

Fischer 344 系ラットにおけるコリン欠乏およびコリン添加 アミノ酸食の長期投与による毒性と発癌性

奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室

安藤 信明

TOXICOLOGIC AND CARCINOGENIC EFFECTS OF A LONG-TERM ADMINISTRATION OF A CHOLINE-DEFICIENT, L-AMINO ACID-DEFINED DIET OR A CHOLINE-SUPPLEMENTED, L-AMINO ACID-DEFINED DIET IN FISCHER 344 RATS

NOBUAKI ANDOH

Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University

Received October 13, 2000

Abstract: The present study assessed toxicologic and carcinogenic effects of a long-term administration of semisynthetic, choline-deficient, L-amino acid-defined (CDAA) and choline-supplemented, L-amino acid-defined (CSAA) diets in Fischer 344 (F 344) rats. Male and female F 344 rats, 5 weeks old, were fed the CDAA or CSAA diet or a conventional laboratory chow, and sacrificed at the end of week 52 and by the end of week 104. All organs were excised on sacrifice and histologically examined. The following results were obtained.

1. Hepatocellular carcinomas (HCCs) were induced with high incidence in male rats fed the CDAA diet. HCC was induced in the background presence of fatty liver and cirrhosis, through a progression sequence starting from eosinophilic altered hepatocellular focus, then hepatocellular adenoma, and carcinoma-in-adenoma.
2. HCCs were also induced in female rats fed the CDAA diet with the lower incidence than in male case.
3. The CDAA diet suppressed the induction of testicular interstitial cell tumors and pituitary adenomas in males. Both of the CDAA and CSAA diets promoted the induction of mammary fibroadenomas in females.
4. The CDAA diet induced intestinal lacteal dilatations in both genders, and promoted the induction of nephropathies in both genders and nephrocalcinoses in males. Both of the CDAA and CSAA diets promoted the induction of pancreatic altered acinar cell foci plus acinar cell hyperplasias, forestomach squamous cell hyperplasias and thyroidal C-cell hyperplasias in both genders and nephrocalcinoses in females.

It is thus indicated that the CDAA diet is hepatocarcinogenic toward both of male and female F 344 rats and modifies the induction of various spontaneous lesions. In addition, the CSAA diet can also modify the induction of some spontaneous lesions. Assessments for the

detailed mechanisms underlying not only hepatocarcinogenesis but also modification of the induction of various other lesions are warranted in rats fed the CDA diet.

(奈医誌. J. Nara Med. Ass. 51, 508~525, 2000)

Key words : choline-deficient L-amino acid-defined diet, choline-supplemented L-amino acid-defined diet, hepatocarcinogenesis, spontaneous lesions, rats

緒 言

癌は、主として環境因子による genetic および epigenetic な変化の蓄積により、質的に異なる多段階の機構に基いて、発生・進展する¹⁻³⁾。さらに、近年、発癌の機構には、外因性因子のみならず種々の内因性因子の果す役割も重要であると指摘されている³⁻⁵⁾。しかしながら、適切な実験系に乏しいことより、内因性因子による発癌機構の詳細は、いまだ明らかでなく、実験系の開発およびその整備と特異的機構の解明が待望されている。ラットにおける食餌性コリン欠乏は、発癌物質を投与することなく肝細胞癌を発生せしめる系であることより、内因性発癌機構の解明に有用な実験系のひとつたり得る⁶⁾。

食餌性コリン欠乏による内因性肝発癌の研究は、インシュリン発見の過程における隣切除イヌを用いた研究にて、インシュリンを投与しても回復せず、レシチンを補給すると回復する脂肪肝の発生が観察されたことにはじまる⁷⁾。その後、食餌性レシチン欠乏はラットにも脂肪肝を誘発することが判明し⁸⁾、さらに、この現象はレシチンの成分であるコリンの欠乏に基くことが見出された⁹⁾。1980年代になり、ラットにおけるコリンを含む種々のメチル基供与体(抗脂肪肝因子)の食餌性欠乏は、脂肪肝・肝細胞の死と増殖・線維増生を背景に、前癌病変の発生・進展により肝細胞癌を誘発するものと判明した^{6,10-13)}。

当教室は、内因性発癌機構の解明を発癌分野における重要な研究課題のひとつと位置付け、ラットにおける食餌性コリン欠乏による内因性肝発癌の機構を詳細に解明し、肝発癌の制御を追究する目的で、従来より広く用いられている半精製コリン欠乏(CD)食のアミノ酸組成を分析し、蛋白質成分を純アミノ酸で置換することにより、CD食よりはるかにコリン含有量の低いコリン欠乏アミノ酸(CDAA)食を開発した^{6,14,15)}。CDAA食は、Fischer 344(F 344)系雌性ラットに投与すると、第1週より脂肪肝、第4週よりアポトーシスの組織学的特徴を示す肝細胞死と肝細胞増殖および線維増生、第12週までに境界型肝硬変、第32週までに完成型肝硬変を誘発する。肝における前癌病変は、第8週より組織学的に好酸性偏倚肝細

胞巣として観察される。以上の如きCDAA食による肝の変化は、CD食によるものと基本的に同様であるが、その変化はより強く、その経過はより早い⁶⁾。その結果、CDAA食は、52週の投与にて、肝細胞癌をCD食より高頻度に誘発する¹⁵⁾。さらに、CDAA食は、CD食に抵抗性を示すF 344系雌性ラットに対しても雄と同様の初期変化を誘発する¹⁶⁾。

本研究は、雌雄のF 344系ラットにCDAA食、コリン添加アミノ酸(CSAA)食および基礎食を長期投与し、ラットにおける全臓器の毒性と発癌性について、病理組織学的に比較検索し、食餌性コリン欠乏の生体に及ぼす影響を明らかにせんとした。

材料と方法

1. 動物および飼料

動物は、4週齢のF 344系ラット(日本チャールスリバー、滋賀)を雌雄各120匹購入し、基礎食のCRF-1食(オリエンタル酵母工業株式会社、東京)投与下に1週間の検疫馴化飼育を行った後、実験に使用した。ラットは、ステンレススチール製ワイヤーケージに2匹ずつ収容し、12時間周期照明(午前7時~午後7時点灯)、温度 24 ± 2 °C、相対湿度 55 ± 10 %、換気回数10~20回/時の環境条件下にて飼育した。飼料は、米国Dyets社より購入したCDAA食とCSAA食およびCRF-1食を用いた。飼料および飲料水は自由摂取せしめた。

2. 実験プロトコール

実験は、飼料を52週投与して屠殺する実験1(第1~6群)と、投与期間を104週として経過中の斃死例、切迫屠殺例を観察しつつ、生存例を終了時に屠殺する実験2(第7~12群)を行った。

(1) 実験1のプロトコール

実験は、ラットを雌雄それぞれ3群、計6群に分けて行った。第1群(10匹)は雄ラットにCDAA食を投与した群、第2群(10匹)は雄ラットにCSAA食を投与した群、第3群(20匹)は雄ラットにCRF-1食を投与した群、第4群(10匹)は雌ラットにCDAA食を投与した群、第5群(10匹)は雌ラットにCSAA食を投与した群、第6群(20匹)は雌ラットにCRF-1食を投与した群とした。

動物は、実験開始後 52 週にエーテル麻酔下にて腹部大動脈より採血し、屠殺解剖した。

(2) 実験 2 のプロトコール

実験は、ラットを雌雄それぞれ 3 群、計 6 群に分けて行った。第 7 群(20 匹)は雄ラットに CDAA 食を投与した群、第 8 群(20 匹)は雄ラットに CSAA 食を投与した群、第 9 群(40 匹)は雄ラットに CRF-1 食を投与した群、第 10 群(20 匹)は雌ラットに CDAA 食を投与した群、第 11 群(20 匹)は雌ラットに CSAA 食を投与した群、第 12 群(40 匹)は雌ラットに CRF-1 食を投与した群とした。動物は、実験期間中の斃死例を発見後可及的速やかに解剖し、衰弱例をエーテル麻酔下にて放血屠殺し解剖した。実験開始後 104 週における生存動物は、全例をエーテル麻酔下にて放血屠殺し、解剖した。

3. 検索事項

生死の状況は、切迫屠殺および斃死例の数を記録し、生存率の推移・最終生存率・平均生存日数を算出し、死因を検索した。

体重は、実験 1 において、実験終了時に測定し、実験 2 において、実験開始後 12 週まで毎週、その後隔週に測定した。

摂餌量と摂水量は、実験 2 において、実験開始後 12 週までは毎週、その後隔週に測定した。

臓器重量は、実験 1 において、解剖時に、脳・下垂体・唾液腺・心・肺・肝・腎・脾・副腎に加え、雄では精巣および前立腺、雌では卵巣および子宮の湿重量を測定した。

血液・血清学的検索は、実験 1 において、解剖時に採取した血液を用いて行った。血液は一部を EDTA 処理し、多項目自動血球計数装置(E-4000, 東亜医用電子株式会社, 兵庫)にて、白血球数・赤血球数・ヘモグロビン濃度・ヘマトクリット値・平均赤血球容積・平均赤血球ヘモグロビン量・血小板数を測定した。残りの血液は、血清を調製し、自動分析装置(AU 550, オリンパス光学工業株式会社, 東京)および自動電気泳動装置(AES 300, オリンパス光学工業株式会社, 東京)にて、総蛋白濃度・アルブミン濃度・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性・アラニンアミノトランスフェラーゼ活性・アルカリ性ホスファターゼ活性・ γ -グルタミルトランスフェラーゼ活性・ビリルビン濃度・胆汁酸濃度・コレステロール濃度・リン脂質濃度・トリグリセリド濃度を測定した。

組織学的検索は、実験 1 および実験 2 共に、解剖時に皮膚・乳腺・リンパ節(頸部・腸間膜)・唾液腺・大腿骨(骨髓を含む)・胸腺・気管・肺・気管支・心・甲状腺・上皮小体・舌・食道・胃・小腸(十二指腸・空腸・回腸)

・大腸(盲腸・結腸・直腸)・肝・脾・副腎・膀胱・脳(大脳・小脳・延髄)・下垂体・脊髄・胸部大動脈・眼球・ハーダー腺・精巣・前立腺・精囊・卵巣・子宮・膈および腫瘍を含む肉眼的病変部を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンに固定し、パラフィン包埋後に厚さ 4 μ m の切片を作製し、常法によりヘマトキシリン・エオジン(H・E)染色を施し、光学顕微鏡による観察を行った。さらに実験 1 においては、肝の一部の標本について連続切片を作製し、胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST-P)免疫組織化学的染色を実施した¹⁷⁾。H・E 染色標本を用いた組織学的検索結果は、腫瘍性病変については、全動物に対する病変保有動物数の百分率を発生頻度として算出することにより評価した。肝における偏倚肝細胞巣・脾における変異腺房細胞結節性病変と種々の臓器における過形成病変は、数および大きさを計測し、それらの程度により、なし(-)・軽度(1+)・中等度(2+)・高度(3+)に判定した。数または大きさの計測不能なびまん性病変は、その病変の程度に応じて、なし(-)・軽度(1+)・中等度(2+)・高度(3+)に判定した。以上の判定基準に基き、それぞれの病変について、0・1・2・3 点の評価を与えて数値化した。

