

STUDIES OF VARIOUS FACTORS ON INDUCTION OF EXPERIMENTAL HEPATOCARCINOGENESIS IN SPRAUGE-DAWLEY RATS

Ja-Young Jeong, Hyoung-Chin Kim and Yong-Soon Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 440-744, Korea

(Received March 29, 1991)

(Accepted May 1, 1991)

ABSTRACT: This study was carried out to investigate the various factors on induction of experimental hepatocarcinogenesis in Sprauge-Dawley rats. The experimental animals were divided into three Experiment. Experiment I, II and III were began rats with initial age of 6, 16 and 55 weeks, respectively. All Experiment were injected intraperitoneal with diethylnitrosamine (DENA; 200 mg/kg) as an initiator and group 3, 4 of Experiment I, II and III were fed on diet containing 0.02% 2-acetylaminofluorene (2-AFF) as a promoter for 6 weeks. Three weeks after two-thirds partial hepatectomy was performed in group 2, 4 of Experiment I & II and group 3 of Experiment III. All rats of Experimental group were sacrificed for observation at 45 weeks after onset of Experiment. For quantitative analysis, the number & area of neoplastic lesions in the livers were measured with a Color Video Image Analyzer.

The results obtained were summarized as follows:

Decrease of the mean body weight & daily feed intakes caused by neoplastic lesions began at 40 weeks. Altered cell foci and neoplastic nodules of the rats treated with DENA alone persisted for 45 weeks period. The addition of 2-AAF to the diet after administration of DENA enhanced persistence of altered foci or neoplastic nodules and increased the incidence of liver tumours to 58% (Experiment III) ~100% (Experiment I). Partial hepatectomy plays an important role in the initiation or promotion of liver carcinogenesis by DENA and 2-AAF. Four different hepatoma, that is hepatocellular carcinoma, cholangioma, cholangiocellular carcinoma and vascular tumours, were seen in rats. Especially pseudoglandular type of the hepatocellular carcinoma and cystic type of the cholangioma were higher than other patterns. Lung metasatsis were seen in rats that received the carcinogen plus partial hepatectomy independent of age.

Key words: Sprague-Dawley rat, experimental hepatocarcinogenesis, aging rat, hepatocellular carcinoma, cholangioma, cholangiocellular carcinoma, vascular tumor

서 론

간암의 발생율은 세계적으로 지역에 따라 큰 차이가 나타나고 있는데, 동남 아시아나 아프리카 지역은 13%, 서부유럽과 북미는 0.5% (Williams, 1980)에 이르기까지 다양하다. 특히 높은 발생율을 보이는 나라에서는 젊은층의 발생율이 현저히 증가하고 있으며, 남성과 여성의 발생비는 발생 대부분지역에서 2:1 이나 3:1로서 일치하는 경향을 보이고 있다 (Rudon, 1987). 또한 우리나라에서도 간암의 발생율이 증가하는 추세에 있어 간암의 연구는 중요하다고 하겠다.

랫드와 마우스에 있어서의 간암은 생물학적 특성이 사람의 간암과 유사하며, 특히 랫드는 자연적으로 발생된 간암과 화학적으로 유도한 간암의 조직학적 성상이 비교적 일치한다는 사실 (Newberne, 1985)과, 화학적 간발암제를 이용하여 유도할 수 있는 간암의 조직학적 패턴이 간세포 암종(Hepatocellular carcinoma), 담관종 (Cholangioma), 담관세포 암종 (Cholangiocellular carcinoma), 맥관종 (Vascular tumour) 그리고 육종 (sarcoma) 등으로 다양하기 때문에 간암의 기전 연구에 실험동물로서 폭넓게 이용되고 있다.

그러나 랫드의 자연발생 간암은 그 발생율에 있어서 종간에 차이는 있지만, 대략 1~3%로 매우 저조하며 (Russell 등, 1987;) 생존말기에 대부분 발견되기 때문에 간암의 기전연구, 항암성 연구 및 치료 연구에 상당한 제약과 받고 있는 실정이다. 따라서 이러한 한계적 상황을 극복하기 위하여 실험적으로 간암 유발이 폭넓게 시도 되고 있다. 실험적으로 유발시킨 간암의 기원은 1935년 Sasaki와 Yoshida가 경구 및 피하에 o-aminoazotoluene (AAT)을 적용시켜 최초로 간암을 유발 하는데 성공하였다. 그후 1937년 Kinoshita는 p-dimethylaminoazobenzene (DAB)이 AAT보다 더 높은 발암성을 가지고 있는 것을 보고 하였으며, 그후 수많은 간발암제가 보고되었다. 인체 및 동물체에 간암을 유발할 수 있는 화학물질로서는 Diethylnitrosamine(DENA; Rabes 등, 1972), Dimethylnitrosamine (DMN; Magee 등, 1956), 2-Acetylaminofluorene (Peraino 등, 1975), 3'-methyl-4(dimethylmaino)azobenzene(Farber, 1955) 등이 있으며, 간암을 단독으로는 유발하지 못하나, 촉진시켜 주는 물질로는 Phenobarbital (Ito 등, 1986), Estrogenic steroids (Goldfarb, 1976), Dichlordiphenyltrichloroethane (DDT; Peraino 등, 1975) 그리고 Capsaicin (장 등, 1988) 등이 보고되어 있다. 이외에도 방사선 (Cairns, 1981), Hepatitis B Virus (Leuschner 등, 1988), 천연 생산물인 곰팡이 독소 Aflatoxin B₁과 식물성독소 (Miller와 Miller, 1976), 담즙산 (Tsuda 등, 1984) 및 간흡충(Belamaric, 1973) 등에 대해서 발암성 또는 발암촉진작용이 보고되어 있으며, 이들 물질에 대한 인간과 동물의 노출기회는 약물, 주사, 식품, 그리고 환경적 요인등에서 가능하며 (Cairns, 1981), 그에 따른 위험성은 날로심각해 지고 있다.

한편, 화학적 발암이 유도되는 기전에 관한 연구로는 피부의 발암연구에서 1941년 Rous등은 2단계 이론 (Two-step theory)을 보고하였다. 즉 토끼의 귀에 tar를 적용시키는 과정을 유발단계 (Initiation stage) 종양발현을 촉진시키기 위하여 상처를 내준 과정을 촉진단계(Promotion stage)란 용어를 각각 처음으로 사용하였다. 그후 피부의 화학적 유발암의 계속된 연구 (Boutwell, 1964)가 발암의 2단계 이론을 뒷받침 해주고 있으며, 이외에도 세포의 증식단계가 필요함을 보고 하였다 (Goldfarb, 1961). 또한 이와같은 2 단계이론이 간의 화학적 발암화에도 적용 된다는 사실이 보고 되었다. (Tsuda 등, 1984).

