

## 비유전독성 간발암물질인 Clofibrate의 F344 랫드에 있어서 경구 아급성독성시험

정자영 · 이국경 · 신동환 · 한범석 · 김대중\* · 강태석<sup>1</sup> · 김기상  
장동덕 · 김창옥 · 김효정<sup>2</sup> · 김지희<sup>3</sup> · 정수연<sup>1</sup>  
조재천 · 최광식 · 김광섭 · 장준식<sup>1</sup>

국립보건안전연구원 병리부, 연구기획과<sup>1</sup>, 독성부<sup>2</sup>, 실험동물관리실<sup>3</sup>

### Oral Subacute Toxicity of Nongenotoxic Hepatocarcinogen, Clofibrate in F344 Rats

Ja Young JEONG, Kook Kyung LEE, Dong Hwan SHIN, Beom Seok HAN,  
Dae Joong KIM\*, Tae Seok KANG<sup>1</sup>, Ki Sang KIM, Dong Deuk JANG,  
Chang Ok KIM, Hyo Jung KIM<sup>2</sup>, Jee Hee KIM<sup>3</sup>, Soo Youn CHUNG<sup>1</sup>,  
Jae Chon CHO, Kwang Sik CHOI, Kwang Sup KIL and Joon Shik CHANG<sup>1</sup>

*Department of Pathology, <sup>1</sup>Division of Research Planning and Evaluation,  
<sup>2</sup>Department of Toxicology, <sup>3</sup>Department of Laboratory Animal Resources  
National Institute of Safety Research, Seoul 122-020*

(Received August 27, 1994; accepted December 20, 1994)

**Abstract**—Clofibrate, a peroxisome proliferator, is hepatocarcinogenic in rats in a dose-dependent manner. A total of 70 male and female F344 rats, 5-week-old, were divided into three groups. Rats were fed clofibrate at 0, 0.25, or 0.5% in diet for 30 days. All rats were anesthetized with CO<sub>2</sub>, blood samples were taken by cardiac puncture for hematology and clinical chemistry, and the rats were killed by exsanguination. Livers, kidneys, pancreas, adrenal glands, spleen, heart, lungs, thyroid gland, reproductive organs, and digestive organs were removed, weighed, later processed, and embedded with paraplast for histological examination. The relative liver and kidney weights with respect to final body weight in the clofibrate-treated group were significantly increased compared with those of control group at all dose levels ( $p < 0.01$ ). It has been suggested that clofibrate may influence on hepatotoxicity by increases in peroxisomal proliferation.

**Keywords** □ clofibrate, nongenotoxic hepatocarcinogen, peroxisome proliferator, subacute toxicity

실험동물의 여러 장기에 있어서 세포증식과 발암성과의 연관성에 관하여 여러 연구자들이 보고한 바가 있다 (Butterworth 등, 1991; Homburger 등, 1991; Loury 등, 1987). 또한 비유전독성 발암물질(nongenotoxic carcinogen)에 대한 다단계 발암화 과정에서 세포증식의 역할에 대하여 논의가 되고 있다(Cohen과 Ellwein, 1991; Farber, 1976; Pitot과 Dragan, 1991; Roe, 1989; Swenberg과 Short, 1991).

Peroxisome proliferator는 일반적으로 고지혈증치료제(hypolipemic drugs)로 쓰이는 약물군과 프탈레이트

에스테르 가소제(phthalate ester plasticizer)군으로 나눌 수 있다(Rao와 Reddy, 1987b; Reddy와 Lalwani, 1983). 이러한 peroxisome proliferator는 화학구조 및 기능상으로 서로 다른 물질이다. 고지혈증치료제로 쓰이는 약물로는 2-(p-chloro phenoxy)-2-methylpropionic acid ethyl ester (clofibrate, CF) (Mochizuki 등, 1982; Moore와 Kitagawa, 1986; Reddy와 Lalwani, 1983), ciprofibrate(Moore와 Kitagawa, 1986; Reddy와 Qureshi, 1979), WY-14,643(Moore와 Kitagawa, 1986; Reddy와 Qureshi, 1979), nafenopin(Moore와 Kitagawa, 1986), tibrac acid(Moore와 Kitagawa, 1986; Reddy 등, 1980), 그리고 BR931(Moore와 Kitagawa, 1986; Reddy 등, 1980)

\* To whom correspondence should be addressed.

등이 있으며, 일회용 플라스틱 의료용구의 제작에 널리 쓰이는 프탈레이트 에스테르 가소제는 di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)(Kluwe 등, 1983; Moore와 Kitagawa, 1986; Reddy와 Lalwani, 1983)와 di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA)(Reddy와 Lalwani, 1983)가 알려져 있다. Reddy와 Rao(1977)가 설치류 간세포에서 peroxisome proliferation을 일으키는 nafenopin이 간발암성이 있다고 보고한 이래 peroxisome proliferation을 나타내는 물질들에 대한 발암성에 관심을 갖기 시작하였다. 이들 모든 화학물질은 실험동물 간세포의 peroxisome을 증식시키는 작용이 있으며, 비유전독성의 간발암성 (nongenotoxic hepatocarcinogen)이 있다고 보고되었다(Kluwe 등, 1983; Numoto 등, 1984; Mochizuki 등, 1982, 1983; Moore와 Kitagawa, 1986; Popp 등, 1985; Rao와 Reddy, 1987b; Reddy 등, 1980; Reddy와 Rao, 1977; Reddy와 Lalwani, 1983; Reddy와 Qureshi, 1979; Ward 등, 1983, 1986; Williams 등, 1987). 현재까지 peroxisome proliferator에 의한 간발암과정의 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않으나, 이들 화학물질들에 의한 높은  $\beta$ -oxidation 효소활성, peroxisome으로 부터의 과산화수소의 방출, 이에 따르는 간세포의 산화적인 스트레스(Cattley 등, 1987; Conway 등, 1989) 또는 DNA 손상(Fahl 등, 1984; Kasai 등, 1989)과 replicative DNA합성(Marsman 등, 1988; Ward 등, 1988)등이 간발암성과 연관이 있다고 보고하였다. 지속적인 peroxisome proliferation에 의해서 야기되는 특수한 산화적인 DNA 손상은 랫드와 마우스에서 간 증식성 결절과 간세포암(hepatocellular carcinomas)의 발생과 관련이 있는 것으로 생각한다(Glauert 등, 1986; Reddy 등, 1980; Svoboda와 Azarnoff, 1979). Glutathione S-transferase placental form (GST-P)은 유전독성 간발암물질 (genotoxic hepatocarcinogen)에 의해 유발되는 전암병소의 지표인자로 알려져 있다(Sato, 1989; Sato 등, 1984). Ito 등(1988, 1989)에 의해 2단계 발암화과정 모델을 이용한 간 중기발암성시험법 (medium-term liver bioassay model)이 확립되었다. 랫드를 이용한 장기 발암성시험에서 간발암성이 보고된 clofibrate는(Hartig 등, 1982; Ito 등, 1992; Reddy와 Qureshi, 1979) 8주간의 간 중기발암성시험법에서 GST-P 양성증식소가 발현되지않는 대표적인 비유전독성의 간발암물질 (nongenotoxic hepatocarcinogen)이다(Hartig 등, 1982; Hosokawa 등, 1989; Ito 등, 1992). Clofibrate를 SD랫드에 발암용량으로 13주간 투여후 간세포 및 peroxisome 증식에 대한 보고가 있다(Tanaka 등, 1992).

