

ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション

所属 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

研究者 本間 正充

研究要旨

人に対する化学物質の遺伝毒性を正しく評価することを目的とし、ヒト培養細胞株 (TK6、WTK-1) を基礎とした、新しい *in vitro* 遺伝毒性試験系を確立した。本試験系はコメット試験 (COM)、小核試験 (MN)、チミジンキナーゼ遺伝子をターゲットとした遺伝子突然変異試験 (TK) の3つのエンドポイントから成り、同一試験条件下でのこれら遺伝毒性試験の結果を比較することが可能である。それぞれの最適試験プロトコールを検討し、バックグラウンドデータを評価した。その後、試験系の検出能力をバリデーションするため14の染色体異常誘発物質について試験し、その結果を既存の遺伝毒性データと比較した。14化合物には4種類の典型的遺伝毒性物質と、10種類のエームス試験陰性の染色体異常誘発物質が含まれる。4つの遺伝毒性物質は、両細胞の3つのエンドポイントで明らかな陽性を示したが、10の染色体異常誘発物質の遺伝毒性は、細胞、および試験系によって異なる反応性を示した。全体的には、MNが最も感度の高いエンドポイントであり、また、WTK-1はTK6より陽性と判定しやすい傾向にあった。TK6とWTK-1の違いは、p53の状態の違いを反映しているものと予想される。また、ヒト型試験系ではヒト代謝系の導入が重要であるが、これに関しては、ヒト肝S9の遺伝毒性試験における特徴を検討した。本試験系は、ヒト型遺伝毒性試験系として医薬品開発に利用できるだけでなく、染色体異常や、突然変異のメカニズムの解明にも有用と考えられる。

分担研究者

(1) 八戸工業高等専門学校物質工学科

佐々木有

(2) エーザイ株式会社研究開発本部

築館一男

(3) 大鵬薬品工業安全性研究所

大内田昭信

(4) 三共株式会社安全性研究所

高崎 渉

A. 研究目的

これまで、様々な生物系 (原核生物、真核生物、*in vitro*、*in vivo*等) を利用し、様々なエンドポイント (遺伝子突然変異、染色体異常、DNA 損傷等) からなる遺伝毒性試験が開発され、利用されてきた。これら遺伝毒性試験の目的の一つとして、発がん性物質を広くスクリーニングし、発がん性潜在物質を同定することがある。

この目的のためには、発がん性物質に対して予言性の高い試験、およびそれら試験を組み合わせたバッテリー試験が重要である。発がん性物質のスクリーニングのための代表的な *in vitro* の試験法としては、エームス試験、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験 (CA)、マウスリンフォーマ TK 試験 (MLA) などがある。Zeiger らは、NCI/NTP データベースにある齧歯類発がん性物質の 54% をエームス試験で陽性と判定でき、一方、CA、MLA ではそれぞれ、52%、74% の検出力をもつと報告している。MLA の高い発がん物質検出能力は Mitchell らによっても報告されている。彼女らの用いた NTP/Gene-TOX のデータベースからの解析では、MLA は、ほぼ 100% の検出力で齧歯類発がん性物質を陽性と判定できる。しかしながら、MLA は発がん性物質に対して高い感受性を持つ一方、非発がん物質をも陽性と判定してしまう可能性が高い。齧歯類発がん性物質、非発がん性物質の両者を考慮した予言率は、エームス試験が 65%、CA、MLA がそれぞれ 58%、57% である。これらの結果から現在、エームス試験が最も齧歯類発がん性試験の結果と相関性の高い遺伝毒性試験であるとされている。エームス試験を Golden standard とし、CA、MLA を組み合わせることにより多くの発がん物質のスクリーニングが可能である。この考えは我が国、および欧米において、基本的なコンセンサスであり、医薬品、一般化学物質、農薬、食品添加物等の遺伝毒性試験のガイドラインに反映されている。

しかしながら、本来スクリーニングを目的とした遺伝毒性試験は、発がん性を有する可能性のある物質の同定であるにもかかわらず、エームス試験で陽性となった医薬品候補化合物のほとんどは発がん性が疑われ、その後の詳細な試験がされることもなく候補化合物からはずされることが多い。安全性サイドからすれば、妥当なやり方ではあるが、その遺伝毒性メカニ