그후의 연구에서 이러한 2단계 이외에 소위 진행과정 (Berenblum 등, 1979)이라는 것이 필요하며, 유발과 촉진의 작용을 증폭시키기 위한 처치, 즉 간부분 절제술 (Hasegawa 등, 1986), 세포괴사 및 세포장해등

(Solt 등, 1983)이 적절한 기간에 필요시되며, 이러한 각각의 단계를 포함하여 현재는 화학적 유발암의 다단계 이론 (Multi-step theory)이 정립되었다 (Nowell, 1986; Williams와 Weisburger, 1986; Farber, 1984).

이와같이 실험적 유발간암의 각 단계와 기전이 밝혀지면서 좀더 이른 시기에, 짧은 기간의 발암제 노출에 의해, 확실한 간암의 유도를 위한 생체내 연구가 시도 되었다 (Ito 등, 1980; Solt와 Farber, 1976).

또한 실험적으로 간암을 유발하는데 있어 중요한 영향을 미치는 요인중 하나는 숙주의 연령이라 할 수 있다. 일반적으로 암은 만성적 질병으로서 자연발생암은 숙주의 연령과 비례되어 노년기에 다발하나 (Anisimov, 1981), 화학적으로 유발시키는 암에 있어서 영향을 미치는 숙주의 연령에 대한 견해는 상당한 논란의 대상이 되어 오고있다. 즉 Peto 등 (1975)은 화학적 발암과 숙주의 연령과는 무관계함을 보고하였고, 나이드 동물에서 화학적 발암의 발생이 증가 된다는 보고 (Ward 등, 1988; Anisimov, 1981)와 이와는 반대로 숙주의 연령이 증가 할수록 유발되는 발암율이 떨어진다는 (Drew 등, 1983; Williams와 Weisburger, 1986)는 등의 각각의 주장이 엇갈리고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 간암의 세포 및 분자적 차원에서의 연구, 항암성 및 치료방법의 연구를 위하여, 필요한 랫드의 간암을 발현시킬 목적으로 화학적 간암 유발에 영향을 미칠 가능성이 있는 몇가지 요인들을 변화시켜 가면서 가장 짧은 기간에 악성종양이 높은 발생율로 나타날 조건을 찾아 간암의 모델동물을 제시 하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

실험동물

서울대학교 실험동물 사육장으로 부터 Sprague-Dawley 수컷 랫드 5주령, 15주령, 그리고 54주령을 각각 60마리씩 분양받아 사용하였다. 1주동안 실험실 환경에 순응케 하기 위하여 예비사육시킨 후 건강하다고 판단되는 6주령 (체중범위; 120~150 g)과 16주령 랫드 (체중범위; 390~460 g)를 각각 50마리씩, 그리고 55주령 랫드 (체중범위; 450~520 g)를 40마리 골라 실험에 사용하였다.

예비사육 및 전 실험기간중 사육실 환경은 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 10\%$ 를 유지하였고, 자연채광하에서 실험 전 기간에 걸쳐 통상적인 깔집을 간 랫드용 케이지 (Polycarbonate, $26 \times 24 \times 18$ cm)에 6주령과 16주령은 각각 3마리씩, 그리고 55주령은 2마리씩 수용하였다.

실험동물용 사료(제일사료)는 펠렛사료와, 분말사료(6주간, 축진 물질 투여기간)를 사용하였고, 식수는 신선하게 충분히 공급하였으며, 암모니아 가스의 배출을 위하여 매일 통풍시켰다.

실험설계 및 각군의 처치

실험 I에서는 6주령의 랫드를 사용하였으며, 실험 II에서는 16주령의 랫드를 그리고 실험 III에서는 55주령의 랫드를 각각 사용하였다. 한편, 실험 I과 II의 랫드는 모두 4개군으로 실험 III은 제 2군을 생략한 3개군으로 나누었으며 (Fig. 1), 각 실험 처치군의 모든 랫드에 실험 개시일에 강력한 간암 유발물질로 알려진 Diethylnitrosamine (DNA, Sigma Chemical Co., USA)을 생리식염수에 용해시켜 체중 kg당 200 mg씩 복강내로 1회 투여 하였다 (Solt와 Farber, 1976). 각 실험의 제 1군은 실험종료일인 45주까지 유발물질인 DNA만 실험개시일에 복강주사 하고 아무런 처치없이 기초사료만 급여시킨군으로서, 다른 3개군의 음성 대조군으로 설정하였다. 제 2군은 실험개시(DNA 투여) 3주후에 간변화의 증폭을 위하여 랫드 간의 2/3 (67%, 좌우중심엽 및 좌측외엽)를 절제 (Higgins와 Anderson 1931)하여 줌으로써 유발 시킨후 간부분절제가 발암에 어떤 영향을 미치는지를 알아보았다. 제 3군은 실험개시 제 2주부터 8주까지 6주동안 유발된 세포의 선택적 증식을 위하여, 간암 촉진물질인 2-Acetylaminofluorene (2-AAF, Sigma Chemical

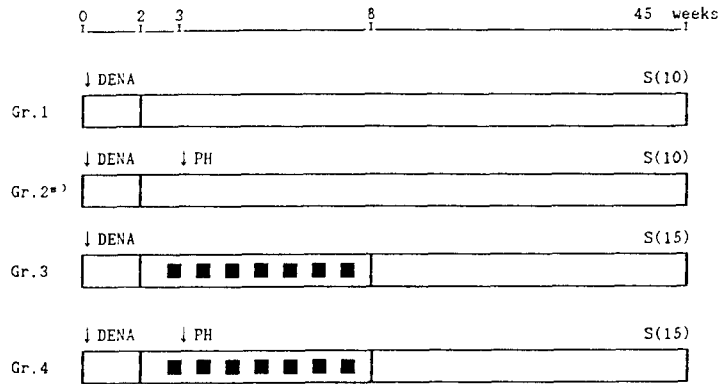


Fig. 1. Design of experiment I*, II**, and III***.

- ↓ DENA : Diethylnitrosoamine 200 mg/kg B.W., I.P.
 ↓ PH : 67% Partial hepatectomy
 S () : No. of sacrificed animals
 a) : Group 2 was omitted in Experiment III
 [] : Basal diet
 [■ ■ ■] : Basal diet containing 0.02% 2-Acetylaminofluorene
 * : Initial age of experimental rats was 6 weeks old
 ** : Initial age of experimental rats was 16 weeks old
 *** : Initial age of experimental rats was 55 weeks old

Co., USA)을 0.02%가 되도록 사료에 혼합하여 급여하였다. 제 4군에는 본실험의 양성 대조군으로서 유발과 촉진 그리고 세포의 증식을 위한 간 부분 절제술까지 처치 하였다.

체중 및 사료섭취량 측정

전 실험기간동안 실험동물의 체중변화를 관찰하기 위하여, 실험개시일과 이후 매주 한번씩 랫드의 체중을 측정하였다. 그러나 간부분 절제술을 받는 동물이 있는 3주째에는 간부분 절제술 직전에 체중을 측정하였다.