4. 統計学的解析

上記の検索により得られた結果は、パーソナルコンピュータにて、InStat(米国 GraphPad 社)をソフトウェアとして用いて、統計学的に解析した。各群間の生存率および腫瘍性病変発生頻度は、Fisher の直接確率法にて解析したが、群間の生存率の大きく異なる場合の腫瘍性病変発生頻度は、Peto の検定にて解析した。それ以外の検索項目は、one-way ANOVA の後、Student-Newman-Keuls 群間検定にて解析した。統計学的有意差は、p 値が 0.05 未満の場合に陽性と判定した。

結 果

1. 実験 1 および 2 の詳細

実験 1 の動物は、屠殺時点まで全例生存した。最終体重および相対臓器重量は、Table 1 に示す。雄の最終体重は、CDAA 食群が他群より低値で、CSAA 食群が CRF-1 食群より高値であった。雌の最終体重は、CDAA 食群が他群より高値で、CSAA 食群が CRF-1 食群より高値であった。雄の最終体重は、同一飼料条件ごとと比較すると、雌より高値を示した。脳重量は、CDAA 食群の雄が他群より高値、雌が低値で、同一飼料投与条件下では雄が雌より低値であった。肺重量は、雌雄共に CDAA 食および CSAA 食群が CRF-1 食群より低値で、同一飼料条件下では雄が雌より低値であった。肝重量は、雌雄共

Table 1. Body and relative organ weights at the end of week 52 (experiment 1).

Body (g) or relative organ (g/100g body weight) weight	Group 1 (male/CDA)	Group 2 (male/CSAA)	Group 3 (male/CRF-1)	Group 4 (female/CDA)	Group 5 (female/CSAA)	Group 6 (female/CRF-1)
Body	400±34 ^{a,b,c,d}	498±35 ^{c,d}	442±22 ^d	306±18 ^{b,c,d}	269±29 ^{c,d}	227±14 ^d
Brain	0.56±0.05 ^{b,c,d}	0.49±0.03 ^d	0.51±0.03 ^d	0.67±0.05 ^{b,c,d}	0.87±0.08 ^d	0.89±0.06 ^d
Pituitary gland	0.003±0.001	0.002±0.002	0.002±0.002	0.004±0.001	0.005±0.003	0.006±0.003
Salivary gland	0.15±0.05	0.13±0.03	0.13±0.02	0.14±0.03	0.16±0.02	0.17±0.06
Heart	0.23±0.02 ^d	0.23±0.01 ^d	0.25±0.01 ^d	0.28±0.02 ^d	0.27±0.02 ^d	0.31±0.01 ^d
Lung	0.23±0.02 ^{c,d}	0.23±0.01 ^{c,d}	0.26±0.01 ^d	0.28±0.02 ^{c,d}	0.29±0.03 ^{c,d}	0.35±0.02 ^d
Liver	3.89±0.13 ^{b,c,d}	2.62±0.31	2.63±0.13	3.15±0.22 ^{b,c,d}	2.45±0.28	2.52±0.13
Spleen	0.35±0.03 ^{b,c,d}	0.15±0.01 ^d	0.17±0.01 ^d	0.20±0.02 ^d	0.18±0.03 ^d	0.20±0.01 ^d
Kidneys	0.67±0.04 ^{b,c,d}	0.50±0.02 ^d	0.52±0.03 ^d	0.59±0.03 ^{c,d}	0.61±0.04 ^{c,d}	0.71±0.04 ^d
Adrenals	0.010±0.001 ^d	0.010±0.001 ^d	0.011±0.001 ^d	0.017±0.002 ^d	0.018±0.002 ^d	0.020±0.002 ^d
Testes	0.68±0.06	0.62±0.06	0.71±0.04	—	—	—
Prostate	0.05±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01	—	—	—
Uterus	—	—	—	0.22±0.07	0.25±0.04	0.25±0.03
Ovaries	—	—	—	0.019±0.002	0.019±0.002	0.022±0.003

^aMeans±standard deviations of the data obtained from 10 (groups 1, 2, 4 and 5) or 20 (groups 3 and 6) rats.

^bSignificantly different from the group 2 (in male case) or 5 (in female case) value by Student-Newman-Keuls test.

^cSignificantly different from the group 3 (in male case) or 6 (in female case) value by Student-Newman-Keuls test.

^dSignificantly different from the value of the other gender by Student-Newman-Keuls test.

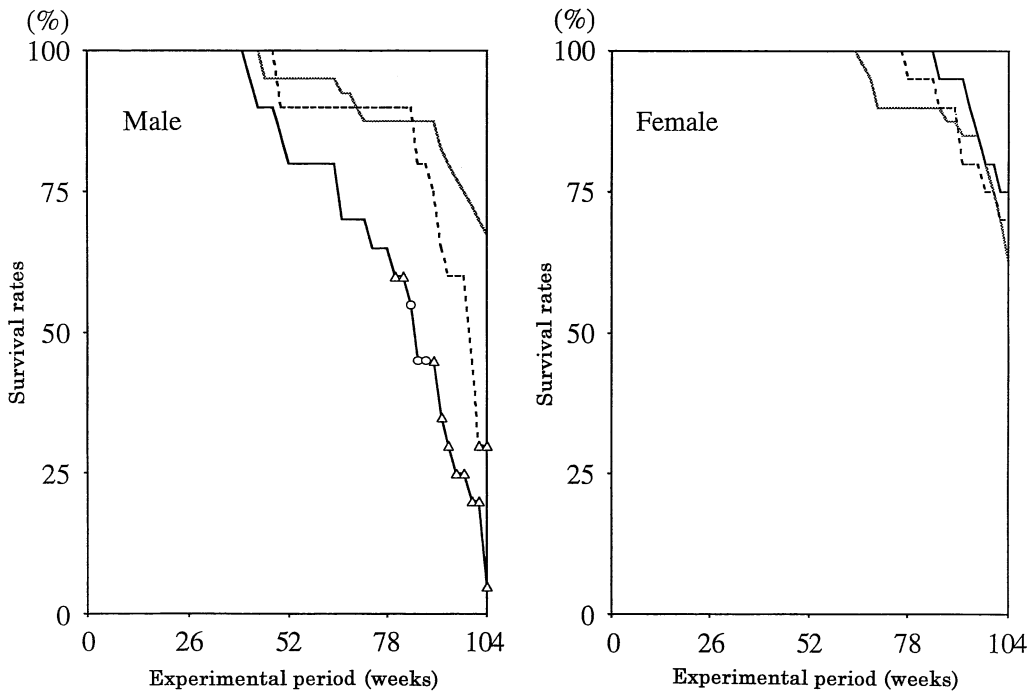


Fig. 1. Changes of surviving rates for 104 weeks (experiment 2).

Solid lines are generated from the data groups 7 (male) and 10 (female) in which the CDA diet was administered. Broken lines are generated from the data of groups 8 (male) and 11 (female) in which the CSAA diet was administered. Dotted lines are generated from the data of groups 9 (male) and 12 (female) in which the CRF-1 diet was administered. Circle represents the significant difference from the values of groups 8 and 9 at each time-point. Triangle represents the significant difference from the value of group 9 at each time-point.

に CDAA 食群が他群より高値で、同一飼料投与条件ごとに雌雄を比較すると、CDAA 食群のみにて雄が雌より高値であった。脾重量は、雄のみで CDAA 食群が他群より高値で、同一飼料条件下では雄が雌より低値であった。腎重量は、雄にて CDAA 食群が他群より高値で、雌にて CDAA 食および CSAA 食群が CRF-1 食群より低値で

あり、同一飼料条件ごとに雌雄を比較すると、CDAA 食群では雄が、他群では雌が、それぞれ高値であった。

実験 2 の生存率の推移は Fig. 1 に示し、最終生存率・平均生存日数・死因は Table 2 に示す。雄の CDAA 食群は、3 匹が実験開始後 44 週後に死亡し、実験開始後 52 週を越えると死亡例が急激に増加し、実験開始後 104 週

Table 2. Death and survival of rats by the end of week 104 (experiment 2).

Item	Group 7 (male/CDAA)	Group 8 (male/CSAA)	Group 9 (male/CRF-1)	Group 10 (female/CDAA)	Group 11 (female/CSAA)	Group 12 (female/CRF-1)
Initial number of rats	20	20	40	20	20	40
Numbers of deaths before the end of week 104						
Found in death	8	1	4	0	0	3
Moribund	11	13	9	5	6	12
Total	19	14	13	5	6	15
Numbers of survivals at the end of week 104	1	6	27	15	14	25
Final survival rates (%)	5 ^{b,c}	30 ^{b,d}	68	75	70	63
Average survival periods (days, mean±standard deviation)	567±146 ^{a,b,c}	654±114	681±105	710±38	702±51	694±77
Numbers of primary causes of deaths						
Hepatocellular carcinoma	14	0	0	0	0	0
Liver histiocytic sarcoma	0	0	1	0	0	0
Tongue squamous cell carcinoma	0	0	0	0	1	0
Small intestine adenocarcinoma	0	1	1	0	0	0
Lung adenoma	0	1	0	0	0	0
Lung adenocarcinoma	0	1	1	0	0	0
Nephropathy	0	0	0	1	0	0
Uterus endometrial stromal polyp	—	—	—	1	1	0
Clitoral gland adenocarcinoma	—	—	—	0	1	0
Mammary gland fibroadenoma	0	0	1	1	1	0
Pituitary gland adenoma	0	1	1	0	1	4
Pituitary gland adenocarcinoma	0	0	0	0	2	1
Thyroid gland follicular cell adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0
Adrenal gland malignant pheochromocytoma	1	0	0	0	0	0
Brain oligodendroglioma	0	0	1	0	0	0
Brain astrocytoma	0	2	0	0	0	0
Spinal cord astrocytoma	0	0	0	0	0	1
Chordoma	0	1	0	0	0	0
Radiculoneuropathy	0	1	0	0	0	1
Spleen histiocytic sarcoma	0	0	1	0	0	0
Large granular lymphocyte leukemia	3	1	3	1	0	3
Myelogenous leukemia	1	0	0	0	0	0
Bone marrow histiocytic sarcoma	0	1	0	0	0	0
Skin sebaceous gland adenocarcinoma	0	0	0	1	0	0
Subcutaneous fibroma	0	3	1	0	0	0
Subcutaneous hemangiosarcoma	0	0	0	0	0	1
Subcutaneous hemangiopericytoma	0	0	0	0	0	1
Zymbal's gland adenocarcinoma	0	0	1	0	0	0
Osteosclerosis	0	0	0	0	0	1
Abdominal cavity mesothelioma	0	0	1	0	0	0

^aSignificantly different from the group 8 value by Student-Newman-Keuls test.