본 연구는 신의약·신농약 개발의 후보물질에 대한 실험동물을 이용한 장기 발암성시험법을 확립하고 양성의 발암성시험 대상시험물질로서 clofibrate를 선정하여 발암성시험을 실시하기 위한 예비시험이다. Clofibrate는 현재까지 간 중기발암성으로도 효과적으로 검색할 수 없는 비유전독성 간발암물질로 분류되고 있으며, 앞으로 이

러한 peroxisome proliferation과 관련된 물질의 *in vitro* 및 *in vivo* 시험법의 확립이 발암성 연구의 중요한 과제라고 생각한다.

본 실험은 clofibrate를 랫드에 4주간의 경구 아급성 독성시험을 수행하므로써 발암성시험을 위한 표적장기의 선정과 용량관계를 알아 보고자 한다.

## 실험방법

### 실험동물

실험동물은 특정병원체부재 5주령 F344계 랫드 (국립 보건안전연구원, 서울) 암·수 각각 35마리씩 총 70마리를 사용하였다. 사육조건은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 5\%$  그리고 명암교대 12시간을 각각 유지하였다. 모든 동물은 분양 후 사육실내에서 1주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다.

또한 사료(신촌사료, 서울)와 음수는 자유로이 급이시켰고, polycarbonate 케이지에 3마리씩 넣어 사육하였다. 실험시작부터 매주 체중 및 사료 소비량을 측정하였고, 임상증상을 관찰 기록하였다.

### 시험물질

발암성시험을 위한 예비 아급성독성시험을 위하여 기존의 문헌정보를 참조하여 간에 대한 장기표적성이 있으며, 장기간 동물실험에 적합하다고 판정된 비유전독성 간발암물질인 clofibrate (2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid ethyl ester)를 대상시험물질로 선정하였다. Clofibrate (CAS No. 637-07-0; C 6643, Sigma)는 미국 Sigma사로 부터 구입하여 사료에 0.25 및 0.5%의 농도로 기초 분발사료에 혼합하여 펠렛으로 제조하여 고압증기멸균기로 멸균하여 청정 사육실내로 반입하여 사용하였다. Clofibrate투여용량의 결정은 발암유발 용량인 0.5 또는 1.0%에 대하여 그의 농도의 절반인 0.25%로 두 단계의 용량을 선정하였다.

### 실험설계 및 약물투여

실험군은 대조군, 저용량군 및 고용량군 등의 암·수 각각 3개군으로 나누었다(Table I). 대조군은 기초사료를 급이 하였고, 저용량군은 0.25% clofibrate(CF)를 함유하는 사료를, 고용량군은 0.5% clofibrate를 함유하는 사료를 실험 시작부터 4주간 투여하였다.

### 병리조직학적 검사

Table I. Experimental design

Group	Treatment	No. of Rat
1	Basal diet	10 (M, F)
2	0.25% CF <sup>a</sup>	12 (M, F)
3	0.50% CF	13 (M, F)
Total No. of rats		35 (70)

<sup>a</sup>Clofibrate

부검 하루전에 절식시킨 랫드를 이산화탄소로 마취하여, 혈액학적 및 혈청생화학적 검사를 위하여 심장에서 채혈하였다. 부검시 간, 신장, 췌장, 소화기장기, 부신, 비장, 생식기, 심장, 폐 및 갑상선 등을 적출하여 10% 중성완충 포르말린에 고정하였다. 간, 신장, 부신, 고환 및 난소는 장기 무게를 측정하였으며, 간, 신장, 부신 및 비장은 고정후 삭정하여, 자동조직 처리기(MVP II, Laboratory Instruments, Inc., USA)로 조직을 처리하고, 파라플라스트로 포매하여 4  $\mu$ m로 두께로 절편을 제작한 후 hematoxylin 및 eosin 염색후 광학현미경하에서 관찰하였다.

#### 혈액학적 검사

자동혈구계산기 (H1 system, Technicon, USA)를 이용하여 총백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 혈색소량(HGB), 적혈구용적(PCV), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균혈색소농도(MCHC), 혈소판수(PLT), 림프구수(Lymphocyte), 중호성 백혈구수( Neutrophil), 단구수(Monocyte), 에오신호성 백혈구수(Eosinophil), 염기호성 백혈구수(Basophil) 등을 측정하거나 계산하였다.

#### 혈청생화학적 검사

자동혈청생화학 분석기 (RA-XT, Technicon, USA)를 이용하여 알부민(ALB), alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase (AST), 혈중노질소(BUN), 콜레스테롤(CHOL), 혈당(GLU), 총빌리루빈량(T.B), 총단백질량(T.P), 중성지질(triglycerides, TRIG), alkaline phosphatase (ALP),  $\gamma$ -glutamyl transferase( $\gamma$ -GT), 크레아티닌(CREAT), 염소(CL), lactate dehydrogenase (LDH) 등을 측정하였다.

#### 자료의 통계학적 처리

자료에 대한 통계학적 처리로는 체중, 사료 소비량, 및 상대장기 무게비에 대하여는 ANOVA후 군간 다중비교(Student's t-test)를 하였으며, 혈액학적 및 혈청 생화학 적 검사에 대한 자료로는 독성시험 통계프로그램인 LA-BCAT을 이용하여 군간 다중비교(Dunnett's test)를 하였다.

## 실험결과

### 체중변화 및 임상증상

**Table IV.** Relative organ weights of male F344 rats treated with clofibrate (CF) for 4 weeks

Treatment	Final B.W (g)	Relative organ wt (g%)				
		Liver	Kidney (L+R)	Adrenal gl. (L+R)	Spleen	Testis (L+R)
Control	250.0 $\pm$ 8.32 <sup>a</sup>	4.43 $\pm$ 0.12	0.93 $\pm$ 0.026	0.02 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01	1.08 $\pm$ 0.02
0.25% CF	215.3 $\pm$ 7.11	5.21 $\pm$ 0.16**	1.13 $\pm$ 0.11**	0.02 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.01	1.24 $\pm$ 0.03**
0.5% CF	204.1 $\pm$ 7.68	6.23 $\pm$ 0.23** <sup>b</sup>	1.07 $\pm$ 0.03**	0.02 $\pm$ 0.00	0.24 $\pm$ 0.01	1.32 $\pm$ 0.04**

<sup>a</sup>Values are expressed as means  $\pm$  S.D. <sup>b</sup>Significantly different from the values of 0.25% CF at  $p < 0.01$ .