랫드의 체중 kg당 1일 사료섭취량을 계산하기 위하여 체중측정과 병행하여 주당 1회 사료섭취량을 측정하였다. 사료통에 충분한 양의 사료를 채워 무게를 측정한 후 급여하고, 다음날 같은 시각에 남은양을 측정하여 사료섭취량을 계산하였다.

임상관찰과 장기의 처리

전 실험기간동안 매일 하루에 두번씩 일정한 시간(오전 10시, 오후 10시)에 실험동물의 피모, 운동상태, 외양, 분비물의 유무, 및 변의 상태등을 관찰하였고, 실험개시 45주후 부검하여 간을 중심으로 전장기에 대한 육안소견을 기록하였다. 또한 부검 하루전에 전 개체를 절식 시켰으며, 부검후 간을 포함한 전 장기를 적출하였으며, 특히 간장, 신장, 부신, 고환, 비장 및 뇌등의 무게를 측정하여 체중에 대한 각각의 무게비를 계산하였다.

실험개시 30주 이후에 폐사되는 랫드는 결과처리에 포함하였고, 30주 이전에 폐사되는 랫드로는 치사율을 계산 하였다.

광학 현미경의 관찰

간장은 간부분 절제술을 한 처치군을 고려하여 우측외엽 (right lateral lobe) 및 미상엽(caudate lobe)에서 2~3 mm 두께로 간조직을 채취하였고, 간암으로 부터 전이된 병소를 알아보기 위하여 신장, 폐, 비장, 그리고 고환 등을 중심으로 일정부위의 조직을 역시 2~3 mm 두께로 잘라 10% phosphate buffered formaline에 고정한 후 일반적인 파라핀 절편을 만들어 Hematoxylin 및 Eosin 염색을 하여 병변을 관찰하였다. 또한 간장의 경우에서 글리코겐의 함량과 mucin의 존재여부 등을 알기 위하여 PAS(Periodic Acid-Shiff reaction) 염색을 하여 병변을 관찰하였다. 발생한 간암과 전암성병변의 양적 분석을 위하여 Color Video Image Analyzer (Cambridge Instrument, Q520)를 이용하여 암과 전암성병변의 수와 면적을 계산하였다.

자료의 통계처리

Student's t-test를 이용하여 실험결과치를 대조군의 결과치와 비교, 분석하였다. 전 항목에 대하여 공히 5% ($p < 0.05$), 1% ($p < 0.01$) 및 0.1% ($p < 0.001$)의 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

체중변화 및 사료섭취량

실험 II와 실험 III에서는 간암 유발물질인 DENA투여와 간부분 절제술, 그리고 2-AAF 투여의 영향으로 실험초기에 현저한 체중의 감소 (Fig. 3, 4)를 보이고 있으나, 실험 I에서는 체중증가 폭만 둔화 되었을 뿐 감소는 없었다 (Fig. 2).

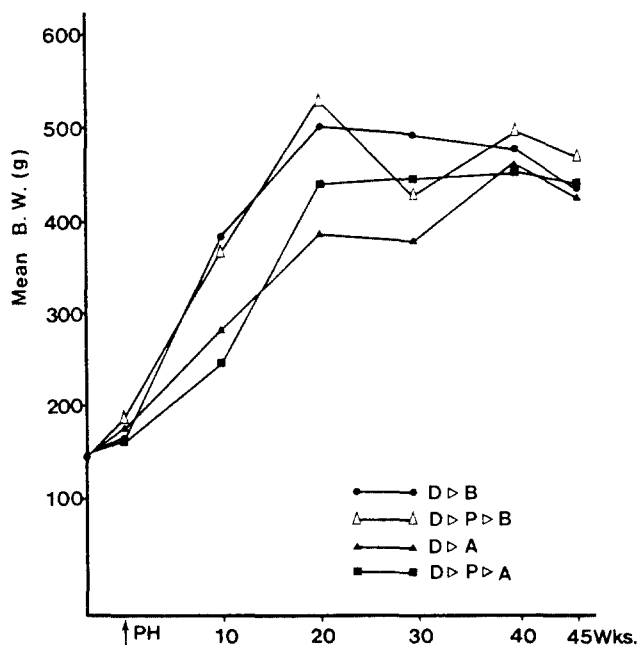


Fig. 2. Mean body weight changes of the 6 weeks old rats of Experiment I.

실험 I에서는 20주까지 처치와 관계없이 지속적인 체중의 증가를 보였으나 그 후에는 어느정도 증가율이 완화되다가 40주를 계기로 전처치군에서 체중의 감소를 보였다 (Fig. 2). 실험 II와 III에서는 3주까지 체중이 급속히 감소 되었으나, 그후 40주까지는 전처치군에서 지속적인 체중증가를 나타냈으며, 40주 이후는 다시 체중감소 현상을 나타내었다 (Fig. 3, 4).

1일 평균사료 섭취량은 같은 실험에서의 유의차는 인정되지 않았다.

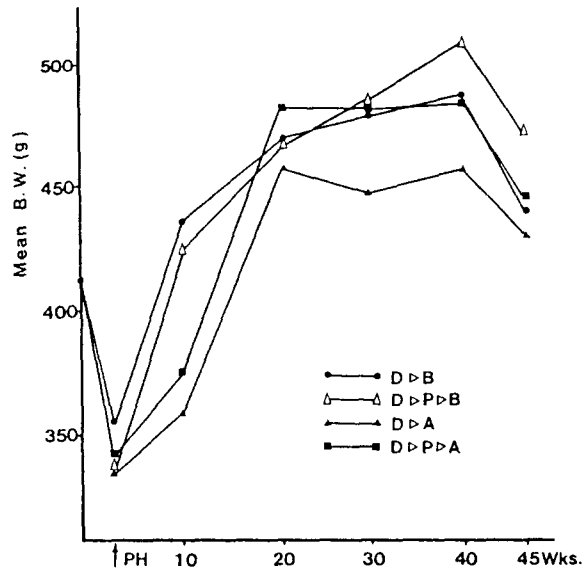


Fig. 3. Mean body weight changes of the 16 weeks old rats of Experiment II.

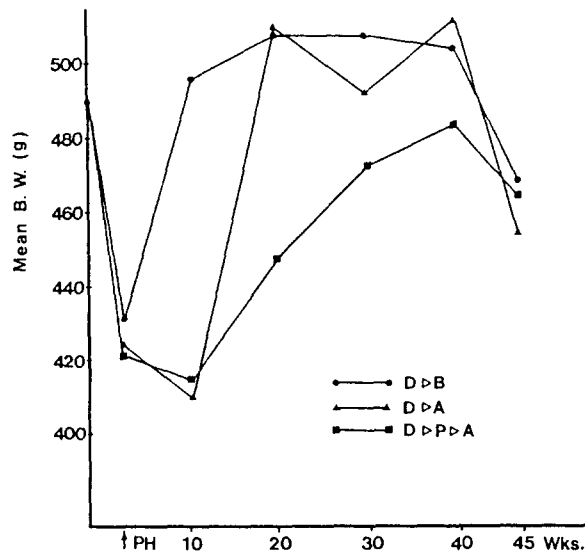


Fig. 4. Mean body weight changes of the 55 weeks old rats of Experiment III.

