

対象者は厚生労働省により職業性胆管がんと認定された宮城県、福岡県、北海道の印刷事業場2名ずつの計労働者6人である。

## 2. 情報収集

これらの労働者が使用した化学物質を同定するとともに、曝露濃度を推定するために、厚生労働省が収集した情報（印刷作業場の気積と換気量、印刷機の種類、ブランケットとインキロールの洗浄剤の化学成分と使用量、洗浄時間）を取得した。

## 3. 曝露濃度の推定

印刷作業場の1,2-DCPおよびDCMの作業環境濃度を推定するために、完全混合モデルにおける定常状態での濃度（下式）を用いた。

$$C_{En} = \frac{1000 G_T}{Q} \times \frac{24.47}{M}$$

ここで、 $C_{En}$ は作業環境濃度（ppm）、 $G_T$ は印刷作業場全体における化学物質の発生速度（g/h）、 $Q$ は印刷作業場全体の換気速度（ $m^3/h$ ）、そして $M$ は化学物質の分子量である。使用した1,2-DCPとDCMの全量が蒸発すると仮定し、 $G_T$ は1日使用量（g）を1日の労働時間（h）で割って求めた。

洗浄作業中の作業者の曝露濃度を推定するために、近接場-遠隔場モデルにおける定常状態での濃度（下式）を用いた。このモデルにおける近接場は発生源を中心とする球と仮定し、洗浄作業中の発生源と作業者の呼吸位置との距離を考慮して、球の半径 $r$ を0.5mとした。

$$C_{Ex} = \left( \frac{1000 G_{Re}}{Q} + \frac{1000 G_{Re}}{\beta} \right) \times \frac{24.47}{M}$$

ここで、 $C_{Ex}$ は洗浄作業中の作業者の曝露濃度（ppm）である。また、 $G_{Re}$ は洗浄作業中の化学物質の発生速度（g/h）であり、洗

浄作業中の化学物質の使用量（g）を洗浄作業時間（h）で割って求めた。 $\beta$ は近接場と遠隔場間の空気の交換速度（ $m^3/h$ ）であり、下式で求めた。

$$\beta = v \times 3600 \times 2\pi r^2$$

ここで、 $v$ は近接場と遠隔場の境界面を通過する気流の速度（m/sec）である。ただし、事業所XIの印刷機はブランケットが上下にあり、下のブランケットは半密閉であったので、 $\beta$ （ $m^3/h$ ）は下式で求めた。

$$\beta = v \times 3600 \times \pi r^2$$

なお、近接場と遠隔場の境界面に直接的に当たる気流はなかったため、 $v$ は0.1 m/secとした。

さらに洗浄作業以外の時間帯の曝露濃度は作業環境濃度と同一と仮定して、1日の労働時間における時間荷重平均濃度（TWAs）を算出した。

## C. 研究結果

### 事業場 I

症例 A：1969年生まれの男性である。1988年から2011年まで事業所Iにおいてオフセット校正印刷に従事し、2011年に胆管がんと診断された。その他には化学物質の使用歴はない。

症例 B：1974年生まれの男性である。1992年から2011年まで事業所Iにおいてオフセット校正印刷に従事し、2011年に胆管がんと診断された。その他には化学物質の使用歴はない。

事業所Iは2つの印刷室があり、その気積は1260  $m^3$ と570  $m^3$ で、換気量は3690  $m^3/hr$ と1960  $m^3/hr$ と推計された。局所排気装置はつけられていなかった。

1,1,1-トリクロロエタン（1,1,1-TCE）は

1994年まで使用され、1,2-DCPとDCMは1994年から2011年まで使用していた。ミネラルスピリットやナフサも使用していた。印刷室の1,2-DCP使用量は320-710 g/hrで、DCM使用量は1 g/hr未満であった。(Table 1)。洗浄作業での1,2-DCP使用量は630-1800 g/hrで、DCM使用量は4 g/hr未満であった (Table 1)。

洗浄作業での溶剤が蒸発する発生源と呼吸域との距離は0.5m、凸版輪転印刷機での距離は0.85 mと考えられる。

Table 2に1,2-DCPとDCMの推定濃度を示す。印刷室の環境濃度は1,2-DCPが35-42 ppm、DCMが1 ppm未満と見積もられる。インク洗浄作業では症例Aでは1,2-DCPが280-490 ppm、DCMが3 ppm未満、症例Bでは、1,2-DCPが490 ppm、DCMが3 ppm未満、と見積もられる。10時間の時間荷重平均濃度は症例Aでは1,2-DCPが100-170 ppm、DCMが1 ppm未満で、症例Bでは1,2-DCPが80-120 ppm、DCMが1 ppm未満と見積もられた。2人とも保護具は着用していなかった。

#### 事業場II

症例C：1950年生まれの男性である。1970年から1973年までと、1975年から1998年まで、事業場IIで勤務し、1998年に胆管がんと診断された。その他には化学物質の使用歴はない。

症例D：1965年生まれの男性である。1992年から2008年まで事業場IIで勤務し、2008年に胆管がんと診断された。その他には化学物質の使用歴はない。

事業場IIは二つの印刷室があり、気積は170 m<sup>3</sup>と180 m<sup>3</sup>で、換気量は3,020か1,790 m<sup>3</sup>/hと1,100 m<sup>3</sup>/hであった。印刷機

には局所排気装置は設置されていなかった。

1985年まで、ブランケットからインク除去にガソリンが使用されていて、その後、1,2-DCPが1986-2008年に、DCMが1986-1998年に、1,1,ジクロロ1フルオロエタンが1996-1999年に、ミネラルスピリットが1993-1998年に使用していた。ケラセンとミネラルオイルはインクロールからインクの除去のために用いられた。

作業場全体で使用した1,2-DCPは230-580 g/h、DCMは0-310 g/hであった。また洗浄作業中に使用した1,2-DCPは330-1200 g/h、DCMは0-830 g/hであった。

発生源から呼吸域までの距離は0.5mとした。

作業環境濃度は1,2-DCPが17-92 ppm、DCMが0-50 ppmと推定された。(Table 2)

洗浄作業中の曝露濃度は症例Cでは1,2-DCPが150-620 ppm、DCMが110-560 ppm、症例Dでは1,2-DCPが170-420 ppm、DCMが0-340 ppmと推定された。1日の労働時間は9時間であり、9時間荷重平均濃度は症例Cでは1,2-DCPが62-170 ppm、DCMが29-150 ppm、症例Dでは1,2-DCPが75-200 ppm、DCMが0-150 ppmと推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

#### 事業場III

症例E：1946年生まれの男性である。1980年から1995年まで事業場IIIで勤務し、2003年に胆管がんと診断された。その他に7箇所の印刷作業場に勤務し、そのうちの5事業場ではガソリン、DCM(0.15kg/日)、イソプロピルアルコール、ミネラルスピリッ

ト、ミネラルオイル、ポリオキシエチレンノニールフェニールエーテルなどを洗浄作業に使っていた。

症例 F：1955 年生まれの男性である。1980 年から 1995 年まで事業場Ⅲで勤務し、2013 年に胆管がんと診断された。他の印刷事業場で働いたことがあるが、1,2-DCP と DCM は使用していない。

事業場Ⅲは三つの印刷室があり、気積はそれぞれ 150 m<sup>3</sup>、750 m<sup>3</sup>、340 m<sup>3</sup>で、換気量はそれぞれ 480 m<sup>3</sup>/h、2,400 m<sup>3</sup>/h、1,090 m<sup>3</sup>/h であった。印刷機には局所排気装置は設置されていなかった。

1984 年まで、ブランケットからインク除去にガソリンが使用されていて、その後、1,2-DCP と DCM が 1985-1995 年に、1,1,1-TCE が 1985-1992 年に、ミネラルスピリットが 1993-1995 年に使用していた。ケラセンはインクロールからインクの除去のために用いられた。

作業場全体で使用した 1,2-DCP は 320-390 g/h、DCM は 160-370 g/h であった。また洗浄作業中に使用した 1,2-DCP は 280-350 g/h、DCM は 140-320 g/h であった。発生源から呼吸域までの距離は 0.5m とした。

