し、Sholtz ら¹⁷⁾はラットにおいて DEN によるイニシエーション後に発生する肝過形成性結節内の活性酸素生成が PB 処置により増強されることを示すなど、PB によるプロモーションに対する酸化性ストレスの関与を示唆する報告がなされている。一方、Hann らのグループは、数種の可移植性齧歯類腫瘍¹⁹⁾や乳腺腫瘍ウイルス先天感染マウスにおける自然発生乳腺腫瘍²⁰⁾が食餌性鉄過剰マウスにおいて食餌性鉄欠乏マウスより速やかにかつ大きく成長することを見出し、さらに *in vitro* で数種のヒト肝癌細胞株の成長が鉄添加によって促進されることを報告した²¹⁾。また、食餌性鉄過剰は、ジメチルヒドロラジンによるマウスの大腸発癌²²⁾や1-メチル-1-ニトロソウレアによるラットの乳腺発癌²³⁾に対して促進効果を発揮すると報告されている。

Table 4. Cytochrome P450 content, GSH level and peroxidative state of hepatocellular lipids in the liver of rats on the ID diet for 4 weeks

Group	Diet	Cytochrome P450 Content (pmol/mg protein)	GSH level (μ g/mg protein)	Peroxidative State of Hepatocellular Lipids (nmol MDA equivalent/g wet liver)
1	ID	366 \pm 69 ^a	9.5 \pm 0.8	1.2 \pm 0.1
2	IS	323 \pm 39	9.4 \pm 0.8	1.0 \pm 0.3

^a Results are means \pm standard deviations of determinations for 5 individual rats.

さらに, *in vitro* で鉄をキレート除去することによりヒトの神経芽細胞腫⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾および肝癌⁽²¹⁾の細胞の成長が抑制されることも指摘された。これらの報告は、腫瘍細胞の成長に鉄がなんらかの役割を果すことを示すものと考えられる。鉄のこの役割が、鉄そのものの作用か、あるいは鉄触媒下の酸化性ストレス反応系を介したものであるのかについては不明である。しかし、Slaga のグループによるマウスの皮膚発癌モデルを用いた過酸化物のプロモーション及びプログレッション活性についての報告⁽²⁶⁻²⁸⁾を敷衍すれば後者である可能性が高い。これらを総合すると、本研究における食餌性鉄欠乏の GGT 陽性巣発生に対する抑制効果は、部分的には、酸化性ストレス反応系における触媒鉄の欠乏が PB によるプロモーション過程に影響したものを捕らえているのかもしれない。

V. 結 語

フィッシャー 344 系雄ラットを用い、DEN によるイニシエーションと PB によるプロモーションの後、肝前癌病変である GGT 陽性巣の発生に対する食餌性鉄欠乏の効果を検索し、以下の結果を得た。

1. ID 食の 4 週間投与による食餌性鉄欠乏は、ラットに鉄欠乏性貧血および肝鉄欠乏を誘発したが、これらは、2 週間の基礎食投与により回復し得る可逆性の現象であった。

2. 上記 1. の如き食餌性鉄欠乏によっても、ラット肝のチトクローム P 450 と GSH の含有量および肝脂質の過酸化状態には影響しなかった。

3. DEN によるイニシエーションと PB によるプロモーションに基く、ラット肝における前癌病変たる GGT 陽性巣の発生は、上記 1. 2. の如き生体条件下に DEN を投与して、さらに引続きラットを食餌性鉄欠乏条件下におくことにより、有意に抑制された。

以上より、ラット肝化学発癌過程において鉄が重要な役割を果していることが判明した。さらに、食餌性鉄欠乏の前癌病変発生に対する抑制効果は、主として DEN によるイニシエーションの抑制に起因するものと考えられたが、PB によるプロモーション過程に対するなんらかの影響も考えられた。また、この食餌性鉄欠乏の抑制効果は、鉄欠乏そのものというよりも、触媒鉄の欠乏に基く酸化性ストレス反応系の阻害に起因すると考察され、ラット肝化学発癌過程における活性酸素の関与を示す新たな証拠を得たものとする。