임상관찰과 장기의 육안소견

실험개시일에 DENA 투여에 의한 특이한 임상적 변화는 관찰할 수 없었으며, 실험개시 2주후에 2-AAF 투여군과 간부분 절제술을 한 모든 실험군에서 피모가 거칠고, 경직되어 있는 모습을 볼 수 있었으며, 이러한 양상은 2-AAF의 투여가 끝난 후에도 지속되다가 회복되는 것을 관찰 할 수 있었다. 그후에 정상적인 성장을 계속하다가 실험개시 30주가 넘기 시작하면서, 개체의 외양은 피모가 다시 거칠어지기 시작하였고, 침울, 호흡곤란, 활동성의 둔화 등이 현저하게 나타났으며, 사료의 섭취량도 줄어들었고, 등을 arch형으로 굽힌 상태로 잠을 자는 것이 여러 개체에서 관찰되었다.

부검시에는 간장 표면에 육안적으로 결절과 반점이 거의 전처치군에서 관찰 되었으며, 특히 전실험 제 3군과 제 4군에서 현저했다. 간 표면에 보이는 결절은 grayish white 또는 yellowish-white color의 경도가 부드러운 결절이 간표면에 용기되어 있었다.

결절의 크기는 직경이 수 mm의 크기에서 3 cm에 이르기 까지 다양하였다 (Photo 3). 결절의 분포정도는 어느 특정엽에만 분포하지 않고, 전엽에 산재해 있었으며, 한편 간부분 절제술을 해준 군에서는 간변연이 둔탁하였고, 종창감을 주는 정도로 증식되어 있었다 (Photo 2). 몇몇 개체에서 엽간 유착도 관찰 되었다. 결절의 직경이 1 cm 이상되는 황백색 결절의 단면은 한계가 명확한 황백색 물질로차 있는 경우와, 한계가 불명확하면서 주위 간조직보다 다른 색조를 보였던 두 종류가 있었다. 한편 실험 II와 실험 III의 제 3군에서 특히 다발한 병변으로서 수포성 병변을 관찰 할 수 있었는데 (Photo 1), 그 크기는 수 mm로 작았다. 그밖에 액상물질을 함유하는 검은 반점이 다수 산재해 있었다 (Photo 2).

폐에 있어서의 육안소견은 황백색의 엷은 색조를 보였으며, 전이에 의한 폐암의 병변으로 포도송이양의 결절들이 다수 관찰 되었고 (Photo 12), 몇몇의 개체에서 상당히 위축되어 있는 소견이 보였다. 폐의 육안소견에 있어서 처치군에 따른 특징은 없었다. 신장의 경우 간의 mass와 비슷한 황백색의 부드러운 경도를 가진 결절이 신장의 양끝에 위치하고 있는 소견이 특히 실험 II와 실험 III의 제 3군과 제 4군에서 많이 관찰되었다. 이 병변의 활면은 수양감을 보이는 황백색의 한계가 뚜렷한 물질들로 차있었다 (Photo 4).

비장의 경우는 한 개체에서 거의 정상보다 3~4 배가 비대된 예를 볼 수 있었다. 기타 다른 장기에서는 종양성 결절이나, 특이할 만한 육안소견은 발견할 수 없었다.

치사율과 체중에 대한 간의 무게비

치사율과 체중에 대한 간의 무게비는 Table 1과 같다. 실험 III군에서 실험 I과 실험 II보다 높은 치사율을 보이고 있으며, 특히 실험 III에서 제 4군의 치사율이 53%에 달하는 것으로 나타났다. 또한 제 3군에서 보면 연령의존형으로 실험 I, 실험 II, 그리고 실험 III에서의 치사율은 각각 20%, 40%, 그리고 46.7%에 달하였다.

부검시 측정된 최종 간의 무게에 대한 결과는 같은 처치군에서 제 1군의 실험 II와 실험 III, 제 3군의 실험 III, 그리고 제 4군의 실험 II가 각각 실험 I에 비하여 유의차 ($p < 0.01$)를 보이고 있으며, 제 3군의 실험 II와 제 4군의 실험 III 역시 실험 I에 비하여 현저한 유의차 ($p < 0.001$)를 보였다.

체중에 대한 간무게비는 같은 처치군에서의 연령에 따른 효과를 살펴보면, 제 1군에서 실험 I과 실험 II는 0.1%의 유의수준으로, 실험 I과 실험 III은 1%의 유의수준으로 각각 실험 I이 높게 나타났다. 제 2군에서 실험 I이 실험 II에 비하여 높은 유의수준 ($p < 0.001$)으로 증가하고 있으며, 제 3군에서는 실험 I이 실험 III에 비하여 높은 유의수준을 나타내고 있다 ($p < 0.001$). 제 4군에서는 실험 I에 대하여 실험 II와 실험 III이 현저한 유의차 ($p < 0.001$)가 나타났다.



Photo 1. Gross finding of multiple hepatoma. Note yellowish-white or greyish-white tumour masses of irregular protuberant. DENA & 2-AAF treatment.



Photo 2. Gross finding of multiple hepatoma. Note yellowish-white or greyish-white tumour masses of irregular protuberant. DENA & 2-AAF treatment in hepatectomized rat.

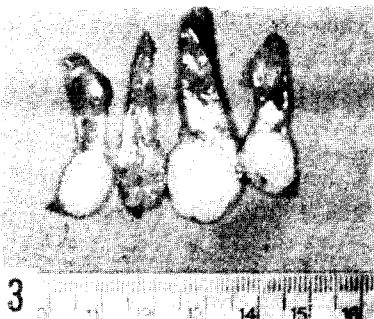


Photo 3. Cut surface of hepatoma of different sizes separated from surrounding liver tissue or not. DENA and 2-AAF treatment.

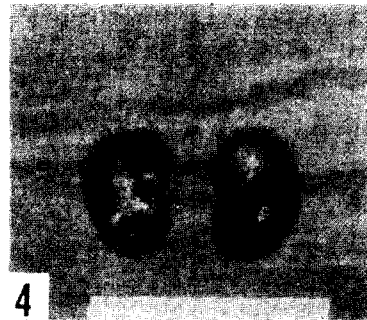


Photo 4. Gross finding of multiple masses of kidney. DENA & 2-AAF treatment in hepatectomized rat.