作業環境濃度は 1,2-DCP が 35-180 ppm、DCM が 20-98 ppm と推定された。(Table 2)

洗浄作業中の曝露濃度は症例 E と症例 F では 1,2-DCP が 160-290 ppm、DCM が 91-250 ppm と推定された。1 日の労働時間は 11.5 時間であり、11.5 時間荷重平均濃度は症例 E と症例 F では 1,2-DCP が 110-240 ppm、DCM が 60-180 ppm と推定された。呼吸保護具は使用しなかった。

完全混合モデルでは、作業場内で発生した化学物質は瞬間的に拡散混合し、気中濃度は均一であると仮定している。また、近接場-遠隔場モデルでは、2 つの場の内部の気中濃度は均一であると仮定している。現実には、気中濃度には空間的な変動があるので、これらの仮定は正しくない。しかしながら、対象者が勤務した作業場内の気中濃度の空間的な変動に関する情報はないので、これらのモデルを使用することとした。したがって、本研究で算出された濃度は粗い推定値である。

本研究の対象者 6 人は、1,2-DCP に高濃度曝露していた。このことから 1,2-DCP の高濃度がヒトに胆管がんを引き起こすことを示唆している。また 6 名中 4 人は DCM にも高濃度長期間曝露を受けており、DCM の高濃度もヒトに胆管がんを引き起こすことに関連していることが示唆された。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yamada K, Kumagai S, Nagoya T, Endo G. Chemical exposure levels in printing workers with cholangiocarcinoma. J Occup Health. 2014;56(5):332-8.

### 2. 学会発表

なし

## F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

Table 1. Basic information used to estimate exposure concentrations of 1,2-dichloropropane and dichloromethane.

Plant	Worker	Calendar years employed as a printing worker	Printing room					Ink removal operation				Chemicals used for ink removal operation				
			No.	Volume (m <sup>3</sup> )	Ventilation rate (m <sup>3</sup> /hr)	Frequency of air exchange (hr <sup>-1</sup> )	Amount of 1,2-DCP (g/hr)	Amount of DCM (g/hr)	Printing machine	r (m)	β (m <sup>3</sup> /hr)	Amount of 1,2-DCP (g/hr)	Amount of DCM (g/hr)	Ink removal from blanket	Ink removal from ink roll	
I	A	1988–1994		NI	NI	---	---	---	Rotary offset	NI	---	---	---	1,1,1-TCE		
		1995–1998	1	1260	3690	2.9	630	< 1		0.5	570	1100	< 4	1,2-DCP, DCM	MS Naphtha	
		1999–2011					660–710	< 1	Sheet-fed offset			630–900	< 4			
	B	1992–1994		NI	NI	---	---	---	Rotary offset	NI	---	---	---	1,1,1-TCE		
		1995	1	1260	3690	2.9	630	< 1		0.5	570	1100	< 4			
		1996–2001					360	< 1	Sheet-fed relief			900	< 4		MS Naphtha	
		2002–2004	2	570	1960	3.4	360	< 1	Rotary relief	0.85	1630	1800	< 4	1,2-DCP, DCM		
			2005–2011				320–360	< 1	Rotary offset	0.5	570	630–700	< 4			
	II	C	1970–1973		NI	NI	---	---	---		NI	---	---	---	Gasoline	
			1975–1985													
1986–1990					3020	17.8	230	270				330	400	1,2-DCP, DCM		
1990–1992							230	270	Flatbed offset (proof-printing)			330	400		Kerosen MO	
1993			3	170			230	270		0.5	570	330	400	1,2-DCP, DCM, MS		
			1994–1995			1790	10.5	240–270	280–310			560–720	670–830			
			1996–1998				280–480	56			720–1200	170		1,2-DCP, DCM, DCFE, MS		
D		1992					230	270				330	400	1,2-DCP, DCM		
		1993–1995					230–270	270–310				330–430	400–500	1,2-DCP, DCM, MS		
		1996–1998	3	170	1790	10.5	280–480	56	Flatbed offset (proof-printing)	0.5	570	430–730	100	1,2-DCP, DCM, DCFE, MS	Kerosen MO	
	1999					470	0				700	0	1,2-DCP, DCFE			
	2000–2004					470–580	0				700–830	0	1,2-DCP			
		2005–2008	4	180	1100	6.1	470	0			700	0				
III	E F	1980–1984		NI	NI	---	---	---		NI	---	---	---	Gasoline		
		1985–1987	5	150	480	3.2	390	160				350	140			
		1988–1991	6	750	2400	3.2	390	160	Flatbed offset (proof-printing)	0.5	570	350	140	1,2-DCP, DCM, 1,1,1-TCE	Kerosen	
		1991–1992					390	160				350	140			
		1993–1995	7	340	1090	3.2	320	370				280	320	1,2-DCP, DCM, MS		

NI: no information, r: radius of near field, β: air exchange rate between near-field and far-field =  $0.1 \times 3600 \times 2\pi r^2$ , 1,2-DCP: 1,2-dichloropropane, DCM: dichloromethane, 1,1,1-TCE: 1,1,1-trichloroethane, DCFE: 1,1-dichloro-1-fluoroethane, MS: mineral spirit, MO: mineral oil

Table 2. Estimated working environment concentrations of 1,2-dichloropropane and dichloromethane in printing rooms, exposure concentrations during ink removal operation and shift time-weighted averages (TWAs)

Plant	Worker	Calendar years employed as a printing worker	Printing room		Ink removal operation				Shift TWAs				
			No.	1,2-DCP (ppm)	DCM (ppm)	Printing machine	Duration (hr)	1,2-DCP (ppm)	DCM (ppm)	Working hours (hr)	1,2-DCP (ppm)	DCM (ppm)	
I	A	1988–1994		---	---	Rotary offset	NI	---	---	NI	---	---	
		1995–1998	1	37	< 1		1.5	490	< 3	10	100	< 1	
		1999–2011		39–42	< 1		Sheet-fed offset	3.5	280–400	< 3		120–170	< 1
	B	1992–1994		---	---	Rotary offset	NI	---	---	NI	---	---	
		1995	1	37	< 1		1.5	490	< 3	10	100	< 1	
		1996–2001		40	< 1		Sheet-fed relief	2	440	< 3		120	< 1
		2002–2004	2	40	< 1		Rotary relief	1	440	< 3		80	< 1
			2005–2011		35–40	< 1	Rotary offset	2.5	310–350	< 3		100–120	< 1
	II	C	1970–1973		---	---	Flatbed offset (proof-printing)	NI	---	---	NI	---	---
			1975–1985										
1986–1990				17	25	3		150	240	9	62	98	
1990–1992				28	43			170	270		75	120	
1993			3	28	43			170	270		75	120	
			1994–1995		30–32	45–50	1.8	280–360	450–560		80–99	130–150	
			1996–1998		34–58	9	360–620	110		100–170	29		
D		1992		28	43	Flatbed offset (proof-printing)		170	270	9	75	120	
		1993–1995		28–32	43–50			170–220	270–340		75–94	120–150	
		1996–1998	3	34–58	9		3	220–370	67		95–160	28	
	1999		56	0			350	0		160	0		
	2000–2004		56–70	0			350–420	0		160–190	0		
		2005–2008	4	92	0		410	0		200	0		
III	E F	1980–1984		---	---	Flatbed offset (proof-printing)	NI	---	---	NI	---	---	
		1985–1987	5	180	98			290	160		240	130	
		1988–1991	6	35	20		6.5	160	91	11.5	110	60	
		1991–1992		78	43			200	110		150	82	
		1993–1995	7	64	97			160	250		120	180	

NI: no information, 1,2-DCP: 1,2-dichloropropane, DCM: dichloromethane

Dichloromethane 及び 1,2-dichloropropane の混合投与による毒性影響について

研究分担者：西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)

研究協力者：平田 直 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部)

曹 永晩 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部)