ズムや、人に対する安全性を評価しないまま、候補化合物を葬る盲目的なやり方は、非科学的であるばかりではなく、その候補化合物のもつ薬効の潜在性を考えると、人間の健康の向上に大きな損失をもたらすことにもなりうる。

遺伝毒性試験のもう一つの目的は、試験結果から被験物質の特徴を明らかにすることである。このためには遺伝毒性の発現メカニズムを考慮した試験と、それら試験の組み合わせが重要と考えられる。特に近年、エームス試験が陰性にもかかわらず、齧歯類動物で発がん性を示す化合物が多く報告されている。これら化合物は、非 DNA 損傷性、もしくはバクテリアにはない生体反応等により遺伝毒性を発現するものと予想される。ほ乳類細胞を用いた DNA 損傷性や、染色体異常、突然変異誘発性が、これら化合物の発がん性を説明できる可能性がある。また、場合によっては染色体異常や (構造異常、数的異常等)、突然変異 (点突然変異、欠失、組換え等) のタイプを解析することが、遺伝毒性の発現メカニズム、最終的には発がんメカニズムの解明に役立つものと考えられる。

メカニズムに基づき被験物質のもつ遺伝毒性の特徴を明らかにすることは、その物質の遺伝毒性のリスク評価に利用できる可能性がある。これまでの遺伝毒性試験は、先に述べたようにスクリーニングによって発がん性潜在物質を同定することが主な目的であった。医薬品の開発において、遺伝毒性試験は、あくまでも発がん性試験の予備試験であり、候補化合物を絞り込むことにより発がん性試験にかかるコストと時間を削減することを目的としている。一般化学物質においては発がん性試験、遺伝毒性試験の両者のデータが存在し、両者に矛盾が生じた場合には、発がん性試験の結果が優先される。Zeiger によれば NTP データベースには、齧歯類発がん性試験において非発がん性物質とされた化合物が 172 あるが、そのうち 38 がエームス試験陽性であり、12 化合物について

はエームス試験だけでなく、CA、MLA においても強い陽性反応を示すことが報告されており、そのいくつかは一般化学物質として利用されている。このことは遺伝毒性試験の結果から、化学物質の危険性が示唆されても、発がん性試験が陰性である限り、リスク評価には全く反映されないことを示している。遺伝毒性の発現メカニズムが明らかになれば、たとえ齧歯類動物での発がん性試験が陰性であっても、そのリスクを科学的に評価することが可能であると考えられる。同様に、齧歯類動物での発がん性試験の結果が、人に対する発がん性のリスクを完全に反映している科学的根拠はない。メカニズムに基づき、遺伝毒性試験の結果と発がん性試験のデータを正当に評価することが重要であり、このような手法が最終的に人に対する安全性の担保になるものと考えられる。

人に対するリスク評価のためには、メカニズムと同様に、試験系の生物学的妥当性も重要である。先に挙げた *in vitro* の試験は、細菌や齧歯類動物由来の細胞による試験であるが、これら試験は、元来、化学物質等の DNA、もしくは染色体への影響の有無を、簡便に、迅速に、そして再現性がよく、かつ信頼できる方法として開発、確立された方法である。これら試験法の多くが、1970 年以降の細胞遺伝学の進歩と共に開発され、当時の生物学的ツールとして、バクテリアや、齧歯類不死化細胞が利用しやすかったことが、試験法の開発に繋がったことは想像に難しくない。また、代謝活性化により遺伝毒性を発現する化学物質の試験に関しては、細胞をマウス腹腔内に投与宿主経由法や、ラット肝臓由来 S9 と同時に処理する方法が考案されたが、これも実験動物としてマウスやラットが利用し易かったからに他ならない。しかしながら、これら試験法が、人に対する化学物質の影響を正当に評価し得るのかどうかは疑問であり、これは動物実験を用いた全ての安全性試験の共通した問題である。齧歯類動物を用いた

発がん性試験はラットと、マウスで行われているが、両者の試験結果の一致率は 70%程度であり、また、齧歯類動物に発がん性を示す化学物質の大部分は、サルを用いた発がん性試験で陰性を示すことが報告されている。ラットーマウス間、齧歯類ーサル間での発がん性に対するこのような大きな感受性の違いは、ヒトーバクテリア、ヒトー齧歯類細胞の違いは、おそらくそれ以上に大きいことを想像させるものであり、これまでの遺伝毒性試験系を用いて、人に対する影響の評価する生物学的正当性をほとんど無にするものである。