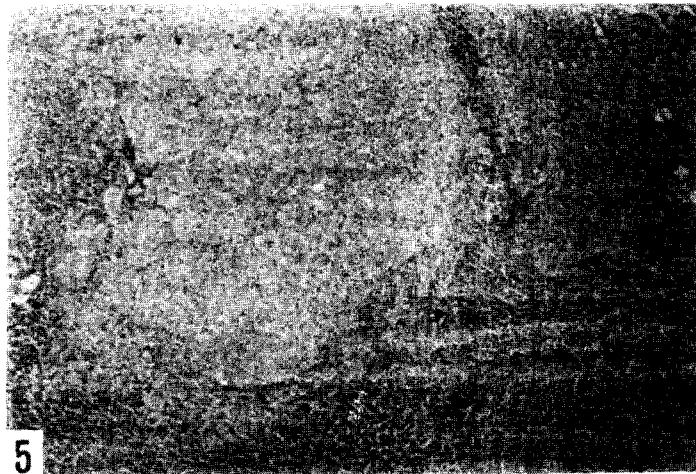


Photo 5. Hyperplastic nodule composed of proliferating hepatocytes. Most components of the normal liver architecture are retained and there is compression of surrounding parenchyma. DENA alone treatment. H&E; $\times 40$.



Photo 6. Magnification of cells within the hyperplastic nodule showing marked polymorphism of the neoplastic hepatocytes. DENA alone treatment. H&E; $\times 200$.



Photo 7. Well-differentiated hepatocellular carcinoma composed of trabeculae, one to two cells thick, separated by dilated sinusoidal spaces. DENA & 2-AAF treatment. H&E; $\times 100$.



Photo 8. Pseudoglandular type of the hepatocellular carcinoma. Note different size of the gland-like structure. DENA & 2-AAF treatment in hepatectomized rat. H&E; $\times 100$.

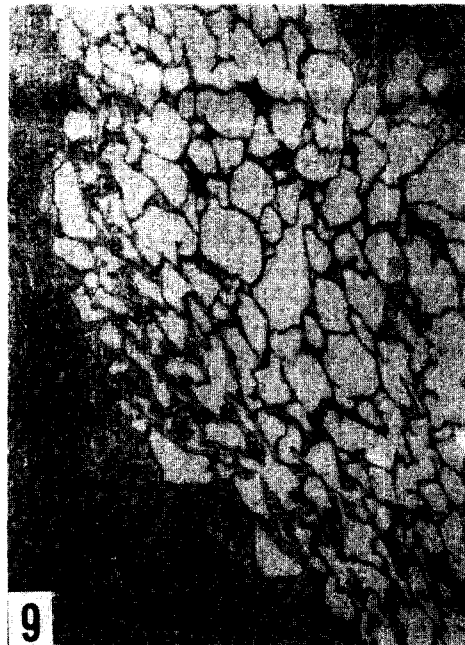


Photo 9. Cystic cholangioma consisting of cystic structures, with varying greatly in diameter, lined by extremely flattened epithelial cells. DENA & 2-AAF treatment in hepatectomized rat. H&E; $\times 100$.



Photo 10. Cholangiocellular carcinoma showing glands lined by a single layer of neoplastic epithelial cells. DENA & 2-AAF treatment in hepatectomized rat. H&E; $\times 100$.



Photo 11. Vascular tumour formed by liver cell cords penetrated into the vascular lumen. Within the lumina of the vessel neoplastic endothelial cells can be seen. DENA & 2-AAF treatment in hepatectomized rat. H&E; $\times 100$.

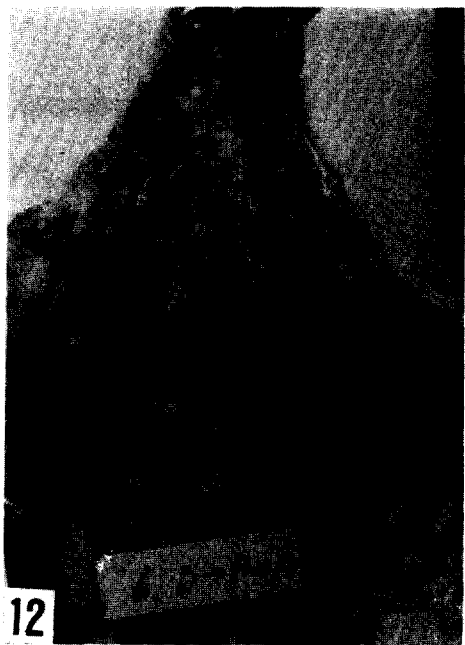


Photo 12. Macroscopic findings of pulmonary metastasis of a hepatocellular carcinoma. Note a number of small or large tumour masses in the thoracic cavity. DENA & 2-AAF treatment in hepatectomized rat.



Photo 13. Pulmonary metastasis of a hepatocellular carcinoma. Within the lumina of the alveoli neoplastic hepatic cells can be seen. DENA & 2-AAF treatment in hepatectomized rat. H&E; $\times 200$.

Table 1. Mortality and Liver/Body Weight Ratio

Treatment	Mortality (%)			Final Liver Weight (g)			Final Body Weight (g)			Liver/Body Weight (%)		
	EI	EII	EIII	EI	EII	EIII	EI	EII	EIII	EI	EII	EIII
DB	1/10	1/10	2/10	17.8	10.7*	12.8*	577.4	439.3	468.9	3.08	2.33**	2.60
	a)/b)			±1.5	±0.1	±0.8	±14.9	±44.2	±28.6	±0.3	±0.1	±0.3
DPB	2/10	0/10	·	21.7	11.6**	·	575.5	473.0	·	3.75	2.33**	·
				±1.4	±1.0		±26.8	±37.3		±0.4	±0.1	
DAB	3/15	6/15	7/15	16.0	14.6	12.1*	461.1**	427.9	464.0	3.38	3.13***	2.60**
				±1.4	±2.3	±1.5	±26.7	±38.4	±40.4	±0.3	±0.2	±0.1
DPAB	5/15	5/15	8/15	30.8***	16.2*	14.1**	539.1	441.2	456.9	6.11*	3.56**	3.12**
				±2.0	±1.6	±1.5	±40.4	±26.3	±31.8	±0.3	±0.5	±0.8

Each values are mean±S.D.