\*\*Significantly different from the values of control group at  $p < 0.01$ . Clofibrate (CF) was given at a dose of 0.25% or 0.5% in diet.

Clofibrate 투여에 의한 각군의 체중변화는 Table II 및 III에 나타났다. clofibrate 투여군간의 부검시 체중의 차이는 관찰되지 않았다. 시험기간중 아무런 임상증상이 관찰되지 않았으며, 실험도중 폐사한 동물도 없었다.

#### 상대 장기무게비

Clofibrate 투여에 의한 각 군의 상대 장기무게비의 변화는 Table IV 및 V에 나타났다. Clofibrate를 투여한 군의 암·수 모두 간 및 신장의 무게비는 대조군에 비하여 유의성 증가하였으며( $p < 0.01$ ), 상대 간무게비는 clofibrate의 용량의존적으로 증가하였다( $p < 0.01$ ).

#### 사료 소비량

Clofibrate투여에 의한 각군 사료소비량의 변화를 Table VI와 VII에 수컷과 암컷으로 나누어 각각 나타났다. 각 군간의 사료 소비량의 변화는 유의성이 없었다.

#### 혈액학적 검사

Clofibrate 투여에 의한 각군의 혈액학적 측정치와 군간 통계처리 결과는 Table VIII 및 IX에 나타났다.

#### 혈청생화학적 검사

Clofibrate 투여후 각군의 혈청생화학적 측정치와 군간

**Table II.** Body weight of male F344 rats treated with clofibrate (CF) for 4 weeks

Weeks	Control	0.25% CF	0.5% CF
0	128.04 $\pm$ 6.32 <sup>a</sup>	127.18 $\pm$ 4.50	126.95 $\pm$ 7.82
1	145.36 $\pm$ 5.75	140.79 $\pm$ 4.49	133.53 $\pm$ 7.79
2	164.18 $\pm$ 7.17	156.48 $\pm$ 5.41	147.44 $\pm$ 8.68
3	210.54 $\pm$ 5.92	201.47 $\pm$ 6.61	191.95 $\pm$ 8.26
4	228.95 $\pm$ 15.91	215.33 $\pm$ 7.11	204.15 $\pm$ 7.68

<sup>a</sup>Values are expressed as means  $\pm$  S.D.

Clofibrate (CF) was given at a dose of 0.25 or 0.5% in diet.

**Table III.** Body weight of female F344 rats treated with clofibrate (CF) for 4 weeks

Weeks	Control	0.25% CF	0.5% CF
0	103.75 $\pm$ 3.64 <sup>a</sup>	100.28 $\pm$ 2.80	98.58 $\pm$ 7.21
1	126.38 $\pm$ 4.39	115.30 $\pm$ 2.80	112.36 $\pm$ 7.29
2	134.44 $\pm$ 3.87	129.96 $\pm$ 8.77	126.67 $\pm$ 5.50
3	136.71 $\pm$ 4.59	134.83 $\pm$ 4.81	135.48 $\pm$ 6.53
4	143.70 $\pm$ 5.64	137.92 $\pm$ 4.82	138.23 $\pm$ 7.34

<sup>a</sup>Values are expressed as means  $\pm$  S.D.

Clofibrate (CF) was given at a dose of 0.25 or 0.5% in diet.

**Table V.** Relative organ weights of female F344 rats treated with clofibrate (CF) for 4 weeks

Treatment	Final B.W (g)	Relative organ wt (g%)				
		Liver	Kidney (L+R)	Adrenal gl. (L+R)	Spleen	Testis (L+R)
Control	153± 5.64 <sup>a</sup>	3.93± 0.10	0.90± 0.02	0.03± 0.01	0.27± 0.02	0.05± 0.01
0.25% CF	138± 4.82	4.36± 0.10**	1.06± 0.04**	0.03± 0.01	0.28± 0.01	0.07± 0.02
0.5% CF	138± 7.34	5.15± 0.17** <sup>b</sup>	1.06± 0.06**	0.04± 0.01	0.28± 0.02	0.07± 0.01

<sup>a</sup>Values are expressed as means ± S.D. <sup>b</sup>Significantly different from the values of 0.25% CF at p<0.01.

\*\*Significantly different from the values of control group at p<0.01. Clofibrate (CF) was given at a dose of 0.25% or 0.5% in diet.

**Table VI.** Food consumption of male F344 rats treated with clofibrate (CF) for 4 weeks

Weeks	Food consumption rate (g/rat/day)		
	Control	0.25% CF	0.5% CF
1	16.36± 1.12 <sup>a</sup>	15.16± 0.35	13.81± 0.26
2	17.89± 1.50	16.28± 0.44	15.88± 0.34
3	16.58± 1.52	18.55± 0.76	19.11± 0.69
4	18.59± 1.62	16.66± 0.49	17.44± 1.14

<sup>a</sup>Values are expressed as means ± S.D.

Clofibrate (CF) was given at a dose of 0.25 or 0.5% in diet.

**Table VII.** Food consumption of female F344 rats treated with clofibrate (CF) for 4 weeks

Weeks	Food consumption rate (g/rat/day)		
	Control	0.25% CF	0.5% CF
1	11.15± 0.54	9.99 ± 0.47	11.11± 0.35
2	12.38± 1.31	11.05± 0.42	11.41± 0.44
3	9.74± 0.72	9.99± 0.55	11.38± 0.67
4	12.30± 0.84	9.75± 0.60	10.68 ± 0.87

<sup>a</sup>Values are expressed as means ± S.D.

Clofibrate (CF) was given at a dose of 0.25% or 0.5% in diet.

**Table VIII.** Hematological data in male F344 rats treated with clofibrate (CF) for 4 weeks

Tests (units)	Control	0.25% CF	0.5% CF
WBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	3.44± 1.955	7.45± 1.874**	7.43± 1.049**
RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	8.47± 0.218	7.99± 0.247**	7.90± 0.179**
HGB (g/dl)	15.1± 0.31	14.7± 0.37*	14.6± 0.35**
PCV (%)	45.6± 1.08	42.7± 1.30**	42.0± 1.04**
MCV (fl)	53.8± 0.59	53.5± 0.50	53.1± 0.69*
MCH (pg)	17.9± 0.20	18.4± 0.18**	18.5± 0.18**
MCHC (g/dl)	33.2± 0.34	34.5± 0.34**	34.9± 0.59**
PLT (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	700± 50.8	738± 44.9	727± 38.4
Lymphocyte (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	2.61± 1.516	6.02± 1.519**	5.86± 0.811**
Neutrophil (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0.58± 0.372	0.99± 0.276**	1.06± 0.217**
Monocyte (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0.10± 0.048	0.12± 0.041	0.14± 0.033*
Eosinophil (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0.02± 0.014	0.03± 0.008*	0.03± 0.011**
Basophil (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0.04± 0.030	0.05± 0.017	0.04± 0.013

<sup>a</sup>Values are expressed as means ± S.D. \* and \*\*Significantly different from the control at p<0.05 and p<0.01.