^bSignificantly different from the group 9 value by Student-Newman-Keuls test or Fisher's exact test.

^cSignificantly different from the group 10 value by Student-Newman-Keuls test or Fisher's exact test.

^dSignificantly different from the group 11 value by Fisher's exact test.

においては1匹のみが生存した。最終生存率は5%，平均生存日数は567日で，死因の70%は肝細胞癌であった。雄のCSAA食およびCRF-1食群は，実験開始後78週前後より死亡例が増加し，実験開始後104週においてはそれぞれ6および27例が生存した。それぞれの最終生存率は30および68%，平均生存日数は654および681日で，死因に特定の傾向を認めなかった。一方，雌は，CDAA食・CSAA食・CRF-1食群において，実験開始後それぞれ80・78・70週より死亡例が観察されはじめた。CDAA食・CSAA食・CRF-1食群それぞれの最終生存率は75・70・63%で，平均生存日数は710・702・694日であり，死因に特定の傾向を認めなかった。Fig. 2は，以上の如き生存率の推移を前提とした各群の体重の推移を示す。雄の体重は，ほぼ全期間を通じてCDAA食群が他

群より低値を示し，実験開始後24週以後の期間にCSAA食群がCRF-1食群より高値を示した。これらの雄の各群の体重は比較の後期に至るまで増加したが，CDAA食およびCSAA食群の体重は実験開始後78週より低下し，CRF-1食群は同時期より増加が停止した。一方，雌の体重は，各群共に全期間を通じて増加し，CDAA食群が他群より，CSAA食群がCRF-1食群より，それぞれ高値を示した。また，雄は，いずれの飼料投与条件下においても，CDAA食群の92週以降を除く全期間を通じて，雌より高値を示した。なお，摂餌量および摂水量は，雌雄共，群間に差を認めず，全期間を通じて雄が雌より高値を示した。

2. 実験1の血液・血清学的および組織学的所見

血液・血清学的検索結果は，Table 3に示す。白血球

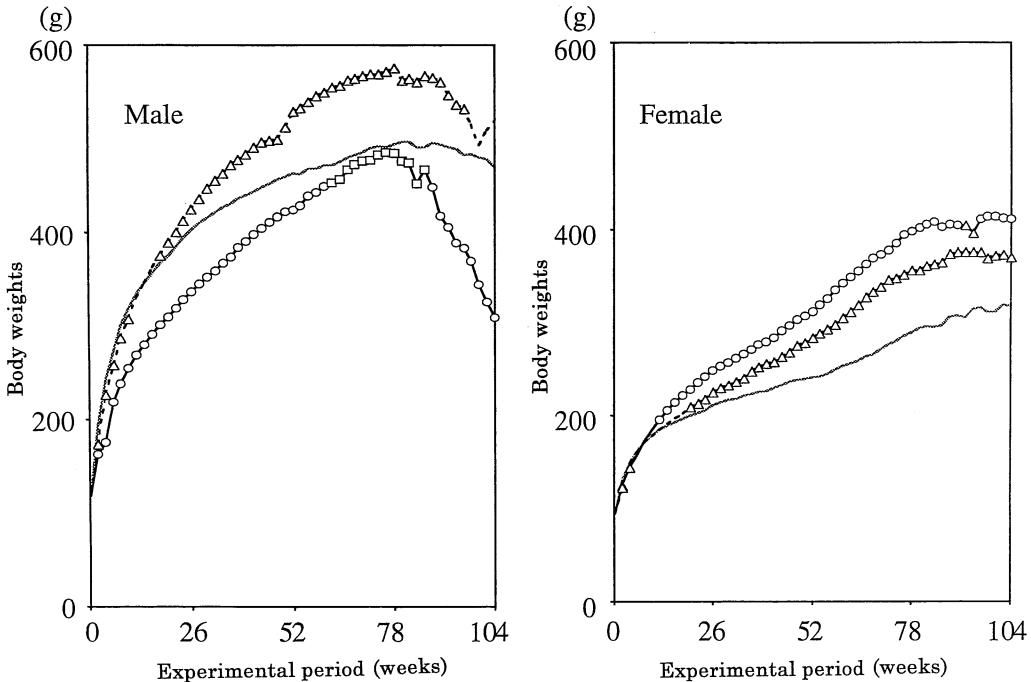


Fig. 2. Changes of body weights for 104 weeks (experiment 2).

Solid lines are generated from the data of groups 7 (male) and 10 (female) in which the CDAA diet was administered. Broken lines are generated from the data of groups 8 (male) and 11 (female) in which the CSAA diet administered. Dotted lines are generated from the data of groups 9 (male) and 12 (female) in which the CRF-1 diet was administered. Circle represents the significant difference from the values of groups 8 and 9 or 11 and 12 in the male or female case, respectively, at each time-point. Square represents the significant difference from the value of group 8 at each time-point. Triangle represents the significant difference from the value of group 9 or 12 in the male or female case, respectively, at each time-point.

Table 3. Alteration of hematogram and serum biochemistry by dietary regimen at the end of week 52 (experiment 1).

Item	Group 1 (male/CDAA)	Group 2 (male/CSAA)	Group 3 (male/CRF-1)	Group 4 (female/CDAA)	Group 5 (female/CSAA)	Group 6 (female/CRF-1)
Number of leucocytes ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	51 \pm 11 ^{a,d}	47 \pm 9 ^d	44 \pm 9 ^d	36 \pm 9 ^d	29 \pm 8 ^d	24 \pm 7 ^d
Number of erythrocytes ($\times 10^4/\text{ml}$)	989 \pm 26 ^d	953 \pm 24 ^d	982 \pm 36 ^d	936 \pm 29 ^d	918 \pm 26 ^d	919 \pm 27 ^d
Hemoglobin concentration (mg/ml)	145 \pm 3 ^{b,c}	156 \pm 4	156 \pm 6	150 \pm 4 ^{b,c}	159 \pm 3	160 \pm 5
Hematocrit value (%)	47.0 \pm 1.6 ^{b,c}	48.4 \pm 1.4	48.9 \pm 1.8	47.9 \pm 1.3	49.0 \pm 1.1	49.5 \pm 1.6
Average erythrocyte volume (fl)	47.5 \pm 1.2 ^{b,c,d}	50.8 \pm 0.8 ^d	49.8 \pm 1.3 ^d	51.2 \pm 0.8 ^{b,c,d}	53.5 \pm 1.0 ^d	53.9 \pm 1.4 ^d
Average hemoglobin amount per erythrocyte (pg)	14.6 \pm 0.3 ^{b,c,d}	16.3 \pm 0.3 ^d	15.9 \pm 0.4 ^d	16.0 \pm 0.3 ^{b,c,d}	17.3 \pm 0.4 ^d	17.4 \pm 0.4 ^d
Number of platelets ($\times 10^4/\text{ml}$)	56 \pm 6 ^{b,c,d}	70 \pm 4 ^d	73 \pm 5 ^d	62 \pm 3 ^d	64 \pm 3 ^d	66 \pm 4 ^d
Protein concentration (mg/ml)	66.9 \pm 2.1 ^{b,c,d}	71.2 \pm 2.8 ^d	68.0 \pm 2.4 ^d	76.2 \pm 3.4 ^d	75.5 \pm 2.5 ^d	76.1 \pm 3.2 ^d
Albumin concentration (mg/ml)	34.9 \pm 0.1 ^d	36.4 \pm 0.1 ^d	34.3 \pm 0.2 ^d	44.8 \pm 0.3 ^d	45.4 \pm 0.3 ^d	44.5 \pm 0.3 ^d
Aspartate aminotransferase activity (U/l)	154 \pm 24 ^{b,c,d}	43 \pm 3	57 \pm 24	91 \pm 19 ^{b,c,d}	53 \pm 19	50 \pm 32
Alanine aminotransferase activity (U/l)	86 \pm 17 ^{b,c,d}	22 \pm 5	20 \pm 16	41 \pm 16 ^{b,c,d}	22 \pm 11	20 \pm 18
Alkaline phosphatase activity (U/l)	23 \pm 4 ^{b,c,d}	10 \pm 1	10 \pm 2	7 \pm 1 ^d	6 \pm 1	8 \pm 1
γ -Glutamyltransferase activity (U/l)	8.1 \pm 1.3 ^{b,c,d}	2.5 \pm 0.2	3.8 \pm 1.1	2.0 \pm 0.7 ^d	2.5 \pm 0.2	3.0 \pm 1.2
Bilirubin concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.7 \pm 0.2 ^{b,c,d}	1.4 \pm 0.3	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2 ^d	1.2 \pm 0.1	1.4 \pm 0.2
Bile acid concentration (nmol/ml)	30 \pm 15 ^{b,c,d}	11 \pm 2	12 \pm 10	14 \pm 3 ^d	16 \pm 2	14 \pm 18
Cholesterol concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	453 \pm 127 ^{b,c}	1196 \pm 175	1076 \pm 78	678 \pm 61 ^{b,c}	1074 \pm 85	1084 \pm 100
Phospholipid concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1016 \pm 147 ^{b,c,d}	2255 \pm 453	2387 \pm 353	1843 \pm 243 ^{b,c,d}	2410 \pm 258	2443 \pm 212
Triglyceride concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	314 \pm 50 ^{b,c,d}	2841 \pm 876 ^d	2736 \pm 511 ^d	656 \pm 114 ^{b,c,d}	1119 \pm 408 ^d	1182 \pm 415 ^d

^aMeans \pm standard deviations of the data obtained from 10 (groups 1, 2, 4 and 5) or 20 (groups 3 and 6) rats.

^bSignificantly different from the group 2 (in male case) or 5 (in female case) value by Student-Newman-Keuls test.

^cSignificantly different from the group 3 (in male case) or 6 (in female case) value by Student-Newman-Keuls test.

^dSignificantly different from the value of the other gender by Student-Newman-Keuls test.