· : /Not examined

a) : Initial No. of experiment

b) : No. of dead animal

D : DENA 200 mg/kg B.W., I.P. at onset of experiment

P : 67% partial hepatectomy at 3 weeks of experiment

B : Basal diet

A : Basal diet containing 0.02% 2-AAF for 6 weeks

EI : Experiment I, EII: Experiment II, EIII: Experiment III

* : Significantly different ($p < 0.01$) from Experiment I

** : Significantly different ($p < 0.001$) from Experiment I

*** : Significantly different ($p < 0.001$) from DENA→BASAL treated group

광학 현미경 관찰조건

전 실험군에서 전암성병변은 제 1군과 제 2군에서, 그리고 간암은 제 3군과 제 4군에서 뚜렷이 관찰되었다. 제 1군과 제 2군에서 관찰되는 전암성 병변으로는 호산성, 또는 호염성 증식결절과 담관증식이었다. 증식결절의 광학현미경적 소견은 주위 간실질 세포를 위축시키면서, 한계가 뚜렷한 원형의 상태로 크기는 다양하게 나타났으며, 다발적으로 산재해 있는 것이 관찰되었다 (Photo 5). 특히 호산성 세포로 구성되어 있는 증식결절 내의 세포들은 명료한 핵을 중앙에 가지면서 세포질 내가 공동현상을 나타내며, 정상 간세포보다 훨씬 큰 특징을 보였다 (Photo 6). 한편 비교적 드물게 출현되는 호염성 결절의 구성 세포는 크기가 다양하며, 핵의 형태와 크기는 비교적 일정하였다. 또한 담관암의 초기병변이라고 볼 수 있는 담관상피는 줄을 지어 증식하였으며, 담관양의 내강을 갖는 구조물 (cystic-like)로 발육하였다. 이러한 내강을 구성하는 종양세포는 다양한 크기를 가지는 단층 편평상피로 구성 되어 있었다 (Photo 10).

본 실험에서 유발된 간암의 조직학적 패턴으로는 간세포 암종, 담관종, 담관세포 암종 및 맥관종이었다 (Table 3). 이들 각각에 대한 조직학적 소견은 간세포 암종의 경우 trabecular type와 pseudoglandular type (adenohepatoma)으로 관찰되었다. Trabecular type는 대체적으로 1~2개의 종양세포의 cords로 trabecular를 구성하였으며 (Photo 7), 정상적인 간염성 구조가 상실되어 있었다. 한편, 크기의 차이는 있으나, 지방적이 미만성으로 또는 국소적으로 존재하는 것을 관찰할 수 있었다 (Photo 7). Pseudoglandular type은 다양하게 분화된 trabecular type의 구성세포와 밀접하게 관련되어 있었으며, trabecular 구조가 국소적으로 병합하여 넓이가 다양한 내강을 가진 선양의 구조가 관찰되었다 (Photo 8).

담관종은 simple type과 cystic type으로 관찰되었으며, 이들의 조직학적 구성세포들은 거의 유사하였다. 단지 cystic type에서 선구조의 내강이 현저히 확장되어 나타나는 차이점이 있었다 (Photo 9).

담관세포 암종을 구성하는 세포들은 대체로 형태나, 크기에서 큰 변이를 보이지 않는 것으로 관찰되었다 (Photo 10). Gland를 구성하는 내피세포는 cuboidal에서 cylindrical에 이르기 까지 다양한 부정형의 단층세포로 이루어져 있으며, 드물게는 내강내에 PAS-positive한 mucus를 관찰할 수 있었다. 한편 화학적으로 유발시키기 어려운 것으로 알려져 있는 맥관종도 관찰되었다. 이의 광학 현미경적 소견은 혈관 내피세포의 과도한 증식을 관찰할 수 있었는데, 간 실질내로 증식하여 들어가고 종양성 내피세포는 정상내피세포보다 크며 편평하고, 큰 핵소체를 가진 핵상을 나타내었다. 또한 괴사성 내피세포로 꼭 채워진 단단한 복합체들이 형성되어, 혈관내강에 존재하는 것도 관찰되었다 (Photo 11).

간암으로 부터 전이된 암으로는 폐에서 관찰할 수 있었다 (Table 3). 즉 폐조직 내에서 암성 간세포의 증식소견을 관찰할 수 있었다 (Photo 13).

간암과 전암병변의 수와 면적

각 실험군이 간조직 1 cm² 당 간암과 전암병변의 수와 면적 (mm²)은 Table 2와 같다.

전실험의 제 1군에서 간암과 전암병변의 수는 유의성이 인정되고 있지않으나, 면적을 살펴보면 실험 III에서 높은 유의성 ($p < 0.01$)이 인정되었다. 제 2군과 제 3군의 수와 면적에 대하여는 현저한 유의수준 ($p < 0.001$)으로 실험 I에서 높게 나타났다. 제 4군의 면적에 있어서는 실험 I의 유의수준이 현저히 높게 ($p < 0.001$) 인정되었으나, 숫적인 차원에서는 실험 II와 실험 III에 비하여 유의수준이 낮게 ($p < 0.001$) 나타남을 알 수 있었다.

또한 전체 간에서 차지하는 간암과 전암성 병변에 대한 백분율을 Fig. 5에 나타내었다. 역시 같은 처

Table 2. Number and Total Area of Neoplastic Lesions

Treat- ment	Effective No. of Rat			No. of Neoplastic Lesions/Liver(cm ²)			Total Area of Neoplastic Lesions(mm ²)/Liver(cm ²)		
	EI	EII	EIII	EI	EII	EIII	EI	EII	EIII
DB	9	9	8	22.3 ±3.75	22.6 ±3.51	18.6 ±2.57	0.61 ±0.13	0.59 ±0.14	0.88** ±0.17
DP	9	10	·	45.5*** ±8.52	27.4 ±5.59	·	4.14*** ±0.8	0.69 ±0.17	
DAB	12	9	8	55.7 ±9.31	54.8 ±9.77	32.7*** ±8.12	6.76*** ±1.2	2.46 ±0.9	0.90 ±0.1
DPAB	10	10	7	23.3*** ±1.37	50.9 ±9.46	32.4 ±5.67	18.71*** ±1.9	5.06 ±0.2	6.89* ±0.8

Each values are mean±S.D.

· : Not examined

D : DENA 200 mg/kg B.W., I.P. at onset of experiment

P : 67% partial hepatectomy at 3 weeks of experiment

B : Basal diet

A : Basal diet containing 0.02% 2-AAF for 6 weeks

EI : Experiment I, EII: Experiment II, EIII: Experiment III

* : Significantly different ($p < 0.01$) from Experiment II

** : Significantly different ($p < 0.01$) from other two Experiments

*** : Significantly different ($p < 0.001$) from other two Experiments

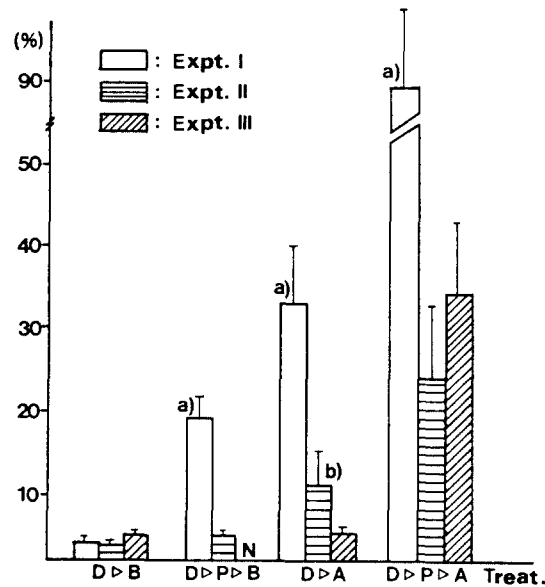


Fig. 5. Ratio of neoplastic and hepatoma area/total liver.