**Table IX.** Hematological data in female F344 rats treated with clofibrate (CF) for 4 weeks

Tests (units)	Control	0.25% CF	0.5% CF
WBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	4.49± 1.298	6.95± 1.370**	6.09± 1.317
RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	8.10± 0.245	8.11± 0.269**	7.94± 0.207
HGB (g/dl)	15.1± 0.45	15.1± 0.41	14.9± 0.37
PCV (%)	43.4± 1.71	42.2± 1.51	42.4± 1.12
MCV (fl)	53.6± 0.97	52.0± 0.63**	53.5± 0.69
MCH (pg)	18.6± 0.11	18.6± 0.22	18.7± 0.14
MCHC (g/dl)	34.7± 0.69	35.8± 0.53**	35.0± 0.38
PLT (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	631± 38.1	716± 33.9**	703± 45.6**
Lymphocyte (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	3.49± 1.049	5.54± 1.107**	4.93± 1.111**
Neutrophil (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0.70± 0.224	0.90± 0.180*	0.73± 0.192
Monocyte (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0.12± 0.031	0.14± 0.038	0.14± 0.034
Eosinophil (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0.04± 0.018	0.04± 0.022	0.03± 0.016
Basophil (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0.02± 0.014	0.04± 0.019	0.05± 0.023**

<sup>a</sup>Values are expressed as means ± S.D. \* and \*\*Significantly different from the control at p<0.05 and p<0.01.

통계치리는 Table X 및 XI에 나타냈다. Clofibrate 투여에 의해 수컷 랫드의 콜레스테롤 및 중성지질 측정치는 유의성있게 감소하였으며, 암컷 랫드의 경우 고용량 투여군의 콜레스테롤 측정치만 유의성있게 감소하였다.

**병리조직학적 검사**

간, 신장, 비장, 및 부신에 대한 병리조직학적 검사를 수행 결과 각 장기에서 clofibrate 투여에 의한 용량 및 성에 따른 병리조직학적 소견은 관찰되지 않았다 (Table XII).

**Table X.** Clinical chemistry in male F344 rats treated with clofibrate (CF) for 4 weeks

Tests (units)	Control	0.25% CF	0.5% CF
ALB (g/dl)	3.7± 0.25 <sup>a</sup>	4.1± 0.24	4.2± 0.92
ALT (U/L)	42± 4.4	45± 3.8	44± 7.2
AST (U/L)	75± 7.9	80± 9.5	72± 13.7
BUN (mg/dl)	20± 1.3	20± 1.5	21± 2.8
CHOL (mg/DL)	58± 2.5	5.3± 3.6*	46± 7.7**
GLU. (mg/dl)	152± 16.4	176± 26.8	154± 28.9
T.BILI. (mg/dl)	0.6± 0.20	0.0± 0.00**	0.1± 0.11**
T.PROT. (g/dl)	6.7± 0.38	6.4± 0.41	6.4± 0.96
TRIG. (mg/dl)	182± 23.7	68± 12.4**	65± 19.0**
ALP (U/L)	509± 37.4	545± 37.8	510± 94.6
GGT (U/L)	0.59± 0.274	2.95± 0.617**	1.85± 0.280**
CREAT. (mg/dl)	0.8± 0.08	0.7± 0.11*	0.6± 0.14**
CL (meq/l)	96± 0.9	99± 2.7	97± 16.3
LDH (U/L)	180± 67.2	172± 69.2	171± 43.5

<sup>a</sup>Values are expressed as means ± S.D.  
\* and \*\*Significantly different from the control at p<0.05 and p<0.01.

**고 찰**

고지혈증치료제의 이용은 1980년대에 들어와서 급격히 증가하기 시작하였다(Wysowski 등, 1990). 이들 약물로는 cholestyramine resin, cholestipol hydrochloride, clofibrate, gemfibrozil, niacin, acipimox, prubucol, HMG-CoA reductase inhibitor가 있으며(Thomas, 1991), 이중 clofibrate는 1970년대 부터 혈청내의 높은 triglyceride 수

**Table XI.** Clinical chemistry in female F344 rats treated with clofibrate (CF) for 4 weeks

Tests (units)	Control	Low	high
ALB (g/dl)	3.4± 0.24	4.3± 0.14*	3.9± 1.31
ALT (U/L)	43± 6.3	37± 6.3	35± 12.8
AST (U/L)	73± 7.5	84± 16.0	65± 34.0
BUN (mg/dl)	18± 1.4	21± 1.5	17± 5.4
CHOL (mg/DL)	78± 8.1	81± 4.0	62± 18.6**
GLU. (mg/dl)	156± 17.7	156± 21.6	135± 37.3
T.BILI. (mg/dl)	0.1± 0.18	0.0± 0.06	0.1± 0.10
T.PROT. (g/dl)	5.8± 0.41	76.5± 0.26	5.5± 1.64
TRIG. (mg/dl)	73± 12.0	59± 8.7	58± 23.6
ALP (U/L)	411± 34.1	387± 36.5	327± 101.1*
GGT (U/L)	1.35± 0.303	3.47± 0.545**	1.71± 0.433
CREAT. (mg/dl)	0.7± 0.06	0.7± 0.08	0.5± 0.20**
CL (meq/l)	100± 2.2	103± 2.1	84± 25.0*
LDH (U/L)	212± 100.8	150± 62.6	157± 146.8

<sup>a</sup>Values are expressed as means ± S.D.  
\* and \*\*Significantly different from the control at p<0.05 and p<0.01.

**Table XII.** Histopathologic findings of the F344 rats treated with clofibrate (CF) for 4 weeks

Organs and lesions	No. of rats with lesions					
	Males			Females		
	0	0.25%CF	0.5%CF	0	0.25%CF	0.5%CF
<b>Liver:</b>						
bile duct epithelial cell hyperplasia	2/10	3/12	2/13	2/10	3/12	3/13
perivascular lymphocytes infil.	3/10	3/12	3/13	4/10	3/12	4/13
fatty droplets deposition	2/10	0/12	0/13	3/10	1/12	0/13
focal necrosis	0/10	0/12	0/13	0/10	0/12	0/13
<b>Kidney:</b>						
renal calcification	3/10	3/12	3/13	2/10	1/12	2/13
lymphoid cell infil.	3/10	3/12	2/12	4/10	3/12	3/12
simple cortical cyst	2/10	3/12	3/13	1/10	2/12	1/13
hydronephrosis	0/10	0/12	0/13	0/10	0/12	0/13
<b>Spleen:</b>						
pigmentation	2/10	3/12	1/13	1/10	2/12	1/13
congestion	2/10	1/12	1/13	2/10	3/12	2/13
<b>Adrenal gland:</b>						
subcapsular spindle cell hyperplasia	2/10	2/12	3/13	2/10	3/12	1/13
diffuse fatty changes	2/10	1/12	1/13	1/10	1/12	2/13

The number of effective organ is expressed as denominator.