本研究の要旨は、第 79 回日本病理学会総会(平成 2 年 3 月, 福岡), 第 81 回アメリカ癌学会年次総会(平成 2

年 5 月, Washington, D. C., USA), 第 49 回日本癌学会総会(平成 2 年 7 月, 札幌)および第 7 回日本毒性病理学会(平成 3 年 1 月, 東京)にて発表した。なお、本研究は、文部省がん特別研究 I, 厚生省対がん 10 ヶ年総合戦略プロジェクトおよび厚生省がん研究助成金による補助を受けたものであることを付記する。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室小西陽一教授に、心より厚く御礼申し上げます。また御校閲を賜った、同大学第 3 内科学教室辻井 正教授ならびに同大学第 2 病理学教室日浅義雄教授に、深い感謝の意を捧げます。さらに、終始御指導、御後援いただいた、中江大助手をはじめとする同大学附属がんセンター腫瘍病理学教室の諸兄姉に、最大限の感謝の意を表します。

文 献

- 1) Bacon, B. R. and Britton, R. S.: Chem. -Biol. Interact. 70 : 183-226, 1989.
- 2) Li, J. -L., Okada, S., Hamazaki, S., Ebina, Y. and Midorikawa, O.: Cancer Res. 47 : 1867-1869, 1987.
- 3) Hamazaki, S., Okada, S., Li, J. -L., Toyokuni, S. and Midorikawa, O.: Arch. Biochem. Biophys. 272 : 10-17, 1989.
- 4) Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y.: Carcinogenesis 11 : 345-347, 1990.
- 5) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C.: Biochem. J. 219 : 1-14, 1984.
- 6) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C.: *in* Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals (Hayaishi, O., Niki, E., Kondo, M. and Yoshikawa, T., eds.). Vol. 1, Elsevier Science Publishers, New York, p21-32, 1989.
- 7) Rutenberg, A. M., Kim, H., Fischbein, J., Hauker, J. S., Wasserkrug, H. C. and Seligman, R.: J. Histochem. Cytochem. 17 : 517-526, 1968.
- 8) Bonda, J.: Clin. Chem. Acta 21 : 159-160, 1968.
- 9) Curtis, M. T., Gilfor, D. and Farber, J. L.: Arch. Biochem. Biophys. 235 : 644-649, 1984.
- 10) Johannesen, K. A. M. and DePierre, J. W.: Anal. Biochem. 86 : 725-732, 1978.
- 11) Sedlak, J. and Lindsay, R. H.: Anal. Biochem. 25 : 192-205, 1968.
- 12) Yagi, K.: Biochem. Med. 15 : 212-216, 1976.

- 13) Pitot, H. C., Campbell, H. A., Maronpot, R., Bawa, N., Rizvi, T. A., Xu, Y. -H., Sargent, L., Dragan, Y. and Pyron, M. : *Toxicol. Pathol.* 17 : 594-612, 1989.
- 14) Ton, C. C. T. and Fong, L. Y. Y. : *Carcinogenesis* 5 : 533-536, 1984.
- 15) Ioannides, C. and Parke, D. V. : *Biochem. Pharmacol.* 36 : 4197-4207, 1987.
- 16) Bartsch, H., Hietanen, E. and Malaveille, C. : *Free Radical Biol. Med.* 7 : 687-644, 1989.
- 17) Sholtz, W., Schutze, K., Kunz, W. and Schwarz, M. : *Cancer Res.* 50 : 7015-7022, 1990.
- 18) Denda, A., Ura, H., Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., Eimoto, H., Takashima, Y., Kitazawa, S., Kinugasa, T. and Konishi, Y. : *Carcinogenesis* 10 : 1929-1935, 1989.
- 19) Hann, H. L., Stahlhut, M. W. and Blumberg, B. S. : *Cancer Res.* 48 : 4168-4170, 1988.
- 20) Hann, H. L., Stahlhut, M. W., Menduke, H., London, W. T. and Blumberg, B. S. : *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 8 : 59, 1989.
- 21) Hann, H. L., Stahlhut, M. W. and Hann, C. L. : *Hepatology* 11 : 566-569, 1990.
- 22) Siegers, C. P., Bumann, D., Baretton, G. and Younes, M. : *Cancer Lett.* 41 : 251-256, 1988.
- 23) Thompson, H. J., Kennedy, K., Witt, M. and Juzefyk, J. : *Carcinogenesis* 12 : 111-114, 1991.
- 24) Blatt, J. and Stitely, S. : *Cancer Res.* 47 : 1749-1750, 1987.
- 25) Becton, D. L. and Bryles, P. : *Cancer Res.* 48 : 7189-7192, 1988.
- 26) Slaga, T. J., Klein-Szanto, A. J. P., Triplett, L. L., Yotti, L. P. and Trosko, J. E. : *Science* 213 : 1023-1025, 1981.
- 27) Klein-Szanto, A. J. P. and Slaga, T. J. : *J. Invest. Dermatol.* 79 : 30-34, 1982.
- 28) O'Connell, J. F., Klein - Szanto, A. J. P., Digiovanni, D. M., Fries, J. W. and Slaga, T. J. : *Cancer Res.* 46 : 2863-2865, 1986.