人に対する影響は、人を用いて評価するのが最も妥当な考えであるが、有害影響を人で評価することは許されないことは当然である。しかしながら、*in vitro* の試験として、ヒト由来細胞、ヒト由来組織を用いることは可能である。近年の医学、生物学の進歩により様々なヒト組織から生物学的実験に利用可能なヒト細胞株が樹立されている。世界最大の細胞バンクである American Type Culture Collection (ATCC) に寄託されているヒト細胞株は 2000 種類を超え、世界中の研究者がこれら細胞を医学研究に利用している。また、ヒト臓器、組織に関しては National Disease Research Interchange (NDRI) を通じて、廃棄処分される手術組織の残余部分や、医学的理由で移植に不適合と判定された臓器などが研究者に供給されている。このようなヒト細胞、ヒト組織を用いた研究により、生体機能や、疾病メカニズムが解明された例は枚挙に遑無く、また、新たな医薬品等の開発に利用された例も少なくない。これら研究資源は、人類が健康に、永続的に繁栄するための貴重な財産である。一方、これらヒト細胞、ヒト組織を用いて化学物質の安全性を評価する系を開発する試みは多くない。その理由として、先に述べたように、遺伝毒性試験を含む安全性試験はあくまでもハザードの同定であり、それには簡便で迅速に結果がでる方法が好まれるから

である。医薬品の開発においては、新たな薬理作用などの発見は医薬品の付加価値を生み、そのための研究開発には様々な努力が払われるが、毒性などの有害影響は出ること自体が恐れられている。有害影響の研究のために新たな試験系を開発することは、あまり魅力的な仕事ではない。

安全性を保証する立場から言えば、感度の高い試験法を採用し、生物学的妥当性はなくとも、人に対する危険性を過度に評価し、安全性を保証する手段が有効であるのかもしれない。しかし、先にも述べたが生物学的妥当性や、科学的根拠が曖昧なまま、人に対する危険性を過度に評価することは、非科学的であるだけでなく、逆に、人の健康や福祉に対して不利益をもたらす可能性がある。また、盲目的に既存の試験系に頼ることは、新たな危険要因が発生しても、それに対応できず、危険な状態にさらされてしまうこともあり得る。

妥当な選択としては、現在の科学的知見、および入手可能で最も有用性の高い生物学的材料を基にして、人に対する遺伝毒性を、科学的メカニズムから評価するための試験を行い、そこで得られた結果から、人に対して安全性を保証するシステムを構築することである。本研究では、ヒト培養細胞、ヒト代謝系を基礎とし、遺伝毒性の発現メカニズムを考慮した最適なエンドポイント（コメット試験(COM)、小核試験(MN)、チミジンキナーゼ遺伝子をターゲットとした遺伝子突然変異試験(TK)）の組み合わせからなるヒト型 *in vitro* 遺伝毒性試験法を構築し、そのバリデーションを行うことを目的とする。最終的には、あらたな試験法として国際的に認知させ、医薬品や、化学物質の安全性確保のための行政活動に反映させることを目指す。