Experiment I: Initial age of experimental rats was 6 weeks old

Experiment II: Initial age of experimental rats was 16 weeks old

Experiment III: Initial age of experimental rats was 55 weeks old

N: Not examined

a): Significantly different ($p < 0.001$) for Experiment II & III

b): Significantly different ($p < 0.001$) for Experiment III

치준에 있어서 실험 I에서 제 1군을 제외하면 현저히 높게 ($p < 0.001$) 나타남을 알 수 있었다. 특히, 실험 I의 제 4군에서 89%에 달하는 정도의 병변이 관찰 되었다.

간암의 발생을 및 조직학적 분류

각각의 실험과 처치군에서 발생한 간암의 발생율과 그 조직학적 형태는 Table 3과 같다.

간암의 발생율은 매우 높게 나타났는데 실험 I, II 그리고 실험 III의 제 4군에서 각각 100%, 90% 그리고 85.7%에 이르는 것을 알 수 있었다. 전 실험에서 비교적 제 3군과 제 4군에서 간암과 전암병변의 발생율이 높게 나타난 것을 관찰할 수 있었다.

본 실험에서 유도한 간암이 조직학적 형태의 분류를 살펴보면, 간세포암종 (Hepatocellular carcinoma), 담관종 (Cholangioma), 담관세포암종 (Cholangiocellular carcinoma), 그리고 맥관종 (Vascular tumour) 등 이었다. 특히 간세포암종에서는 pseudoglandular type, 그리고 담관종의 경우는 cystic type의 발생율이 높았고, 담관세포 암종의 경우에는 실험 I과 II의 제 4군에서 유의성이 높게 ($p < 0.001$) 나타났다. 또한 맥관종은 실험 I과 II에서는 제 4군에서만 관찰되었고, 실험 III에서는 제 3군과 4군에서 각각 한 개체에서 발견 되었다.

Table 3. Type of Hepatoma and Metastasis

Experiment Treatment	I				II				III			
	DB	DPB	DAB	DPAB	DB	DPB	DAB	DPAB	DB	DPB	DAB	DPAB
Effective No. of rats.	9	9	12	10	9	10	9	10	8	·	8	7
Liver tumors (No. of incidence)	2	4	7	10	1	4	5	6	2	·	4	4
Neoplastic lesions												
Clear cell	8	9	12	10	5	7	9	10	8	·	8	7
Eosinophilic	7	9	12	10	7	7	8	10	7	·	8	7
Basophilic	7	8	12	10	8	8	9	10	8	·	8	7
Hepatoma												
Hepatocellular carcinoma												
trabecular type	0	3	5	7	1	4	3	4	1	·	2	2
pseudoglandular type	2	3	7	8	0	4	5	6	6	·	4	4
Cholangioma												
simpletype	0	0	5	5	1	3	3	3	4	·	3	4
cystic type	0	3	6	10	1	4	5	6	7	·	4	3
Cholangiocellulr carcinoma	0	1	5	10	0	2	4	6	4	·	3	4
Vascular tumors	0	0	0	2	0	0	0	3	0	·	1	1
Lung tumors												
Metastasis	0	0	1	3	0	0	0	2	0	·	1	3

· : Not examined

D : DENA 200 mg/kg B.W., I.P. at onset of experiment

P : 67% partial hepatectomy at 3 weeks of experiment

B : Basal diet

A : Basal diet containing 0.02% 2-AAF for 6 weeks

고 찰

간장의 기능은 배설, 분비, 저장, 합성, 탐식작용, 중합, 에스테르화, 대사작용 및 조혈작용 등 다양한 기능을 담당하고 있기 때문에 날로 증가하는 신물질 및 안전성 여부가 평가되지 않은 다양한 물질에 대한 발암성 여부를 조사하기 위하여 표적장기로서의 간장은 상당히 중요하다고 할 수 있다. 실제로 International Agency for Research on Cancer의 보고 (IARC, 1972-1985)에 의하면 실험동물에서 발암성이 확인된 65종의 물질중에서 52%에 해당되는 물질이 간을 표적장기로 증명하였다.

또한 인간의 간 발암화 단계에서 나타나는 전암병변 (liver cell dysplasia, focal nodular hyperplasia)과 랫드에 있어서의 전암병변 (enzyme altered foci, hyperplastic nodules)의 생물학적 특성이 일치하기 때문에 (Pitot, 1989) 인간의 전암병변 연구와 효소계를 이용한 진단법의 개발에 랫드의 간은 큰 잇점을 줄 수 있을 것이다. 랫드의 전암병변의 특이적 지표효소로 GST-p(Sato, 1988)는 요즘들어 관심이 집중되고 있으며, 더욱이 흥미로운 사실은 랫드에서의 GST-p와, 성상이 유사한 사람에서의 효소는 GST- π 인데 이 효소 역시 사람의 여러 장기에서 전암 그리고 암병변의 지표로서 많은 가능성을 시사해 주고 있다 (Niitsu 등, 1989; Sato, 1988). 화학적 발암은 연속적으로 유발과 촉진 그리고 세포증식 과정을 포함한 진행 단계를 거치면서 유발되는 것으로 알려지고 있다(Pitot, 1989; Williams와 Weisburger, 1986; Nowell, 1986).