치를 보이는 Type IV와 V의 고지혈증 환자의 치료목적으로 이용되었다(Snesil, 1992). 그 작용기전은 확실하게 알려져 있지 않으나 간장으로부터의 지단백질(lipoprotein)의 분비를 억제하고, 지단백질의 활성을 강화시키고 분변으로의 중성 sterol의 배설의 증가라고 알려져 있다.

또한 clofibrate는 peroxisome을 증가시키는 작용을 갖고 있어 peroxisome proliferator로도 분류되고 있다. 이러한 peroxisome proliferation 작용은 구조적으로는 상관성이 없는 다양한 많은 물질들에서 보이고 있다. 이들 화학물질은 공통적으로 실험동물 간세포의 peroxisome을 증식시키는 작용이 있으며, 비유전 독성의 간 발암물질(nongenotoxic hepatocarcinogen)로 알려져 있으며 많은 연구자들의 관심의 대상이 되고 있다(Kluwe 등, 1983; Numoto 등, 1984; Mochizuki 등, 1982, 1983; Moore 와 Kitagawa, 1986; Popp 등, 1985; Rao와 Reddy, 1987b; Reddy 등, 1980; Reddy와 Rao, 1977; Reddy와 Lalwani, 1983; Reddy와 Qureshi, 1979; Ward 등, 1983, 1986; Williams 등, 1987). 고지혈증치료제로 쓰이는 약물들의 많은 수가 peroxisome proliferation의 기능을 가지고 있다. 1970년대 WHO의 보고에 의하면 clofibrate를 투여한 환자들중 간과 담낭에서의 악성종양에 의한 사망률이 높다고 보고하였다. 또한 clofibrate를 랫드와 마우스에 장기적으로 투여하였을 때 많은 간종양을 유발하였다(Reddy 등, 1980). 이들은 비유전 독성물질임에도 기존의 발암물질의 투여후 병리학적 전암 및 암 병변을 증가시키는 promoter로 인정되고 있다(Mochizuki 등, 1982).

전형적인 유전독성을 갖는 발암물질(genotoxic carcinogen)이 DNA에 직접 반응하는 것과는 달리 peroxisome proliferator는 DNA 손상과 직접적인 연관성은 없으며(Goel 등, 1985; Gupta 등, 1985; Von Daniken 등, 1984), 또한 peroxisome proliferator는 일반적으로 이용되는 Salmonella균 복귀돌연변이시험(Glauert 등, 1984; Kozumbo 등, 1982), 자매염색체 교환분체시험(sister chromatid exchange, SCE)(Linainmma, 1984; Phillips 등, 1984), lymphocyte replication test(Warren 등, 1980)에서 아무런 유전독성을 나타내지 않는 것으로 보고되었다.

Peroxisome proliferator의 발암기전에 대해서는 알려지지 않았으나, Reddy와 Lalwani(1983)는 peroxisomal  $\beta$ -oxidation의 증가에 기인한 과산화수소(hydrogen peroxide)의 생성과 분해의 불균형으로 유발된 산화적 손상이 간 발암을 유발할 수 있다고 제안하였다. clofibrate의 장기투여 후 간종양 조직에서의 과산화수소의 증가(Elliot 등, 1986), lipofuscin의 증가(Lalwani 등, 1981), hydroxy 라디칼의 증가(Elliot 등, 1986) 및 DNA 손상(Fahl 등, 1984)등은 이 가설을 뒷받침해주는 결과라고 생각한다. 또한 항산화제인 ethoxyquin과 butylated

hydroxyanisole은 clofibrate에 의해 유발된 랫드의 간종양 발생을 억제하였다고 하였다(Rao 등, 1984).

한편 Wistar랫드에 clofibrate(0.25%) 또는 DEHP(2%)를 52주와 78주동안 투여한 후 어떠한 간발암성도 관찰하지 못하였으나, 간 종양이 발생하는 Fischer 344랫드에서의 보이는 hepatic peroxisomal  $\beta$ -oxidation, 과산화수소의 함량 등의 생화학적 지표들의 변화와 유사한 결과를 보였다(Tamura 등, 1990). 이는 peroxisome proliferator에 의한 간발암의 기전에 peroxisomal 과산화수소외에 또 다른 인자가 관여한다고 생각된다. 이처럼 peroxisome proliferator에 의한 간종양의 발생은 다양하게 나타난다(Kluwe 등, 1985; Reddy 등, 1980; Tomaszewski 등, 1986). Clofibrate(Svoboda와 Azarnoff, 1979)와 DEHP(Kluwe 등, 1985)는 유의성있는 종양발생의 증가를 일으키나, bezafibrate의 경우에는 어떠한 증가도 나타내지 않았다(Fahimi 등, 1982).

Clofibrate 투여로 인한 특징적인 변화는 암·수 모두 간장무게가 용량 의존적으로 증가하며 이는 peroxisome 및 SER의 증식에서 기인되는 것으로 보고되고 있다(Tanaka 등, 1992). Peroxisome proliferation에 의한 설치류 간발암과정은 활동성의 산소라디칼이 관여한다고 하였다(Reddy와 Lalwani, 1983). Clofibrate의 간발암기전은 정상 또는 발암유발이 되지않은 간세포(normal or uninitiated hepatocytes) 증식을 억제하고, 자발적으로 발암 유발된 간세포(initiated hepatocytes)의 증식을 촉진하는 선택적인 발암과정에 의해서 랫드의 연령증가에 따라 간종양의 발생이 증가하는 것으로 알려지고 있다(Cattley 등, 1991; Tanaka 등, 1992).

대부분의 간발암물질을 조기에 검출하는 지표인자인  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT)(Rao 등, 1982) 또는 GST-P(Ito 등, 1988)에 의해 peroxisome proliferator에 의해 유발된 전암병소는 검출되지 않는 것으로 알려져 있다. Clofibrate에 의한 GST-P 양성 증식소 발현의 현저한 저하는 간전암 병변중 가장 많은 에오신호성 증식소(eosinophilic foci)의 발현저하(phenotypic alteration)에 기인한다고 하였다(Hasegawa 등, 1994). 따라서 에오신호성 증식소는 GST-P 면역조직화학과  $\gamma$ -GT 효소조직화학에 대하여 양성반응을 보이며, 염기호성 증식소(basophilic foci)보다 peroxisome proliferator 발암성에 대한 신뢰성있는 지표인자로 생각된다.

Peroxisome proliferator는 변이원성이나 유전독성을 나타내지도 않으며, 발암유발 및 촉진단계에서 기존의 전암병변 특이지표로는 확인 또는 측정할 수 없는 것으로 알려져 있다(Greaves 등, 1986). 따라서 비유전독성의 peroxisome proliferator가 어떻게 간종양을 유발할 수 있는지가 큰 과제라고 생각한다.