B. 研究方法

研究目的を達成するための分担研究者は以

下の研究について分担し、研究を行い。主任研究者がとりまとめた。

1. ヒト型遺伝毒性試験系における遺伝子突然変異試験の評価（本間正充）

ヒト培養細胞 TK6、WTK-1 を用いた TK 遺伝子突然変異検出系を確立する。14 のモデル化合物に対して TK 試験の実施し、その評価を行う。

2. ヒト型遺伝毒性試験系における DNA 損傷試験の評価（佐々木有）

ヒト培養細胞 TK6、WTK-1 を用いたコメット試験を確立する。14 のモデル化合物に対してコメット試験の実施し、その評価を行う。

3. ヒト型遺伝毒性試験におけるヒト代謝系の評価（築館一男）

ヒト代謝系の導入のため、ヒト S9 を用いて、モデル化合物について、エームス試験、マウスリンフォーマ試験を実施し、その評価を行う。

4. ヒト型遺伝毒性試験における小核試験の評価（大内田昭信）

ヒト培養細胞 TK6、WTK-1 を用いた小核試験を確立する。14 のモデル化合物に対する小核試験の実施し、その評価を行う。

5. ヒト型遺伝毒性試験におけるヒト細胞系の評価（高崎渉）

ヒト型 *in vitro* 遺伝毒性試験系に最適な細胞を選択し、その性質を解析し、遺伝毒性試験を行うに必要な試験条件、バックグラウンドデータ等の評価を行う。

6. MMS 共同研究による試験の実施

14 の試験化合物の MN、TK 試験（一部 COM 試験）については、日本環境変異原学会・ほ乳類変異原性試験研究会（MMS）の協力により 25 の研究機関で分担して行った。共同研究参加機関、参加者を表 1 に示す。

7. 試験検体

試験を行った 14 化合物を表 2 に示す。染色体異常誘発物質で、エームス試験陽性を示す、典型的な遺伝毒性物質 4 種類を含む。

8. 倫理面への配慮

本研究は既に樹立されている培養細胞、および HAB より分与されたヒト S9 を用いたものである。そのため、倫理面への問題はないものと判断される。

C. 結果

1. ヒト細胞の選択 (高崎)

細胞の扱いやすさ、普及性、遺伝毒性試験に対する適用性、メカニズム解析のための遺伝学的特徴から、ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 と、WTK-1 を試験用細胞として選択した。

2. 試験プロトコルの確立 (高崎、本間、佐々木、大内田)

試験検体処理 4 時間、処理後 0 時間に COM、48 時間に MN、72 時間に TK を行うことが最適プロトコルであった。

3. バックグラウンドデータの評価 (高崎)

陰性対照 (生理食塩水)、陽性対照 (MMS) について、25 機関で MN、TK 試験を行い、その結果を比較した。ほぼ、一定したデータが得られ、試験の成立が確認された。

4. 14 化合物の試験結果 (本間、佐々木、大内田)

染色体異常誘発物質 14 化合物に対し、ヒト型試験系で COM、MN、TK を実施した。その結果を表 3 に示す。

5. ヒト肝 S9 の遺伝毒性試験への適用 (築館)

プールしたヒト肝由来 S9、および高い薬物

代謝活性をもつヒト肝由来 S9 を用いて、エームス試験、マウスリンフォーマ試験を実施したところ、ラット S9 と比較し、量的、質的に反応性に違いが認められた。

D. 考察

人に対する化学物質の遺伝毒性を正しく評価することを目的とし、ヒト培養細胞株 (TK6、WTK-1) を基礎とした、新しい *in vitro* 遺伝毒性試験系を確立した。本試験系はコメット試験 (COM)、小核試験 (MN)、チミジンキナーゼ遺伝子をターゲットとした遺伝子突然変異試験 (TK) の 3 つのエンドポイントから成り、同一試験条件下でのこれら遺伝毒性試験の結果を比較することが可能である。それぞれの最適試験プロトコルを検討し、バックグラウンドデータを評価した。25 機関で安定したデータが得られたことから、遺伝毒性試験系として普及できうるものと判断される。

試験系の検出能力をバリデーションするため 14 の染色体異常誘発物質について試験し、その結果を既存の遺伝毒性データと比較した。14 化合物には 4 種類の典型的遺伝毒性物質と、10 種類のエームス試験陰性の染色体異常誘発物質が含まれる。4 つの遺伝毒性物質は、両細胞の 3 つのエンドポイントで明らかな陽性を示したが、10 の染色体異常誘発物質の遺伝毒性は、細胞、および試験系によって異なる反応性を示した。全体的には、MN が最も感度の高いエンドポイントであり、また、WTK-1 は TK6 より陽性と判定しやすい傾向にあった。TK6 と WTK-1 の違いは、p53 の状態の違いを反映しているものと予想される。

ヒト型試験系ではヒト代謝系の導入が重要であるが、これに関しては、ヒト肝 S9 の遺伝毒性試験における特徴を検討した。今後、今回確立したヒト型細胞系と、ヒト型代謝系を組み合わせ、完全なヒト型 *in vitro* 遺伝毒性試験系の確立を目指したい。