または赤血球の数は飼料による差を示さなかったが、雌雄のヘモグロビン濃度・平均赤血球容積・平均赤血球ヘモグロビン量と雌のヘマトクリット値は、CDAA 食群が他群より低値であった。さらに、雄の血小板数・血清蛋白濃度は CDAA 食群が他群より低値で、血清における雌雄のアスパラギン酸およびアラニンアミノトランスフェラーゼ活性と、雄のアルカリ性ホスファターゼおよび γ -グルタミルトランスフェラーゼの活性ならびにビリルビンおよび胆汁酸の濃度は、CDAA 食群が他群より高値であった。血清脂質は、検索した 3 種のいずれにおいても、雌雄共に、CDAA 食群が他群より低値を示した。以上の各指標に関し、同一飼料条件ごとに雌雄を比較すると、平均赤血球容積・平均赤血球ヘモグロビン量・血清蛋白濃度・血清アルブミン濃度は雄が雌より低値を示し、血小板数は雄が雌より高値であった。組織学的検索の結果は、雄について Table 4、雌について Table 5 に示す。肝において観察された病変は、脂肪肝・線維増生・偏倚肝細胞巣・肝細胞腺腫および肝細胞癌であった。脂肪肝は、CDAA 食または CSAA 食群のみにて観察され、雌雄共に CDAA 食群が CSAA 食群より高度であった。線維増生は、CDAA 食群のみにて観察され、雄では

10 匹中 9 匹が grade 3+ の完成型肝硬変に達していたのに対し、雌では 10 匹中 9 匹が grade 1+ で肝硬変に達していなかった。偏倚肝細胞巣は、CDAA 食群のみにて観察され、雄ではほぼ全てが好酸性型であったのに対し、雌では小型の好塩基性型と大型の好酸性型のものがみられ、数および大きさを指標として比較すると、雄が雌より高度であった。また、好酸性型肝細胞巣は GST-P 陽性の表現型を示し (Fig. 3A)、好塩基性型は陰性であった。肝細胞腺腫 (Fig. 3B) および肝細胞癌は、雄の CDAA 食群のみにて、それぞれ 40 および 30 % の頻度で観察された。肝細胞腺腫の一部は、内部に悪性度の進展による腺腫内癌 (Figs. 3B and 3C) を認めた。膵は、腺房細胞小増殖巣を観察したが、群間に差がなかった。前胃は、雌雄共に、CDAA 食または CSAA 食群のみにて扁平上皮過形成の発生を認めた。小腸は、雌雄共に、CDAA 食群のみにて乳び管拡張 (Fig. 3D) を認めたが、雄では 6 例に観察したのに対し、雌での発生は 1 例にとどまった。腎は、雌の CSAA 食群以外にて慢性腎症、雄の CRF-1 食群以外にて石灰化を認め、いずれも雌雄共に CDAA 食群が他群より高度であった (Fig. 3E)。精巣は、雄の CSAA 食および CRF-1 食群の全例で間細胞過形成を観

Table 4. Alteration of histological findings by dietary regimen in male rats at the end of week 52 (experiment 1).

Organ	Lesion	Group 1 (male/CDA)					Group 2 (male/CSAA)					Group 3 (male/CRF-1)				
		- ^a	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	Grade or incidence ^b	-	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	Grade or incidence	-	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	Grade or incidence
Liver	Fatty liver	0 ^c	1	9	0	1.90±0.32 ^{d,e}	2	8	0	0	0.80±0.42 ^e	20	0	0	0	0
	Fibrosis	0	0	1	9	2.90±0.32 ^{d,e,f}	10	0	0	0	0	20	0	0	0	0
	Altered hepatocellular focus	0	0	1	9	2.90±0.32 ^{d,e,f}	10	0	0	0	0	20	0	0	0	0
	Hepatocellular adenoma	6	4	—	—	40% ^{d,e,f}	10	0	—	—	0%	20	0	—	—	0%
	Hepatocellular carcinoma	7	3	—	—	30% ^{d,e,f}	10	0	—	—	0%	20	0	—	—	0%
Pancreas	Altered acinar cell focus	7	2	1	0	0.40±0.70	6	3	0	1	0.60±0.97	17	3	0	0	0.15±0.37
Forestomach	Squamous cell hyperplasia	0	9	1	0	1.10±0.32 ^e	0	9	1	0	1.10±0.32 ^e	20	0	0	0	0
Small intestine	Lacteal dilatation	4	6	0	0	0.60±0.52 ^{d,e,f}	9	0	0	0	0	20	0	0	0	0
Kidney	Nephropathy	0	1	7	2	2.10±0.57 ^{d,e}	6	4	0	0	0.40±0.52	12	6	2	0	0.50±0.69
	Nephrocalcinosis	1	6	3	0	1.20±0.63 ^{d,e}	9	1	0	0	0.10±0.32 ^f	20	0	0	0	0 ^f
Testis	Interstitial cell hyperplasia	10	0	0	0	0 ^{d,e}	0	5	2	3	1.80±0.92	0	10	10	0	1.50±0.51
	Interstitial cell tumor	10	0	—	—	0%	10	0	—	—	0%	19	1	—	—	5%
Pituitary gland	Hyperplasia	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	19	1	0	0	0.05±0.22
	Adenoma	9	1	—	—	10%	10	0	—	—	0%	20	0	—	—	0%
Thyroid gland	C-cell hyperplasia	0	2	8	0	1.80±0.42 ^e	0	1	9	0	1.90±0.32 ^e	15	5	0	0	0.25±0.44
Body cavity	Mesothelioma	10	0	—	—	0%	10	0	—	—	0%	19	1	—	—	5%

^aFor the grading ; —, negative ; 1⁺, mild ; 2⁺, moderate ; 3⁺, severe ; and for the incidence ; —, absence ; 1⁺, presence.

^bValues are presented as means±standard deviations of points (—, 0 ; 1⁺, 1 ; 2⁺, 2 ; 3⁺, 3) for the grading or percentages for the incidence of lesions.

^cNumber of rats.

^dSignificantly different from the group 2 value by Student-Newman-Keuls test or Fisher's exact test.

^eSignificantly different from the group 3 value by Student-Newman-Keuls test or Fisher's exact test.

^fSignificantly different from the female value by Student-Newman-Keuls test or Fisher's exact test (refer Table 5).

Table 5. Alteration of histological findings by dietary regimen in female rats at the end of week 52 (experiment 1).

Organ	Lesion	Group 4 (female/CDA)					Group 5 (female/CSAA)					Group 6 (female/CRF-1)				
		- ^a	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	Grade or incidence ^b	-	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	Grade or incidence	-	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	Grade or incidence
Liver	Fatty liver	0	1	9	0	1.90±0.32 ^{d,e}	8	2	0	0	0.20±0.42	20	0	0	0	0
	Fibrosis	0	9	1	0	1.10±0.32 ^{d,e,f}	10	0	0	0	0	20	0	0	0	0
	Altered hepatocellular focus	0	1	9	0	1.90±0.32 ^{d,e,f}	10	0	0	0	0	20	0	0	0	0
	Hepatocellular adenoma	10	0	—	—	0% ^f	10	0	—	—	0%	20	0	—	—	0%
	Hepatocellular carcinoma	10	0	—	—	0% ^f	10	0	—	—	0%	20	0	—	—	0%
	Cholangiofibrosis	9	0	0	1	0.30±0.95	10	0	0	0	0	20	0	0	0	0
Pancreas	Altered acinar cell focus	9	1	0	0	0.10±0.32	9	1	0	0	0.10±0.32	20	0	0	0	0
Forestomach	Squamous cell hyperplasia	0	9	1	0	1.10±0.32 ^e	0	9	1	0	1.10±0.32 ^e	20	0	0	0	0
Small intestine	Lacteal dilatation	9	1	0	0	0.10±0.32 ^f	10	0	0	0	0	20	0	0	0	0
Kidney	Nephropathy	2	2	6	0	1.40±0.84 ^{d,e}	10	0	0	0	0	18	2	0	0	0.10±0.31
	Nephrocalcinosis	0	1	9	0	1.90±0.32 ^{d,e}	0	9	1	0	1.10±0.32 ^{e,f}	13	7	0	0	0.35±0.49 ^f
Uterus	Endometrial stromal polyp	8	2	—	—	20%	10	0	—	—	0%	19	1	—	—	5%
Clitoral gland	Adenocarcinoma	10	0	—	—	0%	10	0	—	—	0%	19	1	—	—	5%
	Hyperplasia	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	18	2	0	0	0.10±0.31
Pituitary gland	Adenoma	10	0	—	—	0%	10	0	—	—	0%	19	1	—	—	5%
	C-cell hyperplasia	0	1	9	0	1.90±0.32 ^e	0	5	5	0	1.50±0.53 ^e	20	0	0	0	0

^aFor the grading ; —, negative ; 1⁺, mild ; 2⁺, moderate ; 3⁺, severe ; and for the incidence ; —, absence ; 1⁺, presence.

^bValues are presented as means±standard deviations of points (—, 0 ; 1⁺, 1 ; 2⁺, 2 ; 3⁺, 3) for the grading or percentages for the incidence of lesions.

^cNumber of rats.

^dSignificantly different from the group 5 value by Student-Newman-Keuls test or Fisher's exact test.

^eSignificantly different from the group 6 value by Student-Newman-Keuls test or Fisher's exact test.

^fSignificantly different from the male value by Student-Newman-Keuls test or Fisher's exact test (refer Table 4).

察したのに対し、CDAA 食群ではその発生を認めなかった。甲状腺は、C細胞過形成が、雌雄共に、CDAA 食およびCSAA 食群にてCRF-1 食群より高度に観察された。

3. 実験2の組織学的所見

組織学的検索の結果は、飼料投与条件による影響の観察された病変について、雄を Table 6, 雌を Table 7 に示し、影響の観察されなかった病変について Table 8 に

Table 6. Alteration of histological findings by dietary regimen in male rats by the end of week 104 (experiment 2).

Organ	Lesion	Group 7 (male/CDAA)				Group 8 (male/CSAA)				Group 9 (male/CRF-1)						
		— ^a	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	Grade or incidence ^b	—	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	Grade or incidence	—	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	Grade or incidence
Liver	Fatty liver	8 ^d	5	2	5	1.20±1.24 ^f	5	9	4	2	1.15±0.93 ^f	37	3	0	0	0.08±0.27
	Fibrosis	7	0	0	13	1.95±1.47 ^{e,f,g}	20	0	0	0	0	40	0	0	0	0
	Hepatocellular carcinoma ^c	1	19	—	—	95% ^{e,f,g}	20	0	—	—	0%	40	0	—	—	0%
Pancreas	Altered focus plus hyperplasia of acinar cell	10	3	6	1	0.60±1.02 ^f	12	1	4	3	0.90±1.21 ^f	37	0	2	1	0.18±0.64
Forestomach	Squamous cell hyperplasia	0	4	10	6	2.10±0.72 ^f	0	6	12	2	1.80±0.62 ^f	40	0	0	0	0
Kidney	Nephropathy	2	0	6	12	2.40±0.94 ^{e,f}	10	2	4	4	1.10±1.25	14	1	17	8	1.48±1.18
	Nephrocalcinosis	12	8	0	0	0.40±0.51 ^{e,f,g}	20	0	0	0	0 ^g	40	0	0	0	0 ^g
Testis	Interstitial cell tumor	19	1	—	—	5% ^{e,f}	4	16	—	—	80%	3	37	—	—	92.5%
Mammary gland	Fibroadenoma	20	0	—	—	0% ^g	20	0	—	—	0% ^g	37	3	—	—	7.5%
Pituitary gland	Adenoma	18	2	—	—	10% ^{e,f}	11	9	—	—	45%	28	12	—	—	30%
Thyroid gland	C-cell hyperplasia	7	0	2	11	1.85±1.42 ^f	3	2	4	11	2.15±1.14 ^f	33	7	0	0	0.18±0.38

^aFor the grading ; —, negative ; 1⁺, mild ; 2⁺, moderate ; 3⁺, severe ; and for the incidence ; —, absence ; 1⁺, presence.