小川久美子 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部)

**研究要旨**：印刷所従事者に多発した胆管癌との因果関係が示唆されている化合物である、1,2-dichloropropane (DCP) と dichloromethane (DCM) については、これまでもラットおよびマウスでの発がん性が検討されているが、種差の存在や投与経路による結果の変動が見られている。これらの化合物は、それぞれが類似の代謝を経て DNA 傷害性及び発がん性を示すと考えられており、それぞれの代謝酵素の誘導が干渉し合っている可能性が考えられる。本研究では、これらの化合物単独及び混合物の 4 週間強制経口投与による肝臓での遺伝子変異について、雄性 F344 系 *gpt delta* ラット及び雄性 B6C3F<sub>1</sub> 系マウス (野生型および p53 欠損型) をもちいた *in vivo* 遺伝毒性試験を行い、本剤の毒性発現機序に関するデータを得る事を目的とした。その結果、ラットでは、投与に関連した肝臓の重量および組織学的変化は認めなかったが、野生型マウスの混合投与群ならびに p53 欠損型マウスの DCP 単独投与群では、肝臓の絶対及び相対重量の有意な増加が認められ、さらに野生型及び p53 欠損型マウスでは、DCP 単独及び混合投与群において肝細胞へのグリコーゲン沈着が認められた。一方、*gpt mutation assay* / *Spi<sup>-</sup> assay* の結果より、*gpt delta* ラット及びマウスの肝臓において、強制経口投与した DCP、DCM 及びその混合物が *in vivo* 変異原性を示さないことが確認された。また、DCP 投与群及び混合投与群で *Cyp2e1* の mRNA 及びタンパク発現の減少傾向が野生型の *gpt delta* マウスにおいて観察された以外には、*Cyp2e1* および *Gstt1* の発現に対して、投与に関連した変化は見られなかった。今回の検討においては、DCP 投与により、マウス肝臓に明らかな遺伝毒性を伴わない臓器重量の増加を認めたが、DCM による相加あるいは相乗作用は見られなかった。今後は投与経路の違いや種差などと代謝活性機序の更なる検討が必要であると考えられる。

キーワード：胆管がん、dichloromethane、1,2-dichloropropane、*in vivo* 遺伝毒性、複合影響

#### A. 研究目的

印刷所従事者に多発した胆管癌との因果関係が示唆されている化合物の 1 つである

1,2-dichloropropane (DCP) は、2 年間の吸入曝露によってラット雌雄で鼻腔の扁平上皮乳頭腫、マウス雌で細気管支肺胞の良性・悪性腫瘍の発生を増加させることが報告されている。一

方、経口曝露では、ラットでの発がん性は示されていないが、マウス雌雄で肝細胞の良性・悪性腫瘍及びマウス雌で乳腺がんの発生増加が観察されている。因果関係が示唆されているもう一つの化合物である dichloromethane (DCM) は、2 年間の吸入曝露によってラット雌雄で乳腺の線維腺腫、腺腫と線維腺腫の合併 (良性腫瘍)

が増加し、ラット雌で肝細胞腫瘍性結節または肝細胞がんの増加傾向が認められており、マウス雌雄では肺及び肝臓に腫瘍が用量依存的に増加したと報告されている。一方、経口曝露では、ラットでは、造腫瘍性がないとする報告と雌の乳腺腺がんを増加させたとの報告があり、マウスでも明らかではないとする報告と、雄において肝細胞腺腫と肝細胞がんの合計頻度が有意に増加したとの報告がある。

DCMの代謝経路には、CYP経路とGST経路の2つがあり、高濃度ばく露になるとCYP経路による代謝が飽和するため、GST経路が活性化し、GST経路による代謝が行われることによりS-(クロロメチル)グルタチオンやホルムアルデヒドがDNA損傷を引き起こすことから発がん性が生じると考えられている。1, 2- DCPについても、同様の代謝経路と発がんメカニズムが推測されている。

これらの2物質の同時曝露により代謝経路の変動や相加的影響が誘導される可能性について検討するため、今回は、これらの化合物単独及びその混合物投与の肝臓での遺伝子変異に対する影響について、*gpt delta* ラット及びマウスをもちいた、*in vivo* 遺伝毒性試験を実施すると共に一般毒性指標および代謝酵素の発現について解析を行った。

## B. 研究方法

【実験Ⅰ】 6週齢の雄性F344系 *gpt delta* ラットにDCP (100, 200 mg/kg B. W.)、DCM (250, 500 mg/kg B. W.)あるいはDCP + DCM (100 + 250, 200 + 500 mg/kg B. W.)を、各群7若しくは8匹に対して4週間強制経口投与した。この間、溶媒であるCorn oilのみを与えた7匹を対照群とした。4週間後に解剖を行い、血液及び肝臓を採取した。採取した血液は血清生化学検査を実施し、肝臓においては *gpt mutation* / Spi- assay を実施し被験物質の変異原性を検討した。また

q-PCR及びウエスタンブロットを実施し、被験物質の代謝酵素の遺伝子およびタンパク発現を検討した。また肝臓を切り出し、ホルマリン固定後、パラフィン包埋切片、HE標本を作製し、病理組織学的検討を行った。

【実験Ⅱ】 8週齢の雄性B6C3F<sub>1</sub>系p53野生型(以下、野生型)若しくはp53欠損型(以下、欠損型) *gpt delta* マウスにそれぞれ、DCP (250 mg/kg B. W.)、DCM (500 mg/kg B. W.)、DCP + DCM (250 + 500 mg/kg B. W.)を、4週間強制経口投与した。野生型は各群4又は5匹、欠損型は各群8匹とし、この間、溶媒であるCorn oilのみを与えた野生型4匹、欠損型8匹をそれぞれの遺伝子型間での対照群とした。4週間後に解剖を行い、実験Ⅰと同様の検討を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者による強制経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

## C. 研究結果

【実験Ⅰ】 DCP、DCM及びその混合物の投与群は溶媒対照群に対し、体重、肝臓の絶対、相対重量に有意な変化は確認されなかった(Table I)。

血清生化学検査の結果より、ビリルビンについてはDCPの高用量群で、無機リンについては混合物群で、それぞれ有意な高値が確認された。また、コレステロール、トリグリセリド、アラニンアミノ基転移酵素についてはDCP及び混合物の群において、それぞれ用量相関性の減少が確認された(Table II)。肝臓の病理組織学的検査の結果、何れの投与群においても、被験物質による影響を示す変化は認められなかった

(Table III)。

q-PCRの結果より、溶媒対照群と比較して、全ての投与群でCyp2e1及びGstt1の遺伝子発現に変化は見られなかった(Figure 1 A)。またウエスタンブロットの結果も同様に、全ての投与群でこれらの代謝酵素のタンパク発現に変化は見られなかった(Figure 1 B)。

*gpt* mutation assayの結果より、溶媒対照群と比較して、全ての群で点突然変異の増加は認めなかった(Figure 2 A)。またSpi- assayの結果も同様に、全ての群で欠失変異の増加は認めなかった(Figure 2 B)。*gpt* 変異頻度及びSpi-変異頻度の詳細についてはTable IV及びVに示した。

【実験II】 DCP、DCM及びその混合物の投与群は溶媒対照群に対し、体重は有意な変化を示さなかったが、野生型の混合群で、肝臓の絶対及び相対重量の有意な増加が確認された。また欠損型ではDCP群で肝臓の絶対及び相対重量の有意な増加が確認された (Table VI)。

血清生化学検査の結果より、野生型においてDCP群で、尿素窒素の有意な減少がみられた。また欠損型において混合群で、ビリルビン及びカルシウムの有意な増加が認められた (Table VII)。