Clofibrate(Rao와 Reddy, 1987a), WY-14,643(Farber, 1992), 그리고 ciprofibrate (Moore와 Kitagawa, 1986; Reddy와 Qureshi, 1979)는 간 변이증식소와 간종양을

일으키며, 어떻게 해서 유전독성을 갖는 발암물질들에서 특이적으로 나타나는 조기변화(early changes)없이 결절과 종양을 유발하는가? 현재까지의 간발암연구의 결과를 종합해 보면, peroxisome proliferator를 포함하여 모든 비유전독성 발암물질의 간종양발생 기전에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것이라고 생각한다(Greaves 등, 1986).

비유전독성 발암물질을 확인할 수 있는 단기시험법은 확립되어 있지 않으며, 발암성의 유무판정은 장기 발암성 시험이 유일한 방법이라고 하였다(Reddy 등, 1992). 모든 peroxisome proliferator는 장기 발암성 시험에서 발암성 양성이 입증되므로, 모든 peroxisome proliferator를 간 발암성의 가능성(potential of hepatocarcinogen)이 있다고 추정하여도 무방하다고 하였다(Reddy 등, 1992).

본 연구의 대상시험 물질로 선정된 clofibrate는 장기 발암성 시험을 위하여는 발암성 양성이어야 하고, 발암 표적장기의 수가 적을수록 실험에 용이하며, 특히 실험자에 대한 독성이 적은 물질이어야 한다. 현재까지의 결과로는 간세포의 peroxisome proliferation에 의한 것으로 생각되는 간비대 소견이외에는 다른 장기에 대한 독성은 보고되어 있지 않다. 실험동물에 clofibrate를 장기간 투여할 때 고려해야 할 사항으로서 약물투여의 용이성과 장기투여시 사망률이 낮아야 하는데 이러한 점을 clofibrate는 모두 만족하는 물질이라고 생각한다. clofibrate는 본 연구결과에서와 같이 발암용량인 0.25% 및 0.5% 모두 상대 간무게비 이외에는 특이한 병리조직학적 소견은 관찰되지 않았다(Tanaka 등, 1992). 육안 소견상 간비대는 간세포의 peroxisome 및 SER 증식에 의한 간세포의 비대와 관련이 있는 것으로 사료된다(Reddy와 Lalwani, 1983).

혈액학적 검사항목인 총백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 혈색소량(HGB), 적혈구용적(PCV), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균혈색소농도(MCHC), 혈소판수(PLT), 림프구수(lymphocyte), 중호성 백혈구수(neutrophil), 단구수(monocyte), 에오신호성 백혈구수(eosinophil), 염기호성 백혈구수(basophil) 등에서 통계학적으로 유의성이 있으나, 생물학적으로 의미가 있는 유의성있는 측정치는 아니며 모두 정상범위를 나타내었다. 혈청생화학적 검사 항목인 콜레스테롤(cholesterol)과 중성지방은 수컷 랫드에서 용량의존적으로 유의성있는 감소를 나타냈다. 또한 혈액학적 및 혈청생화학적 검사 소견상에서도 간 독성의 지표효소인 ALT, AST 측정치에 변화가 관찰되지 않았다. 간세포의 peroxisome 및 SER의 증식을 관찰하기 위하여는 전자현미경을 이용한 간세포의 초미세구조 관찰이 필요하다(Reddy와 Lalwani, 1983).

본 연구결과의 암·수대조군의 간, 신장, 비장, 그리고 부신 등에서 비종양성 병변이 병리조직학적 검사상 관찰되었다. 특히 신장의 피수질 연결부에서 관찰되는 석회침착(renal mineralization)소견은 영양과다 또는 F344

랫드의 유전적인 요인이라고 생각한다(Iwata 등, 1986). 앞으로 이러한 문제를 해결하기 위하여 실험동물 품질향상을 위한 연구가 선행되어야 할 것으로 생각한다.

본 실험에서 혈청생화학적 결과에서 중성지방의 감소와 albumin의 증가, 혈당의 감소는 0.05%, 1.25%의 clofibrate를 투여한 기존의 보고와 일치하였다(Powanda 등, 1976).

본 연구는 신의약·신농약 개발 후보물질에 대한 실험동물을 이용한 장기 발암성 시험법을 확립하기 위하여 선정된 비유전독성 간발암물질인 clofibrate에 대한 4주간 경구 아급성독성시험 결과 주된 표적장기는 간으로 생각되며, 용량의존성의 상대 간무게비 증가가 인정되었다.

## 감사의 글

본 연구는 1993년도 과학기술처의 선도기술개발사업으로 수행한 "화학물질의 안정성 연구과제"의 연구결과입니다.

## 참고문헌

- Butterworth, B. E., Slaga, T. J., Farland, W. and McClain, M. (1991). *Chemically-Induced Cell Proliferation: Implications for Risk Assessment*. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Cattley, R. C., Conway, J. G. and Popp, J. A. (1987). Association of persistent peroxisome proliferation and oxidative injury with hepatocarcinogenicity in female F-344 rats fed di-(2-ethylhexyl)phthalate for 2 years. *Cancer Lett.* **38**, 15-22.
- Cattley, R. C., Marsman, D. S. and Popp, J. A. (1991). Age-related susceptibility to the carcinogenic effect of the peroxisome proliferator Wy-14,643 in rat liver. *Carcinogenesis* **12**, 469-473.
- Cohen, S. M. and Ellwein, L. B. (1991). Genetic errors, cell proliferation and carcinogenesis. *Cancer Res.* **51**, 6493-6505.
- Conway, J. G., Tomaszewski, K. E., Olson, M. J., Cattley, R. C., Marsman, D. S. and Popp, J. A. (1989). Relationship of oxidative damage to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di-(2-ethylhexyl)phthalate and Wy-14,643. *Carcinogenesis* **10**, 513-519.
- Elliot, B. M. and Dodd, N. J. F. and Elcombe, C. R. (1986). Increased hydroxy radical production in liver peroxisomal fractions from rats treated with peroxisome proliferators. *Carcinogenesis* **7**, 795-799.
- Fahimi, H. D., Reinicke, A., Sujatta, M., Yokota, S., Ozel, M., Hartig, F. and Stegmeier, K. (1982). The short- and long-term effects of bezafibrate in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **386**, 111-135.
- Fahl, W. E., Lalwani, N. D., Watanabe, T., Goel, S. K. and Reddy, J. K. (1984). DNA damage related to increased hydrogen peroxide generation by hypolipidemic drug-induced liver peroxisomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7827-7830.
- Farber, E. (1976). The pathology of experimental liver cell cancer. In *Liver Cell Cancer* (H. M. Cameron, D. A. Linsell, and G. P. Warpick, Eds.), pp. 243-277, Elsevier, Amsterdam.