^bValues are presented as means±standard deviations of points (—, 0 ; 1⁺, 1 ; 2⁺, 2 ; 3⁺, 3) for the grading or percentages for the incidence of lesions.

^cMetastases were found in the lung (68% incidence), peripheral lymph node (21% incidence), kidney (16% incidence), pancreas (5% incidence), stomach (5% incidence), epididymis (5% incidence), eye (5% incidence) and peritoneal cavity (5% incidence, dissemination) in group 7.

^dNumber of rats.

^eSignificantly different from the group 8 value by Student-Newman-Keuls test, Fisher's exact test or Peto's test.

^fSignificantly different from the group 9 value by Student-Newman-Keuls test, Fisher's exact test or Peto's test.

^gSignificantly different from the female value by Student-Newman-Keuls test or Fisher's exact test (refer Table 7).

Table 7. Alteration of histological findings by dietary regimen in female rats by the end of week 104 (experiment 2).

Organ	Lesion	Group 10 (female/CDAA)				Group 11 (female/CSAA)				Group 12 (female/CRF-1)						
		— ^a	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	Grade or incidence ^b	—	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	Grade or incidence	—	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	Grade or incidence
Liver	Fatty liver	2 ^d	5	12	1	1.60±0.75 ^f	3	7	8	2	1.45±0.89 ^f	37	1	2	0	0.13±0.46
	Fibrosis	18	0	2	0	0.20±0.61 ^{e,f,g}	10	0	0	0	0	40	0	0	0	0
	Hepatocellular carcinoma ^c	14	6	—	—	30% ^{e,f,g}	20	0	—	—	0%	40	0	—	—	0%
Pancreas	Altered focus plus hyperplasia of acinar cell	7	1	6	6	1.55±1.28 ^f	7	4	6	3	1.25±1.12 ^f	32	6	2	0	0.25±0.54
Forestomach	Squamous cell hyperplasia	0	4	14	2	1.90±0.55 ^f	0	6	14	0	1.70±0.47 ^f	40	0	0	0	0
Kidney	Nephropathy	0	1	2	17	2.80±0.52 ^{e,f}	7	2	3	8	1.60±1.35	18	11	6	5	0.95±1.06
	Nephrocalcinosis	9	5	6	0	0.85±0.88 ^{f,g}	8	9	3	0	0.75±0.72 ^{f,g}	32	8	0	0	0.20±0.49 ^g
Mammary gland	Fibroadenoma	9	11	—	—	55% ^{f,g}	14	6	—	—	30% ^{f,g}	37	3	—	—	7.5%
Pituitary gland	Adenoma	14	6	—	—	30%	14	6	—	—	30%	24	16	—	—	40%
Thyroid gland	C-cell hyperplasia	0	1	1	18	2.85±0.49 ^f	1	1	3	15	2.60±0.82 ^f	17	11	10	2	0.79±0.94

^aFor the grading ; —, negative ; 1⁺, mild ; 2⁺, moderate ; 3⁺, severe ; and for the incidence ; —, absence ; 1⁺, presence.

^bValues are presented as means±standard deviations of points (—, 0 ; 1⁺, 1 ; 2⁺, 2 ; 3⁺, 3) for the grading or percentages for the incidence of lesions.

^cMetastases were not found.

^dNumber of rats.

^eSignificantly different from the group 11 value by Student-Newman-Keuls test, Fisher's exact test or Peto's test.

^fSignificantly different from the group 12 value by Student-Newman-Keuls test, Fisher's exact test or Peto's test.

^gSignificantly different from the male value by Student-Newman-Keuls test or Fisher's exact test (refer Table 6).

Table 8. Other lesions histologically observed but not affected by dietary regimen in rats by the end of week 104 (experiment 2).

Organ	Lesion	Group 7 (male/CDAA)	Group 8 (male/CSAA)	Group 9 (male/CRF-1)	Group 10 (female/CDAA)	Group 11 (female/CSAA)	Group 12 (female/CRF-1)
Liver	Histiocytic sarcoma	0/20 : 0% ^a	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Cholangioma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%
Pancreas	Acinar cell adenoma	1/20 : 5%	2/20 : 10%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Acinar cell carcinoma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%
	Islet cell adenoma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	4/40 : 10%	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Islet cell carcinoma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
Tongue	Squamous cell papilloma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Squamous cell carcinoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%
Small intestine	Adenocarcinoma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
Heart	Cardiomyopathy	15/20 : 75%	18/20 : 90%	30/40 : 75%	15/20 : 75%	15/20 : 75%	29/40 : 72.5%
	Intramural schwannoma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
Lung	Paraganglioma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Adenoma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	2/40 : 5%	3/20 : 15%	1/20 : 5%	0/40 : 0%
Urinary bladder	Adenocarcinoma	0/20 : 0%	3/20 : 15%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%
Prostate	Ganglioneuroma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Hyperplasia	1/20 : 5%	1/20 : 5%	9/40 : 22.5%	—	—	—
Preputial gland	Adenoma	1/20 : 5%	1/20 : 5%	8/40 : 20%	—	—	—
	Adenocarcinoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	2/40 : 5%	—	—	—
Ovary	Adenocarcinoma	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	—	—	—
Uterus	Granulosa cell tumor	—	—	—	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Endometrial carcinoma	—	—	—	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%
Clitoral gland	Endometrial stromal polyp	—	—	—	8/20 : 40%	4/20 : 20%	14/40 : 35%
	Leiomyoma	—	—	—	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%
	Adenoma	—	—	—	0/20 : 0%	1/20 : 5%	1/40 : 2.5%
Mammary gland	Adenocarcinoma	—	—	—	0/20 : 0%	2/20 : 10%	1/40 : 2.5%
	Acinar hyperplasia	6/20 : 30%	5/20 : 25%	7/40 : 17.5%	15/20 : 75%	15/20 : 75%	28/40 : 70%
Pituitary gland	Adenoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	2/40 : 5%
	Adenocarcinoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	1/20 : 5%	1/20 : 5%	2/40 : 5%
	Hyperplasia	4/20 : 20%	3/20 : 15%	5/40 : 12.5%	4/20 : 20%	2/20 : 10%	4/40 : 10%
Thyroid gland	Adenocarcinoma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	1/40 : 2.5%	2/20 : 10%	2/20 : 10%	3/40 : 7.5%
	C-cell adenoma	1/20 : 5%	6/20 : 30%	10/40 : 25%	6/20 : 30%	3/20 : 15%	4/40 : 10%
	C-cell adenocarcinoma	1/20 : 5%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	1/20 : 5%	1/40 : 2.5%
	Follicular cell hyperplasia	0/20 : 0%	1/20 : 5%	5/40 : 12.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	8/40 : 20%
	Follicular cell adenoma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%
Parathyroid gland	Follicular cell adenocarcinoma	1/20 : 5%	1/20 : 5%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Adenoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	2/40 : 5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
Adrenal gland	Cortical adenoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	2/40 : 5%	1/20 : 5%	0/20 : 0%	3/40 : 7.5%
	Pheochromocytoma	3/20 : 15%	2/20 : 10%	11/40 : 27.5%	2/20 : 10%	1/20 : 5%	0/40 : 0%
	Malignant pheochromocytoma	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Neuroblastoma	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
Brain/spinal cord	Oligodendroglioma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Astrocytoma	0/20 : 0%	2/20 : 10%	0/40 : 0%	1/20 : 5%	0/20 : 0%	2/40 : 5%
	Granular cell tumor	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%
	Chordoma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Malignant reticulosis	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%
	Radiculoneuropathy	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%
	Fibroma	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
Spleen	Lipoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Large granular lymphocyte leukemia	4/20 : 20%	4/20 : 20%	8/40 : 20%	4/20 : 20%	3/20 : 15%	9/40 : 22.5%
	Histiocytic sarcoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Myelogenous leukemia	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
Bone marrow	Histiocytic sarcoma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Basal cell adenoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	2/40 : 5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
Skin	Squamous cell papilloma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%	1/20 : 5%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%
	Keratoacanthoma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Sebaceous gland adenoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%
	Sebaceous gland adenocarcinoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Fibroma	0/20 : 0%	3/20 : 15%	3/40 : 7.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
Subcutaneous tissue	Hemangiopericytoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	2/40 : 5%
	Hemangiosarcoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%
	Histiocytic sarcoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Adenoma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
Zymbal's gland	Adenocarcinoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Adenoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
Harderian gland	Adenoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	1/20 : 5%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
Bone	Osteosarcoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Osteosclerosis	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%
Body cavity	Malignant mesothelioma	0/20 : 0%	1/20 : 5%	4/40 : 10%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	0/40 : 0%
	Liposarcoma	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%	0/20 : 0%	0/20 : 0%	1/40 : 2.5%

^aValues are presented as numbers of rats bearing the lesions/ numbers of rats in the group : % incidences of the lesions