病理組織学的検索より、野生型・欠損型ともにDCP及び混合群で肝細胞のグリコーゲン沈着が、欠損型のDCP群でkaryocytomegalyが認められた (Table VIII)。

q-PCRの結果より、各遺伝子型間においてそれぞれの溶媒対照群と比較して、DCP及び混合群でCyp2e1の遺伝子発現に減少傾向が確認された(Figure 3 A)。Gstt1及びTrp53に関しては遺伝子発現に変化は見られなかった(Figure 3 B, C)。またウエスタンブロットの結果より、野生型のDCP及び混合群においてCYP2E1のタンパク発現の減少が確認され、欠損型群でも混合群においてCYP2E1のタンパク発現の減少傾

向が確認された(Figure 4)。GSTT1においてはいずれの遺伝子型においても全ての群で有意な発現変化は確認されなかった。

*gpt* mutation assayの結果より、各遺伝子型間において、それぞれ溶媒対照群と比較して、全ての群で点突然変異の増加は認めなかった(Figure 5 A)。またSpi- assayの結果も同様に、全ての群で欠失変異の増加は認めなかった(Figure 5 B)。*gpt* 変異頻度及びSpi-変異頻度の詳細についてはTable IX及びXに示した。

*gpt* delta ラット及び、マウスを用いて、4週間の強制経口投与によるDCP、DCM及びその混合投与の影響について、肝臓に対する変異原性と代謝酵素発現を主体に検討した。

実験Iより、ラットに対し、4週間のDCP、DCMの強制経口投与を実施した結果、体重、及び肝臓の絶対・相対重量に有意な変化は認めなかった。またこれらの肝臓を病理組織学的に検索した結果、明らかな変化は認めなかった。これらのことより、我々の実験条件下ではこれらの物質のラット肝臓に対する毒性影響は少ないものと考えられた。血液生化学検査の結果より、コレステロール及びトリグリセリドについてはDCP及び混合物の群において、それぞれ用量相関性の減少が確認され脂質代謝の異常が考えられたが、病理組織学的変化や肝重量の変化はともなっておらず、意義の詳細は不明である。また、アラニンアミノ基転移酵素の減少は毒性とは逆の変化と考えられるため、毒性影響とは判断しなかった。

DCP及びDCMの代謝酵素と推測されるCYP2E1及びGSTT1について遺伝子発現、タンパク発現をそれぞれ確認したが、全ての群において顕著な変化は見られなかった。

また*gpt* mutation / Spi- assayの結果より、溶媒対照群と比較して、DCP、DCM及び混合投与群において点突然変異、欠失変異ともに有意な増加は確認されなかった。DCMは通常CYP代謝経路によって代謝され、排せつされることが確認されてお



り、これらが高濃度になると CYP 経路が飽和し、GST 代謝経路が活性化されることが報告されている (U. S. EPA 2011)。DCP の GST 代謝酵素は未だ同定されていないが、1, 3-DCP 等構造が類似しているハロゲン化合物や 1, 2-ジブロモエタン等の研究により、高濃度では DCM と同様に GST 代謝経路によって代謝され、グルタチオン抱合を介してエピスルフォニウムイオンが生じ、DNA 付加体を形成する反応性の中間代謝物が産生され、遺伝毒性を惹起するのではないかと考えられている (Zoetemelk et al. Drug Metab Dispos. 1986)。本研究では *in vivo* 変異原性試験の結果に加え、これらの物質の代謝酵素の発現変化を確認することができなかった。つまりこれらの物質が GST 代謝経路により代謝されなかった可能性が示唆される。また、ラットでは GSTT1 の発現が比較的低いことが報告されている (Guy et al. Biochem. J. 1996)。これらのことから、今後、これら以外の代謝酵素を含めて解析することが DCP、DCM の毒性影響を評価する上で重要になる可能性が示唆された。

実験 II より、DCP、DCM 及びその混合物のマウスへの投与に対し、野生型の混合群で、肝臓の絶対・相対重量の有意な増加が確認された。また欠損型では DCP 群で肝臓の絶対・相対重量の有意な増加が確認された。また病理組織学的検査の結果より、DCP 及び混合群で肝細胞のグリコーゲン沈着が確認された。これらの結果より、DCP の投与はマウス肝臓に対して影響を及ぼしたことが示唆された。しかしながら血清生化学検査の結果、これらの群において有意な毒性学的変化は確認されなかったことより、今後更なる詳細な検討が必要であると考ええる。

また遺伝子・タンパク発現解析により野生型の DCP 及び混合群で Cyp2e1 の遺伝子・タンパク発現に減少傾向が確認された。欠損型においても混合群で同様の変化が確認された。GSTT1 においては全ての群において変化は確認されなかった。これらの結果より、マウスの肝臓において DCP が CYP2E1

の発現を抑制している可能性が示唆されたが、その詳細は不明であり、更なる検証が必要であると考ええる。

これまでに DCP は強制経口投与によって、B6C3F<sub>1</sub> マウス雌雄で肝細胞の良性・悪性腫瘍を、DCM は B6C3F<sub>1</sub> マウス雄の肝細胞腺腫あるいは肝細胞がんを誘発させたとの報告があるが、今回の *gpt* mutation / Spi- assay の結果より、いずれの遺伝子型においても、溶媒対照群と比較して、DCP、DCM 及び混合投与群において点突然変異、欠失変異ともに有意な増加は確認されなかった。また遺伝子型間においても違いは確認されず、p53 が欠損し、細胞増殖停止と DNA 損傷修復機能の異常状態においても、肝臓に対する明らかな遺伝毒性は示さなかったといえる。

C57BL/6J マウスでは吸入曝露において DCP と DCM 混合曝露により肝臓での *gpt* 変異頻度の増加が報告されている (Suzuki et al. J Occup Health. 2015)。本試験では強制経口投与で実施されており、これらの結果の違いが、投与経路の違いによって吸収あるいは代謝等に変動をもたしたことによるものかどうか更なる検討が必要であると考ええる。

我々が実施した *gpt* mutation assay / Spi- assay の結果より、強制経口投与により、DCP、DCM 及びその混合物が *gpt* delta ラット、マウスの肝臓において *in vivo* 変異原性を示さないことが確認された。また、今回の検討においては、DCP 投与により、マウス肝臓に明らかな遺伝毒性を伴わない臓器重量の増加を認めたと、DCM による相加あるいは相乗作用は見られなかった。今後は投与経路の違いや種差などと代謝活性機序の更なる検討が必要であると考ええる。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年

も記入)

- 1) 平田 直, Cho Young-Man, 豊田 武士, 赤木 純一, 鈴木 勇, 西川 秋佳, 小川 久美子: *gpt* delta ラットにおける 1,2-dichloropropane 及び dichloromethane の強制経口投与による *in vivo* 変異原性試験. 第 31 回日本毒性病理学会総会及び学術集会: 2015 年 1 月(東京)

#### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

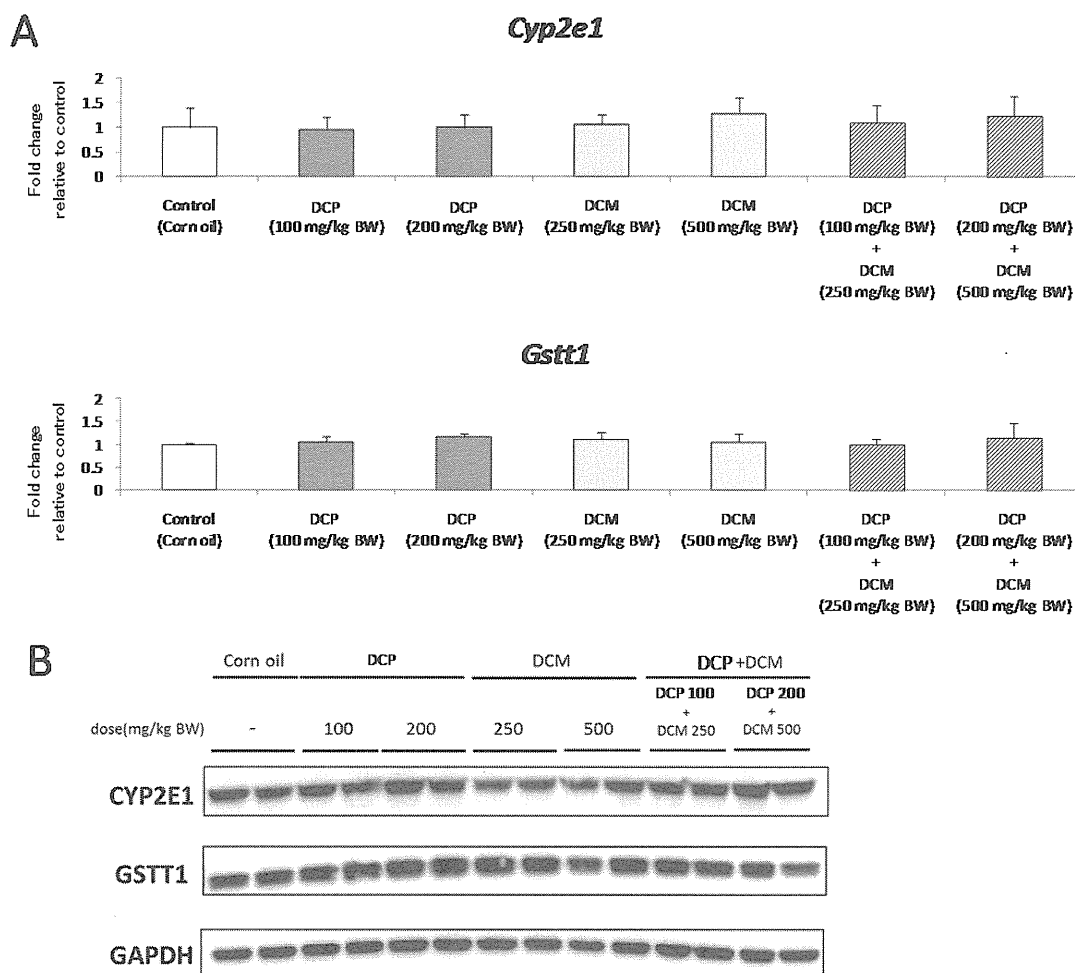
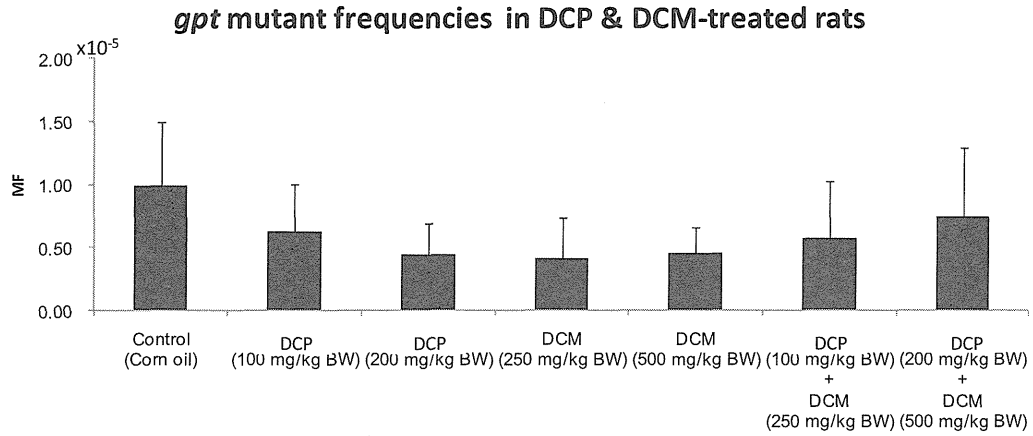


Figure 1 (A) Changes in the mRNA level of DCP and DCM metabolic enzyme genes, *Cyp2e1* and *Gstt1*, in the liver of *gpt* delta rats treated with DCP, DCM or their combination for 4 weeks. Each value is the mean  $\pm$  SD of data from seven or eight rats. Data were normalized with GAPDH mRNA levels (B) Western blotting analysis of CYP2E1 and GSTT1 in the liver of *gpt* delta rats treated with DCP, DCM or their combination for 4 weeks.

A



B

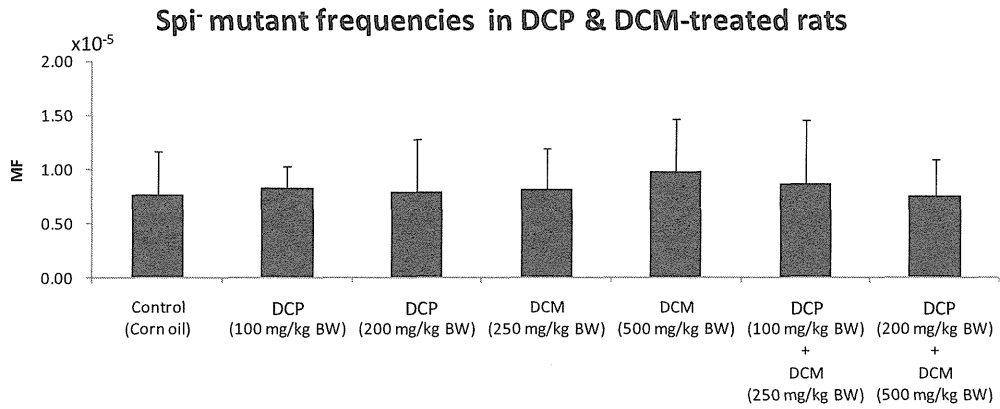


Figure 2 (A) *gpt* mutant frequencies, (B) *Spi* mutant frequencies in the liver of *gpt* delta rats treated with DCP, DCM or their combination for 4 weeks. The values represent the means of experiments  $\pm$  SD.

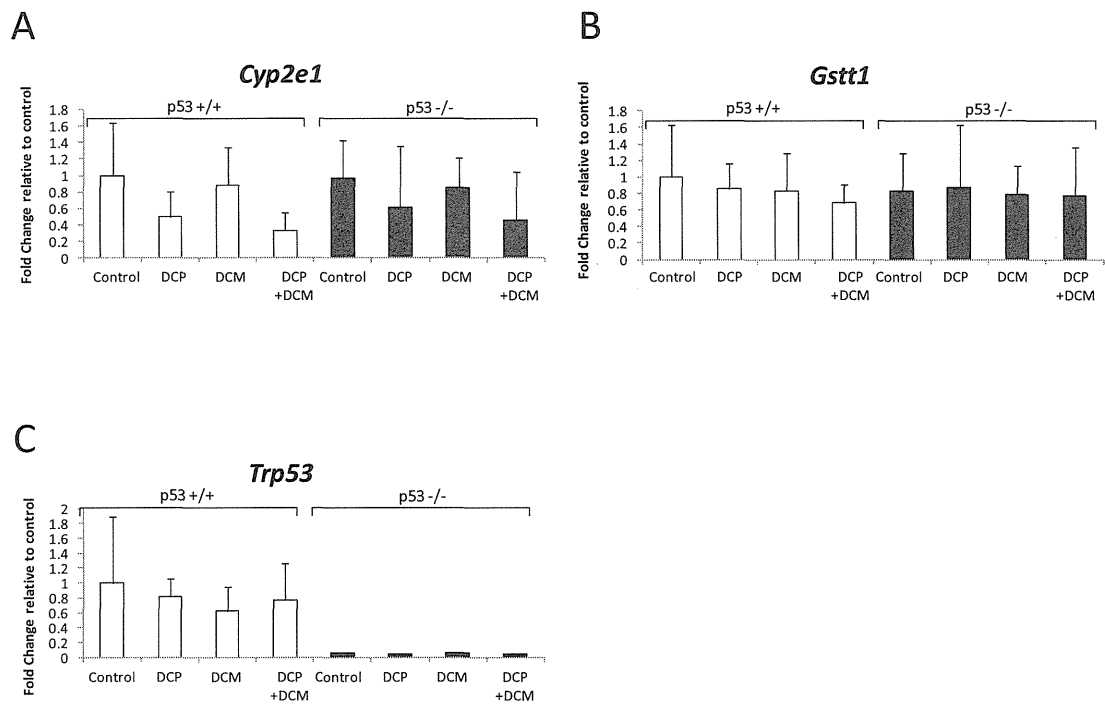


Figure 3 Changes in the mRNA level of DCP and DCM metabolic enzyme genes, (A) *Cyp2e1* and (B) *Gstt1*, in the liver of *gpt* delta rats treated with DCP, DCM or their combination for 4 weeks. In addition, (C) *Trp53*. Each value is the mean  $\pm$  SD of data from four or five mice. Data were normalized with GAPDH mRNA levels.