E. 結論

本共同研究で確立したヒト型遺伝毒性試験系は、簡便で、再現性があり、これまでの遺伝毒性試験結果と一致した。本試験系は、ヒト型遺伝毒性試験系として、人に対する安全性を担保しうる試験系であり、今後医薬品開発に利用できる。今後、国際的に認知させ、医薬品や、化学物質の安全性確保のための行政活動に反映させることを目指したい。また、試験法としてだけでなく、DNA損傷、染色体異常、突然変異等のメカニズムの解明にも有用と考えられ、研究ツールとしての利用価値も高い。

F. 研究発表

論文発表

1. 論文発表

Honma, M., Izumi, M., Sakuraba, M., Tadokoro, S., Sakamoto, H., Wang, W., Yatagai, F., and Hayashi, M. Deletion, rearrangement, and gene conversion; the genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 42, 288-298 (2003)

Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D., Zhang, L., Suzuki, T., Hayashi, M. and Honma, M. Genotoxicity of microcystine-LR in human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res.*, 557, 1-6 (2004)

Wang, W., Seki, M., Otsuki, M., Tada, S., Takao, N., Yamamoto, K., Hayashi, M., Honma, M. and Enomoto, T. The absence of a functional relationship between ATM and BLM, the components of BASC, in DT40 cells. *Biochem. Biophys. Acta* 168, 137-144 (2004)

Yatagai F, Morimoto S, Kato T, Honma M. Further characterization of loss of heterozygosity enhanced by p53 abrogation in human lymphoblastoid TK6 cells: disappearance of endpoint hotspots. *Mutat.*

Res., 560, 133-145 (2004)

2. 学会発表

鈴木孝昌、パラニサミー・ラジャグル、小原有弘、本間正充、林 真、高木篤也、菅野純、山口照英 GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か 第 63 回日本癌学会総会 (2004.9)

小山直己、坂本浩子、桜庭真弓、小泉朋子、桜庭真弓、高島良生、林真、松藤寛、山形一雄、本間正充 ヒトリンパ球芽細胞株 TK6 を用いたアクリルアミドの *in vitro* 遺伝毒性誘発機構の解析 日本環境変異原学会第 33 回大会 (2004.11)

欒 洋、パラニサミー・ラジャグル、本間正充、林 真、鈴木孝昌 ヒト細胞における遺伝毒性物質による遺伝子発現変化の解析 日本環境変異原学会第 33 回大会 (2004.11)

本間正充、桜庭真弓、小泉朋子、高島良生、坂本浩子、林 真 ヒトゲノム中に生じた DNA2 本鎖切断の運命 第 47 回日本放射線影響学会 (2004.11)

高島良生、桜庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、林真、本間正充 ヒト細胞における DNA2 本鎖切断修復の細胞周期依存性 第 47 回日本放射線影響学会 (2004.11)

桜庭真弓、本間正充、小泉朋子、高島良生、坂本浩子、林 真 ヒトゲノム中に生じた DNA2 本鎖切断の運命 第 27 回日本分子生物学会 (2004.12)

Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., and Hayashi, M. The fate of chromosomal double

strand break in human cells. Environmental Mutagen Society 35th Annual Meeting (2004.10)

Honma, M., Hakura, A., Oka, A., Takasaki, W., Sasaki, YF., Suzuki, S., and Sato, T. Establishment of humanized in vitro genotoxicity system. Society

of Toxicology 44th Annual Meeting (2005.3)

G. 知的所有権の取得状況

なし

表 1

Table I. Participants in the collaborative study

No.	Laboratory	Investigators
1	An-Pyo Center	K. Masumori, M. Kikuchi
2	Bozo Research Center INC	M. Ozaki
3	Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd	S. Nakayama
4	Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd	C. Hirogaki, H. Ohishi
5	Eisai Co. Ltd.	A. Hakura
6	Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute	S. Wakuri, N. Tanaka
7	GlaxoSmithKline K.K.	T. Morita
8	Hachinohe National College of Technolog	Y.F. Sasaki
9	Japan Bioassay Research Center	M. Asakura
10	Japan Food Research Laboratories	Y. Cho, H. Sato
11	Japan Oilstuff Inspectors' Corporation	Y. Nakamura
12	Japan Tobacco Inc.	S. Sato
13	Kissei Pharmaceutical Co. Ltd	K. Kobayashi
14	Lion Corporation	Y. Yamamoto
15	Meiji Seika Kaisha Ltd	M. Nagasawa, H. Hayashi
16	Menicon Co. Ltd.	H. Sugiki
17	Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd	Y. Nakagawa
18	National Institute of Health Sciences	H. Sakamoto, T. Ohmori, M. Honma
19	Nippon Shinyaku Co. Ltd	Y. Yamashita
20	Olympus Optical Co. Ltd	T. Ohtsuka, K. Miura, T. Sofuni
21	Shin Nippon Biomedical Laboratories Ltd	K. Saigo
22	Taiho Pharmaceutical Co. Ltd	H. Oka, A. Ohuchida
23	Takeda Chemical Industry Ltd	T. Hashizume
24	Tanabe Seiyaku Co. Ltd	M. Aoki, N. Miyata
25	Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd	A. Wakata