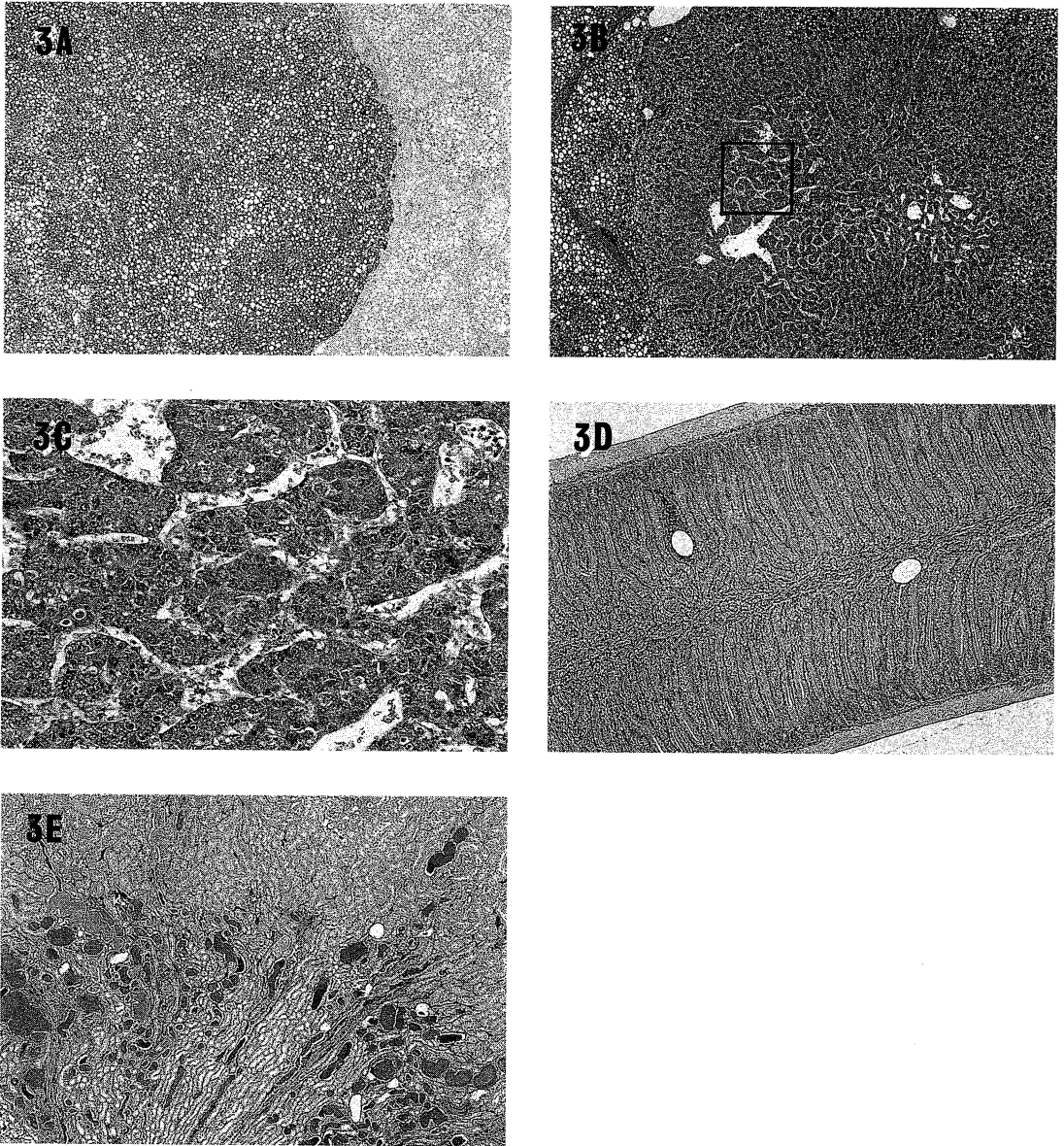


Fig. 3. Representative histology of the lesions affected by the feeding of the CDAA diet at the end of week 52 (experiment 1).

- 3A : Eosinophilic altered hepatocellular focus stained with GST-P. Group 1 (male), GST-P. Original magnification, $\times 10$
- 3B : Hepatocellular adenoma. Group 1 (male), Hematoxylin and eosin. Squared area indicates a part of carcinoma-in-adenoma. Original magnification, $\times 10$
- 3C : Hepatocellular carcinoma-in-adenoma. Group 1 (male), High magnification view of the squared area in Fig. 3B, Hematoxylin and eosin. Original magnification, $\times 50$
- 3D : Lacteal dilatation of small intestine, Group 1 (male), Hematoxylin and eosin. Original magnification, $\times 12.5$
- 3E : Nephropathy/nephrocalcinosis. Group 4 (female), Hematoxylin and eosin. Original magnification, $\times 25$

まとめた。脂肪肝は、雌雄共に、CDAA 食およびCSAA 食群がCRF-1 食群より高値を示し、同一飼料投与条件ごとに比較しても雌雄差を認めなかった。肝における線維増生は、雌雄共にCDAA 食群のみで観察され、雄では多くが完成型肝硬変を呈し、雌より高度の変化を示した。肝細胞癌(Fig. 4A)は、雄のCDAA 食群において、大顆粒リンパ球性白血病で早期に死亡した1例を除く全例に発生し、肺(頻度68%)・周辺リンパ節(頻度21%)・腎(頻度16%)・脾(頻度5%)・胃(頻度5%)・精巣上体(頻度5%)・眼球(頻度5%)・腹膜(頻度5%)など全身に転移した。雄のCDAA 食群における肝細胞癌の経時的な累積出現匹数はFig. 5に示す。肝細胞癌の発生は40週より確認され、それ以降104週まではほぼ直線的に増加した。肝細胞癌は、雌のCDAA 食群において、実験終了時に30%の頻度で観察したが、転移を認めなかった。肝細胞癌は、ほとんど索状型または偽腺管型の比較的高分化なもので、一部に充実性のやや分化度の低いものも観察されたが、未分化型の発生を認めなかった。雌雄のCSAA 食およびCRF-1 食群は、肝細胞癌の発生を観察しなかった。脾は、腺房細胞小増殖巣と腺房細胞過形成(Fig. 4B)を併せると、雌雄共にCDAA 食およびCSAA 食群がCRF-1 食群より高度であった。前胃は、雌雄共に、扁平上皮過形成(Fig. 4C)がCDAA 食およびCSAA 食群でCRF-1 食群より高度に発生した。腎は、雌雄共に、慢性腎症がCDAA 食群で他群より高度に観察された。腎の石灰化は、雄ではCDAA 食群が他群より高度で、雌ではCDAA 食およびCSAA 食群がCRF-1 食群より高度であり、同一飼料条件ごとに比較すると、雌が雄より高度の変化を示した。精巣は、雄のCSAA 食およびCRF-1 食群のそれぞれ80および92.5%に間細胞腫(Fig. 4D)を観察したのに対し、CDAA 食群では1例(頻度5%)に発生を認めるのみであった。乳腺は、線維腺腫(Fig. 4E)が雌のCDAA 食およびCSAA 食群でCRF-1 食群より高頻度に発生したが、雄ではCRF-1 食群の3例(頻度7.5%)にのみ観察された。下垂体は、各群とも30~45%の頻度で腺腫(Fig. 4F)を観察し、そのほとんどが色素嫌性型であったが、雄のCDAA 食群のみにおいて、発生頻度が10%で、雄の他群および雌のCDAA 食群より低値を示した。甲状腺は、C細胞過形成(Fig. 4G)が、雌雄共にCDAA 食およびCSAA 食群でCRF-1 食群より高度に観察された。以上の他にも、種々の臓器において、Table 8に示す如き病変の発生を観察したが、それらの発生頻度については群間に有意差を認めなかった。

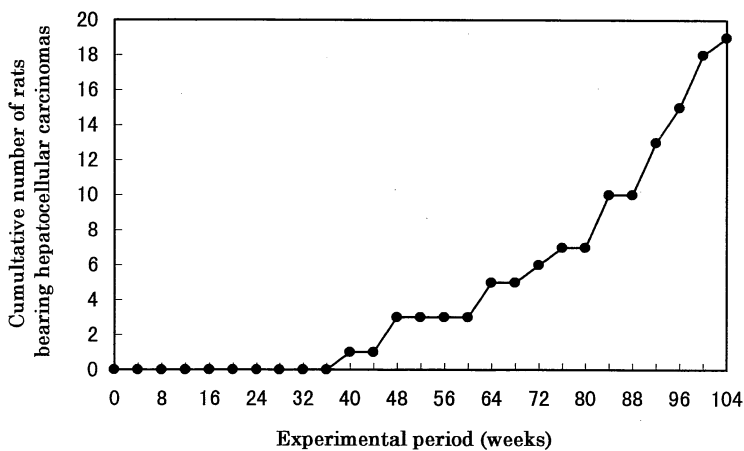


Fig. 5. Cumulative number of male rats fed the CDAA diet bearing hepatocellular carcinomas for 104 weeks (experiment 2, group 7)

In female rats fed the CDAA diet (group 10), hepatocellular carcinomas were all observed at the end of week 104.

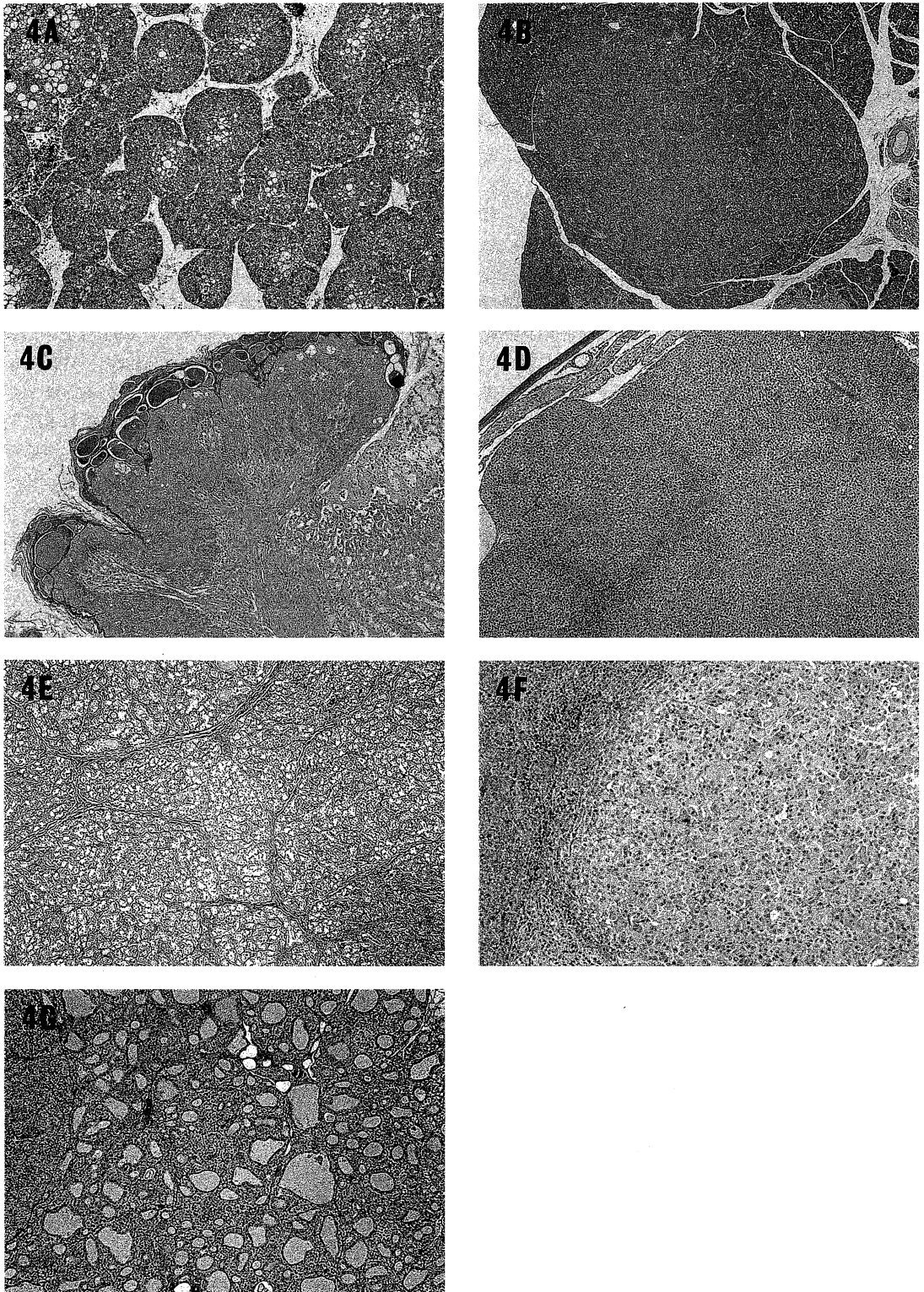


Fig. 4.