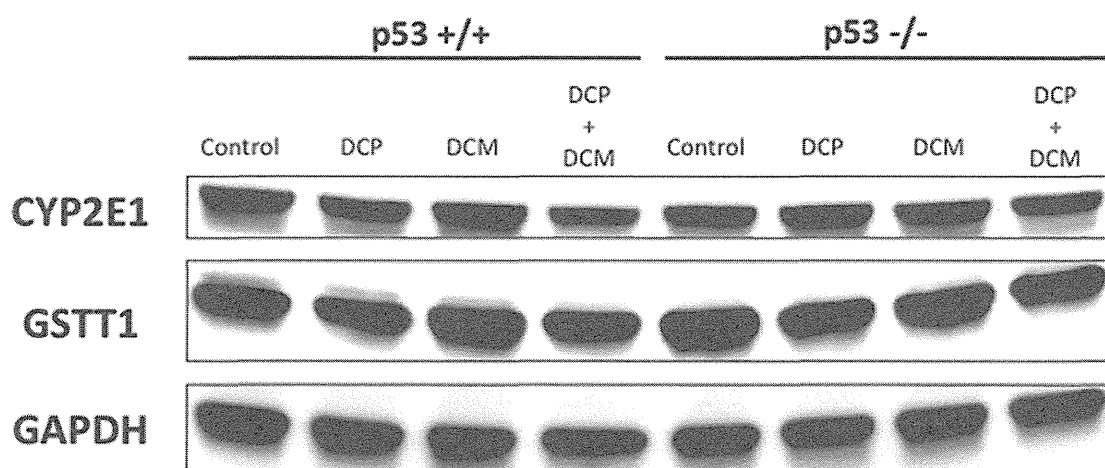


Figure 4 Western blotting analysis of CYP2E1 and GSTT1 in the liver of p53-proficient and -deficient *gpt* delta mice treated with DCP, DCM or their combination for 4 weeks.

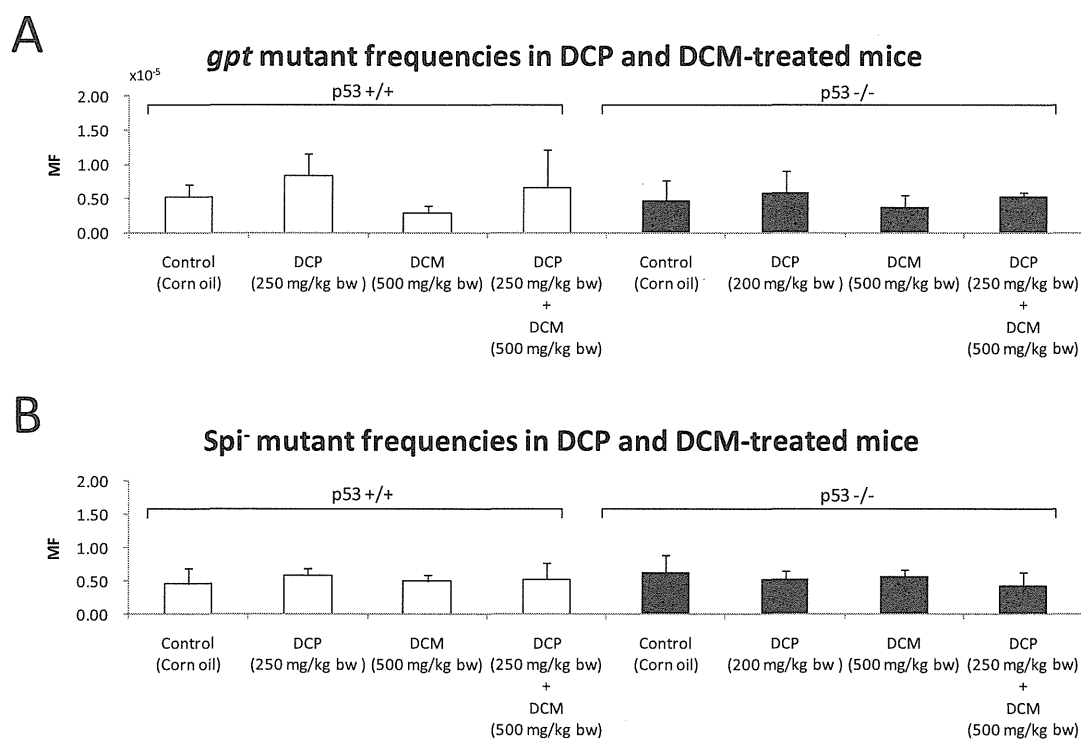


Figure 5 (A) *gpt* mutant frequencies, (B) Spi- mutant frequencies in the liver of p53-proficient and -deficient *gpt* delta mice treated with DCP, DCM or their combination for 4 weeks. The values represent the means of experiments  $\pm$  SD.

Table I Terminal body weight and liver weight of male *gpt* delta rats treated with DCP and DCM for 4 weeks.

Group	Terminal body weight (g)	Liver weight	
		Absolute (g)	Relative (g %)
Control (Corn oil)	196.4 ± 12.8	5.83 ± 0.58	2.96 ± 0.16
DCP 100 mg / kg BW	188.3 ± 11.0	5.33 ± 0.27	2.93 ± 0.11
DCP 200 mg / kg BW	180.0 ± 12.5	5.54 ± 0.43	3.18 ± 0.20
DCM 250 mg / kg BW	208.6 ± 12.8	5.86 ± 0.50	2.93 ± 0.12
DCM 500 mg / kg BW	207.8 ± 10.1	5.89 ± 0.27	2.96 ± 0.08
DCP 100 + DCM 250 mg / kg BW	192.5 ± 8.2	5.56 ± 0.32	2.98 ± 0.09
DCP 200 + DCM 500 mg / kg BW	188.4 ± 10.5	5.74 ± 0.22	3.16 ± 0.11

Table II Blood chemistry study of male *gpt* delta rats treated with DCP and DCM for 4 weeks.

Treatment	Control (Corn oil)	DCP (mg / kg BW)		DCM (mg / kg BW)		DCP + DCM (mg / kg BW)	
		100	200	250	500	100 + 250	200 + 500
TP (g/dL)	5.7 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.8 ± 0.2	5.6 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.6 ± 0.2
Alb (g/dL)	4.2 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1
A/G	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.9 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.2
Glucose (mg/dL)	167 ± 15	159 ± 33	151 ± 13	144 ± 15	135 ± 14*	139 ± 13	141 ± 16
Bil (mg/dL)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01**	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01
T-Cho (mg/dL)	59 ± 4	49 ± 5**	43 ± 4**	54 ± 3	54 ± 3	48 ± 6**	40 ± 8**
TG (mg/dL)	65 ± 5	38 ± 6*	30 ± 8**	55 ± 32	46 ± 8	35 ± 11**	29 ± 8**
γGTP (IU/L)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
AST (IU/L)	67 ± 4	74 ± 5	74 ± 5	68 ± 5	69 ± 4	72 ± 4	67 ± 4
ALT (IU/L)	41 ± 5	34 ± 2**	27 ± 3**	40 ± 1	40 ± 4	34 ± 4**	25 ± 2**
ALP (IU/L)	1006 ± 101	1045 ± 108	952 ± 109	929 ± 111	920 ± 126	975 ± 139	871 ± 89
BUN (mg/dL)	19 ± 2	18 ± 1	20 ± 2	19 ± 2	18 ± 2	19 ± 2	19 ± 3
Cre (mg/dL)	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.02
Ca (mg/dL)	10.2 ± 0.2	9.9 ± 0.2	10.2 ± 0.2	10.0 ± 0.3	10.1 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.2 ± 0.2
IP (mg/dL)	7.0 ± 0.2	6.9 ± 0.2	6.9 ± 0.3	7.3 ± 0.2	7.2 ± 0.3	7.3 ± 0.3	7.6 ± 0.3**
Na (mg/dL)	143 ± 0	144 ± 1	145 ± 1	143 ± 1	144 ± 0	144 ± 1	144 ± 0
K (mg/dL)	4.6 ± 0.2	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.2	4.7 ± 0.2
Cl (mg/dL)	104 ± 1	105 ± 1	105 ± 1	103 ± 1	103 ± 1	105 ± 1	104 ± 1

Each value represents the mean ± SD. TP, total protein; Alb, albumin; Bil, bilirubin; T-Cho, total cholesterol; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; Cre, creatinine. Significantly different from the vehicle control group at \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01.