- Farber, E. (1992). Hepatocarcinogenesis: How do peroxisome proliferators relate? *J. Am. Coll. Toxicol.* **11**, 363-367.
- Glauert, H. P., Beer, D., Rao, M. S., Schwarz, M., Xu, Y. D., Goldsworthy, T. L., Coloma, J. and Pitot, H. C. (1986). Induction of altered hepatic foci in rats by the administration of hypolipidemic peroxisome proliferators alone or following a single dose of diethylnitrosamine. *Cancer Res.* **46**, 4601-4606.
- Glauert, H. P., Reddy, J. K., Kenman, W. S., Sattler, D. L., Subbarao, V. and Pitot, H. C. (1984). Effect of hypolipidemic peroxisome proliferators on unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes and on mutagenesis in *Salmonella*. *Cancer Lett.* **24**, 147-156.
- Goel, S. K., Lalwani, N. D., Fahl, W. E. and Reddy, J. K. (1985). Lack of covalent binding of peroxisome proliferators nafenopin and Wy-16, 643 to DNA *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol. Lett.* **24**, 37-43.
- Greaves, P., Irisarri, E. and Monro, A. M. (1986). Hepatic foci of cellular and enzymatic alteration and nodules in rats treated with clofibrate or diethylnitrosamine followed by phenobarbital: Their rate of onset and their reversibility. *J. Natl. Cancer. Inst.* **76**, 475-483.
- Gupta, R. C., Goel, S. K., Earley, K., Singh, B. and Reddy, J. K. (1985). <sup>32</sup>P-Post labeling analysis of peroxisome proliferator-DNA adduct formation in rat liver *in vivo* and hepatocytes *in vitro*. *Carcinogenesis* **6**, 933-936.
- Hartig, F., Stegmeier, K. and Hebold, G. (1982). Study of liver enzymes: peroxisome proliferation and tumor rates in rats at the end of carcinogenicity studies with benzafibrate and clofibrate. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **386**, 464-467.
- Hasegawa, R., Yoshida, T., Mizoguchi, Y., Futakuchi, M., Kim, D. J., Cui, L. and Ito, N. (1994). Phenotypic alteration of hepatocellular foci in rats treated with clofibrate and phenobarbital. *Cancer Lett.* **83**, 89-95.
- Homburger, F., Ito, N. and Sugano, H. (1991). Modification of tumor development in rodents. In *Progress in Experimental Tumor Research*, vol. 33, S. Karger, Basel/New York.
- Hosokawa, S., Tatematsu, M., Aoki, T., Nakanowatari, J., Igarashi, T. and Ito, N. (1989). Modulation of diethylnitrosamine-initiated placental glutathione S-transferase positive preneoplastic and neoplastic lesions by clofibrate, a hepatic peroxisome proliferator. *Carcinogenesis* **10**, 2237-2241.
- Ito, N., Tsuda, H., Tatematsu, M., Inoue, T., Tagawa, Y., Aoki, T., Uwagawa, S., Kagawa, M., Ogiso, T., Masui, T., Imaida, K., Fukushima, S. and Asamoto, M. (1988). Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats-an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis* **9**, 387-394.
- Ito, N., Imaida, K., Hasegawa, R. and Tsuda, H. (1989). Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **19**, 385-415.
- Ito, N., Hasegawa, R., Imaida, K., Masui, T., Takahashi, S. and Shirai, T. (1992). Pathological markers for non-genotoxic agent-associated carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* **64/65**, 613-620.
- Iwata, H., Hirouchi, Y., Inoue, H. and Enomoto, M. (1986). Pathological study on nephrocalcinosis in Fischer 344/Du Crj rats. *Exp. Anim.* **35**, 299-305.
- Kasai, H., Okada, Y., Nishimura, S., Rao, M. S. and Reddy, J. K. (1989). Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator. *Cancer Res.* **49**, 2603-2605.
- Kluwe, W. M., Haseman, J. K. and Huff, J. E. (1983). The carcinogenicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP) in perspective. *J. Toxicol. Environ. Health* **12**, 159-169.
- Kluwe, W. M., Huff, J. E., Matthews, H. B., Irwin, R. and Haseman, J. K. (1985). Comparative chronic toxicities and carcinogenic potentials of 2-ethylhexyl containing compounds in rats and mice. *Carcinogenesis* **6**, 1577-1583.
- Kozumbo, W. J., Kroll, R. and Rubin, R. J. (1982). Assessment of mutagenicity of phthalate esters. *Environ. Health Perspect* **45**, 103-109.
- Lalwani, N. D., Reddy, M. K., Quershi, S. A. and Reddy J. K. (1981). Development of hepatocellular carcinomas and increased peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation in rats fed 4-chloro-6-(2,3-xylindo)-2-pyrimidinylthioacetic acid(Wy-14,643) in the semipurified diet. *Carcinogenesis* **7**, 645-650.
- Linainmma, K. (1984). Induction of sister chromatid exchanges by the peroxisome proliferators 2,4-D, MCPA and clofibrate *in vivo* and *in vitro*. *Carcinogenesis* **5**, 703-707.
- Loury, D. J., Goldsworthy, T. L. and Butterworth, B. E. (1987). The value of measuring cell replication as a predictive index of tissue-specific tumorigenic potential. In *Nongenotoxic Mechanisms in Carcinogenesis, Banbury Report 25*(B.E. Butterworth and J.S. Thomas, Eds.), pp. 119-136, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Marsman, D. S., Cattley, R. C., Conway, J. G. and Popp, J. A. (1988) Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di-(2-ethylhexyl) phthalate and [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio] acetic acid (Wy-14,643) in rats. *Cancer Res.* **48**, 6739-6744.
- Mochizuki, Y., Furukawa, K. and Sawada, N. (1982). Effects of various concentrations of ethyl- $\alpha$ -p-chlorophenoxyisobutylate(clofibrate) on diethylnitrosamine-induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Carcinogenesis* **3**, 1027-1029.
- Mochizuki, Y., Furukawa, K. and Sawada, N. (1983). Effects of simultaneous administration of clofibrate with diethylnitrosamine on hepatic tumorigenesis in the rat. *Cancer Lett.* **19**, 99-105.
- Moore, M. A. and Kitagawa, T. (1986). Hepatocarcinogenesis in the rat: The effect of promoters and carcinogens *in vivo* and *in vitro*. *Int. Rev. Cytol.* **101**, 125-173.
- Numoto, S., Furukawa, K., Furuya, K. and Williams, G. M. (1984). Effects of the hepatocarcinogenic peroxisome-proliferating hypolipidemic agents clofibrate and nafenopin on the rat liver cell membrane enzymes  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase and alkaline phosphatase and on the early stages of liver carcinogenesis. *Carcinogenesis* **5**, 1603-1611.
- Philips, B. J., James, T. E. B. and Gungolli, S. D. (1982). Genotoxicity studies of di(2-ethylhexyl)phthalate and its metabolites in CHO cells. *Mutat. Res.* **102**, 297-304.
- Pitot, H. C. and Dragan, Y. P. (1991). Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J.* **5**, 2280-2286.
- Popp, J. A., Garvey, L. K., Hamm, T. E. Jr. and Swenberg,