考 察

以上の結果より、CDAA食は、F 344系雌雄ラットにおいて、肝細胞癌をはじめとする肝病変を誘発すると共に、慢性腎症と腎石灰化(雄のみ)の発生を促進し、小腸乳び管拡張¹⁸⁾を誘発し、精巣における間細胞過形成および間細胞腫と下垂体腺腫の発生を抑制する(雄のみ)ことが判明した。また、コリンの含量にかかわらず、半合成アミノ酸食であるCDAA食あるいはCSAA食は、膵腺房細胞小増殖巣および過形成・前胃扁平上皮過形成・腎石灰化(雌のみ)・甲状腺C細胞過形成・乳腺線維腺腫(雌のみ)の発生を促進した。なお、実験2においては、雄の各群間に生存率の差を認めたが、Petoの検定を用いた統計学的解析により生存率の差の影響は排除されているものと考えてよい。上記病変の他にも、CDAA食またはCSAA食群において、F 344系ラットに自然発生する種々の病変が認められたが、その発生頻度はCRF-1食群と有意差がなく、F 344系ラットにおける既存の報告¹⁹⁻²¹⁾と同程度であった。

CDAA食は、雄のほぼ全例に、脂肪肝と肝硬変を背景として肝細胞癌を発生せしめ、以前の報告と矛盾のない結果であった^{6,15)}。さらに、CDAA食は、雌においても、雄より低頻度ながら肝細胞癌を発生せしめ得ることが判明した。実験1における血液学のおよび血清学的変化は、ほぼ全てが肝障害に起因するものと考えられ、雌雄差も反映されている。F 344系雌性ラットは、CD食に抵抗性で、長期の投与にても肝細胞癌の発生を認めない²²⁾。CD食に対するF 344系ラットの反応性に関する雌雄差は、成長期におけるコリン必要量の差異などに起因するもの

との指摘がある²²⁾が、これまで明確な説明がなされていない。今回の結果は、雌性ラットが強い食餌性コリン欠乏には感受性を示すことを明らかとしたもので、食餌性コリン欠乏における雌雄差の問題を解明する糸口となり得る知見である。ラットにおける偏倚肝細胞癌は、古くから肝細胞癌の前癌病変と考えられ、その中でも早期より種々の酵素偏倚を示す好酸性型の結節が肝細胞癌へ進展する確率の高い病変とされている²³⁾。本研究においても、実験開始後52週の雄CDAA食群にみられた偏倚肝細胞癌のほとんどが好酸性型であったのに対し、雌では好塩基性型が少なからずみられており、肝細胞癌の雌雄差と相応する所見である。近年、前癌病変の検出は、酵素偏倚等の表現型の変化を指標として行われることが多く、特に鋭敏性と信頼性のゆえにGST-P陽性表現型がもっとも頻繁に用いられる^{24,25)}。本研究においても、上記の偏倚肝細胞癌の内、好酸性型はGST-P陽性を示し、好塩基性型はGST-P陰性を示しており、好酸性型偏倚肝細胞癌の前癌性は明らかと考えられる。さらに、CDAA食は、F 344系雌性ラットへの投与期間を延長することにより、好酸性型偏倚肝細胞癌の成長に続いて、30週前後より肝細胞腺腫を誘発する⁹⁾。本研究は、腺腫内癌の発生を観察していることから、本発癌系において、GST-P陽性を示す好酸性型偏倚肝細胞癌より肝細胞腺腫を経て肝細胞癌の発生に至る進展経路の存在することが明らかとなった。したがって、前癌病変の消長は、本系において肝発癌に対する化学物質等による修飾作用を検索する指標として有用であることが確認されたのである。また、本系の肝発癌の過程における組織学的変化がC型肝炎ウイルスなどによるヒト肝発癌と類似することより、本

Fig. 4. Representative histology of the lesions affected by the feeding of the CDAA and/or CSAA diets by the end of week 104 (experiment 2).

- 4A: Hepatocellular carcinoma. Group 7 (male/CDAA), Hematoxylin and eosin. Original magnification, $\times 10$
- 4B: Pancreatic acinar cell hyperplasia. Group 8 (male/CSAA), Hematoxylin and eosin. Original magnification, $\times 12.5$
- 4C: Forestomach squamous cell hyperplasia. Group 7 (male/CDAA), Hematoxylin and eosin. Original magnification, $\times 25$
- 4D: Testicular interstitial cell tumor. Group 9 (male/CRF-1), Hematoxylin and eosin. Original magnification, $\times 10$
- 4E: Mammary fibroadenoma. Group 10 (female/CDAA), Hematoxylin and eosin. Original magnification, $\times 10$
- 4F: Pituitary adenoma. Group 8 (male/CSAA), Hematoxylin and eosin. Original magnification, $\times 10$
- 4G: Thyroidal C-cell hyperplasia. Group 7 (male/CDAA), Hematoxylin and eosin. Original magnification, $\times 25$

系における前癌病変は、ヒトの腺腫様過形成などのいわゆる境界病変に相当する変化であるものと示唆される。

肝以外の臓器におけるコリンあるいは複数のメチル基供与体の食餌性欠乏による変化は、これまでにマウスにおける急性壊死性膵炎とそれに付随する肺障害²⁶⁾や、ラットにおける急性壊死性膵炎^{27,28)}・膵内肝細胞の出現²⁹⁾・出血性腎障害に基く急性腎不全^{30,31)}・脾腫および胸腺萎縮による免疫機能低下³²⁾・心血管系の粥状硬化と血栓形成および心筋梗塞³³⁻³⁵⁾などが報告されている。本研究において、CDA食は、膵炎・膵内肝細胞出現・腎不全・心血管系病変を誘発しなかった。また、脾腫は観察したが、特異的变化というより、肝硬変に伴う二次的变化である可能性が強く、胸腺萎縮も対照群にみられた加齢性変化と差がなかった。以上の如き本研究と以前の研究との差異は、使用した飼料の組成等の違いなどによるものと思われるが、詳細は明らかでない。一方、CD食およびその対照である半精製コリン添加食の長期投与は、F344系雌雄ラットにおける膵腺房細胞過形成の発生と同系雌雄ラットにおける前胃扁平上皮過形成の発生を促進すると報告されている^{22,36)}。本研究においても、CDA食およびCSAA食は、同様に雌雄の膵腺房細胞小増殖巣および過形成と前胃扁平上皮過形成の発生を促進した。

慢性腎症と腎石灰化は、加齢性変化としてF344系ラットに自然発症する病変である^{21,37)}。CDA食による慢性腎症発生促進の原因は明確でないが、肝障害に付随する二次的变化である可能性と、腎が酸化性ストレスに比較的鋭敏な臓器である³⁸⁻⁴⁰⁾ことに関係している可能性が考えられる。一方、腎石灰化は、半精製食の投与により、CRF-1食等の通常飼料を投与した場合に比べ、特に雌にて促進されるとの報告がある^{41,42)}。本研究においても、雌での変化が雄より高度であったことより、半合成食であるCDA食による発生促進も、同様の機序に基づくものと考えられる。また、腎石灰化の発生促進は、雄ではCDA食に特異的な変化であったが、雌ではCSAA食でも同様にみられたので、CDA食およびCSAA食による甲状腺C細胞過形成発生の促進に伴うカルシトニン分泌亢進の関与も考慮される。さらに、CDA食は、F344系雌性ラットの精巣に高率に自然発生する間細胞過形成および間細胞腫の発生¹⁹⁻²¹⁾を、顕著に抑制した。F344系ラットにおける間細胞腫の発生は、下垂体よりの黄体形成ホルモン(LH)分泌亢進によるものとされている⁴³⁾。このことは、抗アンドロゲン剤によるテストステロン代謝阻害⁴⁴⁾や、ドーパミンアゴニストによるテストステロンとプロラクチンの分泌阻害⁴⁵⁾などによる血中LHレベルの増加が、間細胞腫を誘発するこ

とにより支持されている。したがって、CDA食は、何らかの機序で血中LHレベルを低下せしめるか、少なくともその加齢に伴う上昇を阻害することにより、間細胞腫発生を抑制している可能性が強い。このほか、CDA食およびCSAA食は雌の乳腺線維腺腫の発生を促進した。乳腺腫瘍の発生は、エストロゲン・プロゲステロン・プロラクチン等のホルモンにより促進されることが知られている⁴⁶⁾。なお、結果には示さなかったが、本研究においても、CDA食およびCSAA食群の雌にて、実験開始後約90週より乳汁貯留に基く乳腺腫大が、CRF-1食群に比べ、顕著に観察された。Saitoらは、CD食および半精製コリン添加食の26ヶ月投与により、F344系雌性ラットの乳腺においてcystic adenomaの発生が促進されることを報告している²²⁾。したがって、CDA食およびCSAA食は、雌において高プロラクチン血症を誘発し、乳腺線維腺腫の発生を促進した可能性がある。以上の結果は、CDA食およびCSAA食の投与により、ラットの内分泌環境に種々の変化の生じている可能性を示唆し、今後のさらなる研究が必要である。

結 語

本研究は、CDA食とその対照であるCSAA食および基礎食として広く用いられているCRF-1食をF344系雌雄ラットに長期投与して、全身諸臓器に及ぼす影響について検索し、以下の結果を得た。

1. CDA食は、雄性ラットにおいて、脂肪肝と肝硬変を背景として、好酸性型偏倚肝細胞巣より肝細胞腺腫・腺腫内癌を経て、肝細胞癌を高率に誘発した。
2. CDA食は、雌性ラットの肝においても、雄性ラットより軽度ながら同様の病変を誘発し、低率ながら肝細胞癌を誘発した。
3. CDA食は、雄において精巣間細胞腫ならびに下垂体腺腫の発生を抑制した。一方、CDA食およびCSAA食は、雌において乳腺線維腺腫の発生を促進した。
4. CDA食は、雌雄において慢性腎症の発生を促進すると共に小腸乳び管拡張を誘発し、雄において腎石灰化を促進した。一方、CDA食およびCSAA食は、雌雄において膵腺房細胞小増殖巣および過形成・前胃扁平上皮過形成・甲状腺C細胞過形成、雌において腎石灰化の発生を促進した。