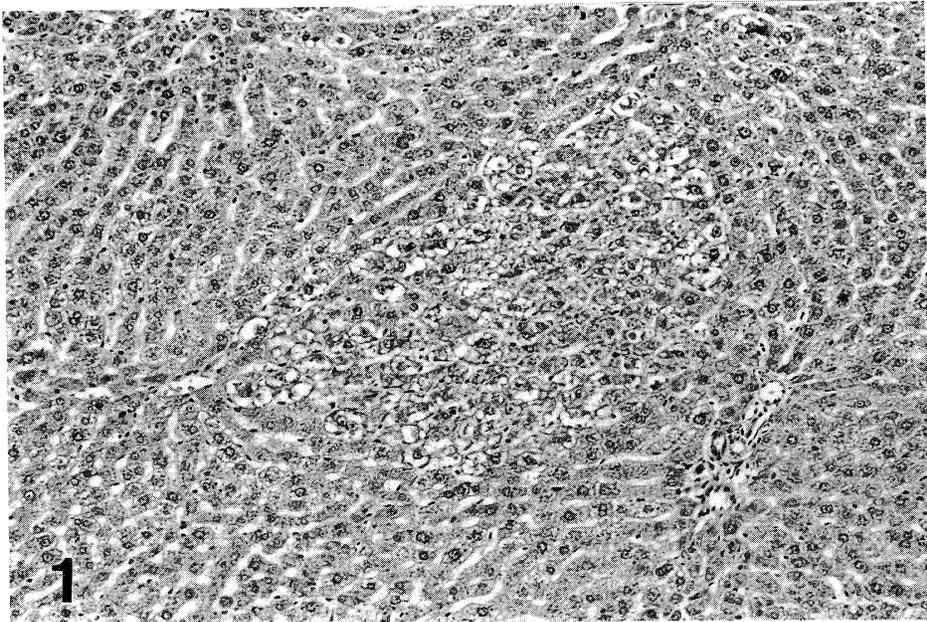


Plate 1. Histology of the liver of a rat from Group 5 of Experiment 1 showing an altered focus of hepatocytes. Hematoxylin and eosin staining ; $\times 100$

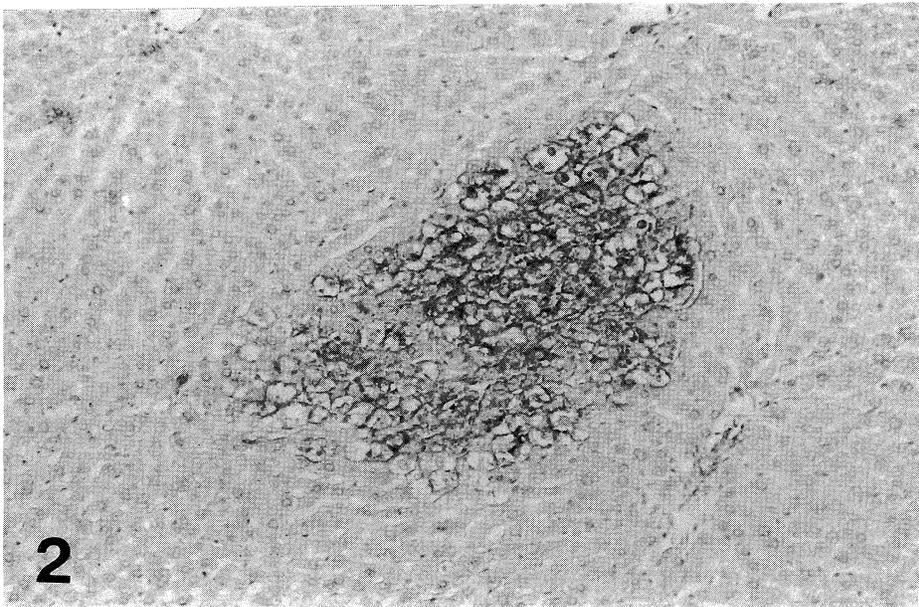


Plate 2. Histochemical demonstration of a phenotypically enzyme altered focus of hepatocytes in the serially made section from the specimen of Plate 1. GGT staining ; $\times 100$