Table III Histopathological findings of male *gpt* delta rats treated with DCP and DCM for 4 weeks.

Treatment	Control (Corn oil)	DCP (mg/kg BW)		DCM (mg/kg BW)		DCP + DCM (mg/kg BW)	
		100	200	250	500	100 + 250	200 + 500
Organs and findings	No. of animals	7	7	7	7	7	8
Liver							
Eosinophilic change	0	0	0	1	0	0	2
Cell infiltration	6	6	7	7	7	7	8
Microgranuloma	2	3	1	5	5	5	4
Single cell necrosis	3	3	4	3	1	3	2
Karyocytomegaly	0	0	0	0	1	0	0
Mitosis	3	0	0	2	1	0	0

Table IV *gpt* MFs in the liver of male *gpt* delta rats treated with 1,2-dichloropropane and dichloromethane for 4 weeks.

Treatment	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies (x10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant Frequency (x10 <sup>-5</sup> )	Mean ± S.D.
Control (Corn oil)	1	7.8	4	0.51	1.0 ± 0.5
	2	6.0	10	1.67	
	3	6.4	4	0.62	
	4	5.9	8	1.35	
	5	7.2	6	0.83	
DCP (100 mg/kg BW)	8	7.9	3	0.38	0.63 ± 0.38
	9	5.8	4	0.69	
	10	6.9	3	0.44	
	11	8.3	3	0.36	
	12	4.0	5	1.26	
DCP (200 mg/kg BW)	15	6.1	3	0.49	0.47 ± 0.23
	16	5.2	1	0.19	
	17	8.5	4	0.47	
	18	10.8	3	0.28	
	19	3.6	3	0.82	
DCM (250 mg/kg BW)	22	5.1	5	0.97	0.41 ± 0.33
	23	9.1	1	0.31	
	24	6.4	2	0.11	
	25	10.3	3	0.29	
	26	8.1	3	0.37	
DCM (500 mg/kg BW)	29	6.9	2	0.29	0.46 ± 0.20
	30	9.0	7	0.78	
	31	5.9	2	0.34	
	32	7.7	4	0.52	
	33	5.4	2	0.37	
DCP (100 mg/kg BW) + DCM (250 mg/kg BW)	36	6.9	1	0.15	0.70 ± 0.42
	37	5.2	6	1.16	
	38	7.1	5	0.70	
	39	9.0	7	0.78	
	40	9.5	1	0.11	
DCP (200 mg/kg BW) + DCM (500 mg/kg BW)	43	3.1	4	1.31	0.75 ± 0.54
	44	7.5	10	1.33	
	45	11.6	6	0.52	
	46	6.7	3	0.45	
	47	7.9	1	0.13	



Table V Spi-MFs in the liver of male *gpt* delta rats treated with 1,2-dichloropropane and dichloromethane for 4 weeks.

Treatment	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA ( $\times 10^5$ )	Plaques within WL95 (P2)	Mutant Frequency ( $\times 10^{-5}$ )	Mean $\pm$ S.D.
Control (Corn oil)	1	18.0	4	0.22	0.77 $\pm$ 0.40
	2	15.4	12	0.78	
	3	17.4	14	0.81	
	4	9.7	7	0.72	
	5	12.0	16	1.34	
DCP (100 mg/kg BW)	8	9.7	5	0.51	0.82 $\pm$ 0.20
	9	13.5	12	0.89	
	10	9.0	7	0.78	
	11	14.8	13	0.88	
	12	3.8	4	1.06	
DCP (200 mg/kg BW)	15	7.7	3	0.39	0.80 $\pm$ 0.48
	16	6.0	4	0.66	
	17	10.0	5	0.50	
	18	18.8	30	1.59	
	19	6.0	5	0.83	
DCM (250 mg/kg BW)	22	12.2	7	0.57	0.82 $\pm$ 0.37
	23	10.6	12	1.13	
	24	10.6	4	0.38	
	25	17.6	22	1.25	
	26	7.7	6	0.78	
DCM (500 mg/kg BW)	29	8.6	6	0.70	0.98 $\pm$ 0.49
	30	19.6	10	0.51	
	31	10.3	7	0.68	
	32	9.7	13	1.34	
	33	6.0	10	1.66	
DCP (100 mg/kg BW) + DCM (250 mg/kg BW)	36	10.1	3	0.30	0.85 $\pm$ 0.68
	37	7.8	10	1.28	
	38	12.6	3	0.24	
	39	10.7	17	1.59	
DCP (200 mg/kg BW) + DCM (500 mg/kg BW)	40	16.3	15	0.92	0.76 $\pm$ 0.33
	43	9.0	3	0.33	
	44	12.0	8	0.67	
	45	13.0	8	0.62	
	46	12.8	14	1.10	
	47	15.6	17	1.09	

Table VI Terminal body weight and liver weight of male p53-proficient and -deficient *gpt* delta mice treated with DCP and DCM for 4 weeks.

Genotype	Treatment	Terminal body weight (g)		Liver weight	
				Absolute (g)	Relative (g %)
p53-proficient	Control (Corn oil)	24.5 ± 1.3		1.1 ± 0.2	4.5 ± 0.4
	DCP	25.7 ± 1.5		1.3 ± 0.1	5.2 ± 0.3
	DCM	25.3 ± 1.5		1.2 ± 0.1	4.6 ± 0.1
	DCP + DCM	26.3 ± 1.7		1.5 ± 0.1**	5.6 ± 0.2*
p53-deficient	Control (Corn oil)	25.8 ± 2.1		1.1 ± 0.1	4.1 ± 0.4
	DCP	26.9 ± 1.1		1.4 ± 0.2###	5.2 ± 0.6#
	DCM	25.5 ± 1.6		1.0 ± 0.1	4.1 ± 0.5
	DCP + DCM	27.0 ± 1.4		1.3 ± 0.2	4.9 ± 0.9

\*\*\* P < 0.05 and P < 0.01 vs. control between p53-proficient samples (Tukey's test).

#,### P < 0.05 and P < 0.01 vs. control between p53-deficient samples (Tukey's test).

Table VII Blood chemistry study of male p53-proficient and -deficient *gpt* delta mice treated with DCP and DCM for 4 weeks.