以上の結果より、CDA食は、雌雄のF344系ラットに長期投与すると、多段階的变化を経て肝硬変を伴う肝細胞癌を発生せしめた。さらに、CDA食は、種々の病変の自然発生を修飾した。ラットにおけるCDA食を用いた研究は、生体内におけるコリンの生物学的作用と

内因性肝発癌の機構を解明するのに有用な系であることが示された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りまし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深謝を捧げます。さらに本研究に直接御指導を賜った腫瘍病理学教室中江 大助教授に深く感謝の意を表します。また、研究にご協力頂きました腫瘍病理学教室の諸兄姉に感謝いたします。なお、本研究の一部は、厚生省がん研究助成金の援助により行いました。

文 献

- 1) Ames, B.N. : Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* **221** : 1256-1264, 1983.
- 2) Clayson, D.B. : The need for biological risk assessment in reaching decisions about carcinogens. *Mutat. Res.* **185** : 243-269, 1987.
- 3) Pitot, H.C., Dragan, Y., Xu, Y.H., Peterson, J., Hully, J., and Campbell, H. : Pathways of carcinogenesis - genetic and epigenetic -. Princess Takamatsu Symp. **22** : 21-33, 1991.
- 4) Loeb, L.A. : Endogeneous carcinogenesis : Molecular oncology into the twenty-first century. *Cancer Res.* **49** : 5489-5496, 1989.
- 5) Ames, B.N., Gold, L.S., and Willen, W.C. : The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** : 5258-5265, 1995.
- 6) Nakae, D. : Endogenous liver carcinogenesis in the rat. *Pathol. Int.* **49** : 1028-1042, 1999.
- 7) Hershey, J.M., and Sokin, S. : Substitution of lecithine for raw pancreas in the diet of depancreatized dog. *Am. J. Physiol.* **98** : 74-85, 1931.
- 8) Best, C.H., Hershey, J.M., and Huntsman, M. E. : The effect of lecithine on fat deposition in the liver of normal rat. *J. Physiol.* **75** : 56-66, 1932.
- 9) Best, C.H., and Huntsman, M.E. : The effects of the components of lecithine upon deposition of fat in the liver. *J. Physiol.* **75** : 405-412, 1932.
- 10) Newberne, P.M., de Camargo, J.L.V., and Clark, A.J. : Choline deficiency, partial hepatectomy and liver tumors in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* **19** : 2342-2352, 1982.
- 11) Mikol, Y.B., Hoover, K.L., Creasia, D., and Poirier, L.A. : Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* **4** : 1619-1629, 1983.
- 12) Ghoshal, A.K., and Farber, E. : The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. *Carcinogenesis* **5** : 1367-1370, 1984.
- 13) Locker, J., Reddy, T.V., and Lombardi, B. : DNA methylation and hepatocarcinogenesis in rats fed a choline-devoid diet. *Carcinogenesis* **7** : 1309-1312, 1986.
- 14) Nakae, D., Yoshiji, H., Maruyama, H., Kinugasa, T., Denda, A., and Konishi, Y. : Production of both 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA and γ -glutamyltransferase-positive hepatocellular lesions in rats given a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Jpn. J. Cancer Res.* **81** : 1081-1084, 1990.
- 15) Nakae, D., Yoshiji, H., Mizumoto, Y., Horiguchi, K., Shiraiwa, K., Tamura, K., Denda, A., and Konishi, Y. : High incidence of hepatocellular carcinomas induced by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats. *Cancer Res.* **52** : 5042-5045, 1992.
- 16) Nakae D., Mizumoto, Y., Andoh, N., Tamura, K., Horiguchi, K., Endoh, T., Kobayashi, E., Tsujiuchi, T., Denda, A., Lombardi, B., and Konishi, Y. : Comparative changes in the liver of female Fischer 344 rats after short-term feeding of a semipurified or a semisynthetic L-amino acid-defined choline-deficient diet. *Toxicol. Pathol.* **23** : 583-590, 1995.
- 17) Obara, T., Makino, T., Ura, H., Yokose, Y., Kinugasa, T., Moore, M.A., Sato, K., and Konishi, Y. : Comparative histochemical investigation of the glutathione S-transferase placental form and γ -glutamyltranspeptidase during N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine-induced pancreatic carcinogenesis in hamster. *Carcinogenesis* **7** : 801-805, 1986.
- 18) Visscher, G.E., Robison, R.H., and Hartman, H.A. : Chemically induced lipidosis of the small intestine villi in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **55** : 535-544, 1980.
- 19) Tarone, R.E., Chu, K.C., and Ward, J.M. :

- Variability in the rates of some common naturally occurring tumors in Fischer 344 rats and (C 57 BL/6 N × C 3 H/HeN) F₁ (B 6 C 3 F₁) mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **66** : 1175-1181, 1981.
- 20) **Enomotó, M., Kobayashi, K., and Inoue, H.** : Significance of naturally-occurring tumors in evaluating the carcinogenicity of a test compound: A review and an improved carcinogenicity bioassay for chemicals -Profiles of spontaneous and induced tumors in animals and a need for a revised carcinogen bioassay-. *J. Toxicol. Pathol.* **3** : 1-17, 1990.
 - 21) **Boorman, G.A., Eustis, S.L., Elwell, M.R., Montgomery, Jr., C.H., and MacKenzie, W.F.** : Pathology of Fischer rat, Reference and atlas. Academic Press, San Diego, 1990.
 - 22) **Saito, R., Palomba, L., Rao, K.N., and Lombardi, B.** : Resistance of female Fischer-344 rats to the hepatonecrogenic and hepatocarcinogenic actions of a choline-devoid diet. *Carcinogenesis* **12** : 1451-1457. 1991.
 - 23) **Harada, T., Maronpot, R.R., Boorman, G.A., Morris, R.W., and Stitzel, K.A.** : Foci of cellular alteration in the rat liver: Review. *J. Toxicol. Pathol.* **3** : 161-188, 1990.
 - 24) **Tsuchida, S., and Sato, K.** : Glutathione and cancer. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27** : 337-384, 1992.
 - 25) **Ito, N., Tatematsu, M., Hasegawa, R., and Tsuda, H.** : Medium-term bioassay system for detection of carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis utilizing the GST-P positive liver cell focus as an endpoint marker. *Toxicol. Pathol.* **17** : 630-641, 1989.
 - 26) **Frossard, J.L., Saluja, A., Bhagat, L., Lee, H. S., Bhatia, M., Hofbauer, B., and Steer, M.L.** : The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis - associated lung injury. *Gastroenterology* **116** : 694-701, 1999.
 - 27) **Rodriguez, A.I., de Dios, I., Garcia-Montero, A. C., and Manso, M.A.** : Acute necrotizing pancreatitis induced by a CDE diet in the rat: a morphological and functional study. *Lab. Clin. Med.* **123** : 693-700, 1994.
 - 28) **Manso, M.A., Rodriguez, A.I., Garcia-Montero, A.C., and de Dios, I.** : Effects the cholecystkinin receptor antagonist L-364,718 on pancreatitis induced by a deficient in choline and supplemented with ethionine (CDE) diet in the rat. *Arch. Physiol. Biochem.* **103** : 410-415, 1995.
 - 29) **Hoover K.L., and Poirier, L.A.** : Hepatocyte-like cells within the pancreas of rats fed methyl-deficient diets. *J. Nutr.* **116** : 1569-1575, 1986.
 - 30) **Griffith, W.H., and Wade, N.J.** : Choline metabolism II. The interrelationship of choline, cysteine and methionine in the occurrence and prevention of hemorrhagic degeneration in young rats. *J. Biol. Chem.* **132** : 627-637, 1940.
 - 31) **Patterson, J.M., and McHenry, E.W.** : Choline and the prevention of hemorrhagic kidneys in the rat. *J. Biol. Chem.* **145** : 207-212, 1942.
 - 32) **Nauss, K.M., Connor, A.M., Kavanaugh, A., and Newberne, P.M.** : Alterations in immune function in rats caused by dietary lipotrope deficiency: effect of age. *J. Nutr.* **112** : 2333-2341, 1982.
 - 33) **Salmon, W.D., and Newberne, P.M.** : Cardiovascular disease in choline deficient rats. *Arch. Pathol.*, **73** : 190-209, 1962.
 - 34) **Newberne, P.M., Bresnahan, M.R., and Kula, N.** : Effects of two synthetic antioxidants, Vitamin E, and ascorbic acid on the choline-deficient rat. *J. Nutr.*, **97** : 219-231, 1969.
 - 35) **Wilson, R.B., Kula, N.S., Newberne, P.M., and Conner, M.W.** : Vascular damage and lipid peroxidation in choline-deficient rats. *Exp. Mole. Pathol.*, **18** : 357-368, 1973.
 - 36) **Longnecker, D.S., Chander, N., Sheahan, D.G., Janosky, J.E., and Lombardi, B.** : Preneoplastic and neoplastic lesions in the pancreas of rats fed choline-devoid or choline-supplemented diets. *Toxicol. Pathol.* **19** : 59-65, 1991.
 - 37) **Imai, S., Morimoto, J., Kiyozuka, Y., Shima, M., Nakamori, K., and Tsubura, Y.** : Spontaneous calcification in F 344/Slc and F 344/JCL rats. *Exp. Anim.* **35** : 521-525, 1986.
 - 38) **Hasselwander, O., and Young, I.S.** : Oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic. Res.* **29** : 1-11, 1998.

- 39) **Haugen, E., and Nath, K.A.** : The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif.* **17** : 58-65, 1999.
- 40) **Mylonas, C., and Kouretas, D.** : Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vitro* **13** : 295-309, 1999.
- 41) **Woodard, J.C.** : Relationship between the ingredients of semipurified diets and nutritional nephrocalcinosis of rats. *Am. J. Pathol.* **65** : 269-278, 1971.
- 42) **Kounitz, H., and Johnson, E.** : Dietary protein, fat, and minerals in nephrocalcinosis in female rats. *Metabolism* **25** : 69-77, 1976.
- 43) **Clegg, E.D., Cook, J.C., Foster, P.M.D., and Daston, G.P.** : Leydig cell hyperplasia and adenoma formation : Mechanisms and relevance to humans. *Reprod. Toxicol.* **11** : 107-121, 1997.
- 44) **Kelce, W.R., and Wilson, E.M.** : Environmental antiandrogens : developmental effects, molecular mechanisms and clinical implications. *J. Mol. Med.* **75** : 198-207, 1997.
- 45) **Prentice D.E., and Meikle, A.W.** : A review of drug induced Leydig cell hyperplasia and neoplasia in the rat and some comparisons with man. *Human Exp. Toxicol.* **14** : 562-572, 1995.
- 46) **Welsch, C.W.** : Host factors affecting the growth of carcinogen - induced rat mammary carcinomas : a review and tribute to Charles Brenton Huggins. *Cancer Res.* **45** : 3415-3443, 1985.