- J. A. (1985). Lack of hepatic promotional activity by the peroxisomal proliferating hepatocarcinogen di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Carcinogenesis* **6**, 141-144.
- Powanda, M. C., Henriksen, E. L., Ayala, E. and Canonico, P. G. (1976). Clofibrate-induced alterations in serum pattern. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 785-788.
- Rao, M. S. and Reddy, J. K. (1987a). Phenotypic properties of preneoplastic hepatic lesions induced by peroxisome proliferators in rats. (H.D. Fahimi and H. Sies, Eds.), pp. 263-272, Springer-Verlag, Berlin.
- Rao, M. S. and Reddy, J. K. (1987b). Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **8**, 631-636.
- Rao, M. S., Lalwani, N. D., Sacarpelli, D. G. and Reddy, J. K. (1982). The absence of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity in putative preneoplastic lesions and in hepatocellular carcinomas induced in rats by the hypolipidemic peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis* **3**, 1231-1233.
- Rao, M. S., Lalwani, N. D., Watanabe, T. K. and Reddy, J. K. (1984). Inhibitory effect of antioxidants ethoxyquin and 2 (3)-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole on hepatic tumorigenesis in rats fed ciprofibrate, a peroxisome proliferator. *Cancer Res.* **44**, 1072-1076.
- Reddy, J. K. and Lalwani, N. D. (1983). Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: Evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **12**, 1-58.
- Reddy, J. K. and Qureshi, S. A. (1979). Tumorigenicity of the hypolipidemic peroxisome proliferator ethyl- $\alpha$ -p-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) in rats. *Br. J. Cancer* **40**, 476-482.
- Reddy, J. K. and Rao, M. S. (1977). Malignant tumors in rats fed nafenopin. A hepatic peroxisome proliferation. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 1645-1650.
- Reddy, J. K., Azarnoff, D. L. and Hignite, C. E. (1980). Hypolipidemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature* **283**, 397-398.
- Reddy, J. K., Rao, M. S., and Yeldani, A. V. (1992). Peroxisome proliferation: A biological marker for toxicological evaluation. *J. Am. Coll. Toxicol.* **11**, 349-352.
- Roe, F. J. C. (1989). Non-genotoxic carcinogenesis: Implications for testing and extrapolation to man. *Mutagenesis* **4**, 407-411.
- Sato, K. (1989). Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia. *Adv. Cancer Res.* **52**, 205-255.
- Sato, K., Kitahara, A., Satoh, K., Ishikawa, T., Tatematsu, M. and Ito, N. (1984). The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.(Gann)* **75**, 199-202.
- Snesil, N. R. (Ed.) (1992). *Physicians' Desk Reference*, 46th ed., Medical Economics Company, Montavale.
- Svoboda, D. J. and Azarnoff, D. L. (1979). Tumors in male rats fed ethyl chlorophenoxyisobutyrate, a hypolipidemic drug. *Cancer Res.* **39**, 3419-3428.
- Swenberg, J. A. and Short, B. G. (1987). Influence of cytotoxicity on the induction of tumors. In *Nongenotoxic Mechanisms in Carcinogenesis. Banbury Report 25* (B.E. Butterworth and J.S. Thomas, Eds.), pp. 151-161, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Tamura, H., Iida, T., Watanabe, T. and Suga, T. (1990). Long-term effects of hypolipidemic peroxisome proliferator administration on hepatic hydrogen peroxide metabolism in rats. *Carcinogenesis* **11**, 445-450.
- Tanaka, K., Smith, P. F., Stromberg, P. C., Eydeloth, R. S., Herold, E. G., Grossman, S. J., Frank, J. D., Hertzog, P. R., Soper, K. A. and Keenan, K. P. (1992). Studies of early hepatocellular proliferation and peroxisomal proliferation in Sprague-Dawley rats treated with tumorigenic doses of clofibrate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **116**, 71-77.
- Thomas, J. (1991). Lipid reducing drugs. *Aust. J. Pharm.* **72**, 463-466.
- Tomaszewski, K. E., Azarwal, D. K. and Melnick, R. L. (1986). *In vitro* steady-state level of hydrogen peroxide after exposure of male F344 rats and female B6C3F1 mice to hepatic peroxisome proliferators. *Carcinogenesis* **7**, 1871-1876.
- Von Daniken, A., Kutz, W. K., Jackh, R. and Schlatter, C. (1984). Investigation of the potential for binding of di(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP) and di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) to liver DNA *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **73**, 373-387.
- Ward, J. M., Rice, J. M., Creasia, D., Lynch, P. and Riggs, C. (1983). Dissimilar patterns of promotion by di-(2-ethylhexyl)phthalate and phenobarbital of hepatocellular neoplasia initiated by diethylnitrosamine in B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* **4**, 1021-1029.
- Ward, J. M., Diwan, B. A., Ohshima, M., Hu, H., Schuller, H. M. and Rice, J. M. (1986). Tumor initiating and promoting activities of di-(2-ethylhexyl)phthalate *in vivo* and *in vitro*. *Environ. Health Perspect.* **65**, 279-291.
- Ward, J. M., Hagiwara, A., Anderson, L. M., Lindsey, K. and Diwan, B. A. (1988). The chronic hepatic or renal toxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate, acetaminophen, sodium barbital, and phenobarbital in male B6C3F1 mice: autoradiographic, immunohistochemical, and biochemical evidence for levels of DNA synthesis not associated with carcinogenesis or tumor promotion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **96**, 494-506.
- Warren, J. R., Simmon, V. F. and Reddy, J. K. (1980). Properties of hypolipidemic peroxisome proliferators in the lymphocyte [<sup>3</sup>H]thymidine and Salmonella mutagenesis assay. *Cancer Res.* **40**, 35-41.
- Williams, G. M., Maruyama, H. and Tanaka, T. (1987). Lack of rapid initiation, promoting or sequential syncarcinogenic effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the rat liver carcinogenesis. *Carcinogenesis* **8**, 875-880.
- Wysowski, D. K., Kennedy, D. L. and Gross, T. P. (1990). Prescribed use of cholesterol lowering drugs in the United States, 1978 through 1988. *J.A.M.A.* **263**, 2185-2188.
- Yokoyama, Y., Tsuchida, S., Hatayama, I., Sato, K. (1993). Lack of peroxisomal enzyme inducibility in rat hepatic preneoplastic lesions induced by mutagenic carcinogens: Contrasted expression of glutathione S-transferase P form and enoyl-CoA hydratase. *Carcinogenesis* **14**, 393-398.