Genotype	p53-proficient				p53-deficient				
	Treatment	Control (Corn oil)	DCP	DCM	DCP + DCM	Control (Corn oil)	DCP	DCM	DCP + DCM
TP (g/dL)		5.2 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.1 ± 0.3	4.7 ± 0.4	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.4	4.7 ± 0.4
Alb (g/dL)		3.5 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.0 ± 0.4	3.1 ± 0.1	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.3
A/G		2.1 ± 0.3	2.0 ± 0.1	2.6 ± 0.5	2.3 ± 0.2	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.1 ± 0.3
Glucose (mg/dL)		164 ± 37	166 ± 36	184 ± 22	169 ± 27	176 ± 61	186 ± 29	137 ± 28	199 ± 23
Bil (mg/dL)		0.09 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.14 ± 0.04###
T-Chol (mg/dL)		112 ± 11	119 ± 7	110 ± 5	109 ± 11	110 ± 18	116 ± 19	103 ± 22	109 ± 25
TG (mg/dL)		61 ± 55	75 ± 19	35 ± 5	109 ± 29	32 ± 21	59 ± 25	34 ± 32	76 ± 54
γGTP (IU/L)		>6	>6	>6	>6	>6	>6	>6	>6
AST (IU/L)		45 ± 9	66 ± 14	52 ± 17	66 ± 23	46 ± 11	39 ± 5	80 ± 88	103 ± 69
ALT (IU/L)		17 ± 3	23 ± 8	18 ± 2	41 ± 16	14 ± 5	18 ± 7	22 ± 22	33 ± 16
ALP (IU/L)		265 ± 21	227 ± 22	202 ± 57	215 ± 13	220 ± 55	214 ± 43	217 ± 47	203 ± 39
BUN (mg/dL)		25 ± 12	13 ± 2**	17 ± 2	17 ± 2	18 ± 3	14 ± 4	15 ± 2	16 ± 3
PL (mg/dL)		206 ± 24	225 ± 17	203 ± 14	229 ± 25	197 ± 29	222 ± 26	186 ± 37	201 ± 52
Ca (mg/dL)		9.5 ± 0.7	9.0 ± 0.3	9.5 ± 0.6	9.7 ± 0.3	8.8 ± 0.5	9.0 ± 0.1	9.0 ± 0.9	11.0 ± 2.8#
IP (mg/dL)		6.8 ± 0.6	6.0 ± 1.7	7.3 ± 0.9	6.8 ± 1.6	7.4 ± 0.6	6.1 ± 1.1	7.8 ± 1.0	7.1 ± 0.6
Na (mEQ/L)		157 ± 4	153 ± 2	156 ± 3	155 ± 1	155 ± 1	153 ± 1	157 ± 3	155 ± 2
K (mEQ/L)		4.6 ± 0.8	4.7 ± 0.3	4.0 ± 0.1	4.2 ± 0.4	4.1 ± 0.2	4.5 ± 0.3	4.3 ± 0.4	4.5 ± 0.7
Cl (mEQ/L)		103 ± 4	107 ± 2	104 ± 6	104 ± 6	108 ± 5	110 ± 1	103 ± 7	104 ± 8

Each value represents the mean ± SD. TP, total protein; Alb, albumin; Bil, bilirubin; T-Chol, total cholesterol; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; PL, phospholipids.

Significantly different from the p53-proficient control group at \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01, -deficient control group at #P < 0.05 and ###P < 0.01.

Table VIII Histopathological findings of male p53-proficient and -deficient *gpt* delta mice treated with DCP and DCM for 4 weeks.

Organ and findings	Genotype	p53-proficient				p53-deficient				
		Treatment	Control (Corn oil)	DCP	DCM	DCP + DCM	Control (Corn oil)	DCP	DCM	DCP + DCM
			No. of animals	4	4	4	5	8	6	7
Liver										
Glycogen deposition			0	4*	0	5*	0	6##	0	6##
Microgranuloma			4	2	4	4	8	6	6	7
Hydrophic degeneration			0	0	1	3	0	0	0	1
Focal necrosis			0	0	0	0	1	0	0	0
Single cell necrosis			0	0	0	0	0	0	0	1
Karyocytomegaly			0	0	0	0	0	4#	0	1
Malignant lymphoma			0	0	0	0	0	0	1	0

Significantly different from the p53-proficient control group at \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01, -deficient control group at #P < 0.05 and ##P < 0.01.

Table IX *gpt* MFs in the liver of male p53 KO *gpt* delta mice treated with 1,2-dichloropropane and dichloromethane for 4 weeks.

Genotype	Treatment	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies (x10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant Frequency (x10 <sup>-5</sup> )	Mean ± S.D.
p53 +/+	Control (Corn oil)	1	11.4	9	0.79	0.53 ± 0.18
		2	14.4	7	0.49	
		3	23.8	9	0.38	
		4	17.3	8	0.46	
		5	11.7	12	1.03	
	DCP (250 mg/kg bw)	6	11.7	12	1.03	0.85 ± 0.31
		7	20.1	17	0.85	
		8	17.0	7	0.41	
		9	15.6	17	1.09	
	DCM (500 mg/kg bw)	10	16.4	7	0.43	0.30 ± 0.11
		11	29.2	5	0.17	
		12	38.2	10	0.26	
		13	18.4	6	0.33	
	DCP (250 mg/kg bw) + DCM (500 mg/kg bw)	14	18.9	15	0.79	0.66 ± 0.53
		15	8.3	13	1.56	
		16	21.2	10	0.47	
		17	29.1	9	0.31	
		18	17.1	3	0.18	
p53 -/-	Control (Corn oil)	19	23.2	8	0.35	0.48 ± 0.29
		20	14.9	13	0.87	
		21	17.2	12	0.70	
		22	30.9	5	0.16	
		23	20.3	7	0.34	
	DCP (250 mg/kg bw)	28	29.7	9	0.30	0.59 ± 0.32
		29	8.6	9	1.05	
		31	16.3	7	0.43	
		32	6.3	5	0.79	
	DCM (500 mg/kg bw)	33	19.4	7	0.36	0.37 ± 0.18
		35	24.3	13	0.54	
		36	29.7	17	0.57	
		37	27.3	9	0.33	
	DCP (250 mg/kg bw) + DCM (500 mg/kg bw)	39	37.2	7	0.19	0.54 ± 0.45
		40	17.5	4	0.23	
		44	27.3	16	0.59	
		45	7.0	4	0.57	
		46	21.0	11	0.52	
DCM (500 mg/kg bw)	47	25.5	12	0.47	0.55	
	48	14.4	8	0.55		

Table X Spi- MFs in the liver of male p53 KO *gpt* delta mice treated with 1,2-dichloropropane and dichloromethane for 4 weeks.

Genotype	Treatment	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA ( $\times 10^5$ )	Plaques within WL95 (P2)	Mutant Frequency ( $\times 10^{-5}$ )	Mean $\pm$ S.D.	
p53 +/+	Control (Corn oil)	1	20.8	6	0.29	0.45 $\pm$ 0.25	
		2	43.7	14	0.32		
		3	15.8	13	0.82		
		5	44.8	17	0.38		
	DCP (250 mg/kg bw)	6	20.1	10	0.50	0.59 $\pm$ 0.10	
		7	31.7	16	0.51		
		8	29.5	19	0.64		
		9	17.1	12	0.70		
	DCM (500 mg/kg bw)	10	29.5	17	0.58	0.49 $\pm$ 0.09	
		11	30.4	11	0.36		
		12	60.8	30	0.49		
		13	29.7	16	0.54		
	DCP (250 mg/kg bw) +	14	22.5	9	0.40	0.52 $\pm$ 0.25	
		15	23.6	17	0.72		
		16	31.2	10	0.32		
		17	61.4	19	0.31		
	p53 -/-	DCM (500 mg/kg bw)	18	15.1	13	0.86	0.63 $\pm$ 0.25
			19	42.3	17	0.40	
20			20.5	21	1.02		
21			45.9	20	0.44		
Control (Corn oil)		22	49.4	26	0.53	0.52 $\pm$ 0.13	
		23	37.3	29	0.78		
		28	52.3	26	0.50		
		29	19.4	13	0.67		
DCP (250 mg/kg bw)		31	15.9	8	0.50	0.58 $\pm$ 0.10	
		32	30.8	19	0.62		
	33	15.4	5	0.32			
	35	35.7	23	0.64			
DCM (500 mg/kg bw)	36	27.9	13	0.47	0.43 $\pm$ 0.20		
	37	36.4	17	0.47			
	39	22.0	15	0.68			
	40	25.6	16	0.63			
DCP (250 mg/kg bw) +	44	39.2	15	0.38	0.43 $\pm$ 0.20		
	45	14.8	5	0.34			
	46	28.4	14	0.49			
	47	28.3	21	0.74			
p53 -/-	DCM (500 mg/kg bw)	48	24.4	5	0.21		