表 2

Table II. Testing chemicals and previously published in vitro genotoxicity data without S9

No.	Chemical Name	CAS No.	BRM	Reference	CA Reference (Str./Pol.)	MLA Reference
1	N-Aminoethyl ethanolamine (AEEA)	111-41-1	-	Leung (1994)	-/+L Unpublished paper	+ Honma et al. (1999a)
2	Bleomycin sulfate (BLM)	9041-93-4	+	Nakamura et al. (1987)	+/- Au et al. (1980)	+ Doerr et al. (1989)
3	Camptothecin (CMP)	7689-03-4	+	Storer et al. (1996)	+/- Mosesso et al (2000)	+ Backer et al. (1990)
4	Colchicine (COL)	64-86-8	-	Mortelmans et al. (1998)	+/+ Galloway et al. (1987)	+L Honma et al. (1999b)
5	Cytocine arabinoside (Ara C)	147-94-4	-	Zeiger et al. (1987)	+/- Ishidate (1987)	+ Honma et al. (1999a)
6	5-Fluorouracil (5FU)	51-21-8	-	Yajima et al. (1981)	+/- Yajima et al. (1981)	+ Honma et al. (1999a)
7	Griseofulvin (GSF)	126-07-8	-	Wehner et al. (1978)	+/- Larizza et al. (1974)	+ Honma et al. (1999a)
8	Hexamethyl phosphoramide (HMPP)	680-31-9	-	Asby et al. (1985)	+/- Ishidate (1987)	+ Honma et al. (1999a)
9	Hydroxyurea (HU)	127-07-1	-	Bruce and Heddle (1979)	+/- Sherwood et al. (1988)	+ Honma et al. (1999a)
10	Methotrexate (MTX)	59-05-2	-	Seino et al. (1978)	+/- Mondello et al. (1984)	+ Honma et al. (1999a)
11	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)	70-25-7	+	McCann et al. (1984)	+/- Walton et al. (1984)	+ Overly et al. (1996)
12	Monocrotaline (MCT)	315-22-0	-	Yamanaka et al. (1979)	-/- Umeda and Saito (1971)	+ Honma et al. (1999a)
13	4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO)	56-57-5	+	Nakano et al. (1982)	+/- Walton et al. (1984)	+ Overly et al. (1996)
14	Vinblastine sulfate (VBL)	865-21-4	-	Heddle and Bruce (1977)	+/+ Segawa et al. (1979)	+L Honma et al. (1999b)

BRM, bacterial reverse mutation assay; CA, chromosome aberration assay; MLA, mouse lymphoma assay; Str./Pol., structural changes/ polyploidy; +, positive; +L, only positive in 24 or 48h treatment; -, negative

表 3

No.	Chemicals	TK		MN		COM		BR	CA	MLA
		TK6	WTK-1	TK6	WTK-1	TK6	WTK-1			
1	AEEA	-	±	±	±	-	-	-	±	-
2	BLM	-	-	-	±	-	-	-	-	-
3	CMP	-	±	-	±	-	-	-	-	-
4	COL	-	±	-	±	-	-	-	-	±
5	AraC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	5FU	-	-	-	±	-	±	-	-	-
7	GSF	-	±	-	±	-	±	-	-	-
8	HMPP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	HU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	MTX	-	±	-	±	-	±	-	-	-
11	MNNG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	MCT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	4NQO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	VBL	-	±	-	±	-	-	-	-	±

-: Negative +: Positive ±: Weak positive