간암에 있어 유발단계는 화학물질이 직접적으로 간세포에 작용하는 단계로서, 비교적 짧은 시간 노출해도 가능하며, 세포증식이 활발히 일어나는 간에서 그 유발율이 높은 것으로 보고 (Columbano 등, 1981) 되고 있다. 한편 촉진단계는 유발단계에 연이은 단계로서, 유발된 세포군의 증식을 가역적으로 증가시켜 주며 (Tatematsu 등, 1980), 유전자 표현형의 변성 (Kriek 등, 1984)이 역시 가역적이고 촉진된 세포군은 촉진물질의 지속적인 투여에 의존하여 나타난다 (Solt 등, 1977). 따라서 본 연구에서는 강력한 간암 유발 물질인 DENA를 실험 개시일에 비괴사용량 (nonnecrogenic dose)으로 알려진 200 mg/kg의 용량 (Solt 등, 1983)으로 1회 복강내 투여 (Pitot, 1977; Scherer 등, 1976)를 하였고, 이의 작용을 촉진하기 위하여, 촉진물질로는 2-AAF를 생체에 독성을 유발하지 않고 촉진율을 높이는 농도인 0.02% (Solt 등, 1977)로 사료에 골고루 혼합하여 6주간 투여하였는데, 이 기간에 유발된 세포군의 유전자 배열이상이 고정되며 (Kriek 등, 1984), 자체증식능력을 갖게 되는 것으로 알려져 있다 (Tatematsu 등, 1987). 또한 유발과 촉진과정의 증폭을 위하여, 세포증식단계가 중요한데, 본 연구에서는 이를 위하여 인위적으로 67% 간부분 절제술을 해주어 간의 증식을 활발하게 해주었다 (Solt와 Farber, 1976; Scherer와 Emmelot, 1976). 또 다른 세포의 증식을 위한 처치방법으로는 CCl_4 투여로 세포의 괴사를 유발하여 보상성 증식을 유발시키는 (Solt 등, 1983) 처치를 수행하는 연구보고도 있다. 이와같이 발암을 유도하기 위한 외부의 촉진인자나, 선택적 환경을 만들어 주면 실험동물 자체내에서 발암으로 유도되기까지의 진행 단계가 요구된다 (Pitot, 1989; Tatematsu 등, 1987; Williams와 Weisbruger 1986). 즉, 진행단계에서 보여지는 현상들은 유전자의 변이가 불가역적으로 일어나며, 자체적으로 악성종양으로 진전되며, 촉진된 세포군의 자발적으로 진행될 수 있는 능력을 갖는 단계를 말하는 것으로, 발암제의 투여중단후 일정한 시간이 필요한 것으로 보고하고 있다 (Pitot, 1989; Nowell, 1986; Farber, 1984).

각각의 실험과 처치군에 대한 체중변화율을 살펴보면, 실험 I은 발암 유발물질 및 촉진물질의 투여와, 간 부분절제술의 영향을 거의 받지않고 증가되는 것으로 나타나고 있으나, 실험 II와 실험 III의 경우는 실험 초기에 급격한 체중감소를 보이는 것으로 미루어 이들 처치에 대하여는 민감하게 영향을 받고 있는 것으로 사료되어지며, 특히 실험 III에서의 체중곡선은 다른 연령의 동물과 달리 사육환경에 상당한 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. Maekawa 등 (1987)은, 2년간에 걸친 phenylbutazone 발암성 시험에서 암에 기인된 체중의 감소를 80주부터 시작되는 것으로 보고하고 있으나, 본 연구에서는 전 실험군에서 40주를 계기로 사료섭취량과 체중의 감소를 관찰할 수 있었다.

육안적으로 보이는 간암의 소견에서 조직학적 패턴과의 상관성에 대하여는 논란이 일고 있다. 즉, 간 세포암종은 대체적으로 yellowish-white 하고, 취약한 경도를 가지는 반면, 담관세포 암종이나 담관종의 육안소견은 greyish-white하며 간세포 암종보다는 딱딱한 경도를 보인다고 주장하고 있으나 (Schauer와 Kunze, 1976), 본 실험에서는 일치하지 않았다. 즉 육안적 소견과 조직학적 패턴과는 상관성을 찾기가 어려웠다. 실험 II의 제 3군과 실험 III의 제 2군에서 특히 다발한 수포성 병변의 할면은 분화구양의 함몰부위가 관찰되었는데, 이들은 액상 내용물이 유출되어 생겨난 구조물로 사료되어지며, 2-AAF의 독성에서 기인된 병변으로 보고되고 있다 (Epstein 등, 1967).

치사율은 랫드의 연령과 밀접하게 나타났다. 즉 실험 III에서 다른 실험군보다 높게 나타나고 있다. 체중에 대한 간의 무게비는 간발암제의 대사를 위한 효소유도 (enzyme induction) 특히 γ -GT, GSTs, Epoxide hydrolase 등의 해독효소가 증가하는 것으로 보고 (Thamavit 등, 1985) 하고 있으며, 또한 간부분 절제술의 복구능력 등을 알아보는 간접적 측정항목으로서 실험 I에서 동일한 처치를한 다른 실험 보다도 더 높은 유의성을 나타내었다.

Schauer와 Kunze (1976) 등이 보고한 간암과 전암병변의 구분을 근간으로, 조직병리학적 관찰에서 eosinophilic, basophilic, 그리고 clear cell foci를 전암병변으로 분류하였으며, 간암의 조직학적 패턴 역시 이들의 분류에 따랐다. 간암과 전암병변의 수와 면적을 살펴볼때 특히 실험 I의 제 4군은 수는 다른 실험에 비해 유의성이 적게 ($p < 0.001$) 나타나고 있으나, 면적은 유의성이 높게 ($p < 0.001$) 나타나는 것으로 미루어

보아 암과 전암병변의 크기가 주위병변과 병합되어진 결과에서 기인하는 것으로 사료된다. 또한 본 실험에서 유도한 간암의 발생율과 정도는 실험 I에서 가장 높았다. 이는 화학적 간유발암은 어린주령에서 그 감수성이 높다고 주장한 보고 (Williams와 Weisburger, 1986; Drew등, 1983; Reuber등, 1968) 등과 일치하고 있다. 이러한 결과의 이유는 본연구에서 사용한 DENA 및 2-AAF는 체내에서 대사되어야 전자친화성을 갖고 (Ghoshli 등, 1988), 그 전자친화 물질이 DNA의 변성을 유도하여 결국 발암화를 유발시키는 것으로 알려진 발암제이기 때문에(Kriek, 1984), 이들의 대사를 위한 효소의 유도는 필수적이라 할 수 있다. 이들 물질의 대사를 위한 효소의 유도정도가 어린 주령에서 높기 때문인 것으로 사료되어지며,, 본 연구의 결과인 체중에 대한 간의 무게비 역시 이를 뒷받침 해 주고 있다. 또다른 이유로는 간세포의 증식정도가 어린 주령에서 더 활발하기 때문에 (Drewemd, 1983; Columbano 등, 1981), 유발된 간세포의 증식 역시 어린주령에서 민감하게 작용되어 더 높은 발암효과가 나타난 것으로 사료되어 진다.

실험적으로 유도되는 간발암은 유발물질과 표적장기, 그리고 용량에 따라 다양하다 (Schaur와 Kune, 1976). 랫드의 간에서 유발되는 화학적 발암은 물질에 따라 단독 또는 다발성 간암이 유도되며, 조직학적 패턴 역시 다양하다. 그러나 DENA를 유발물질로, 2-AAF를 촉진물질로 사용하고 간부분 절제술을 해준 본 실험의 처치군에서 유도된 간암은 다발성으로 나타나며, 그 조직학적 패턴 역시 다양하게 나타났다 (Ogawa 등, 1979). 즉 화학물질로 유도할 수 있는 랫드의 간암중 육종 (sarcoma)을 제외한 모든 간암이 유도 되었는데, 간세포 암종, 담관종, 담관세포 암종 그리고 맥관종등이 유도되었다.

간세포암종의 trabecular type의 특징적 소견은 1~2개의 종양성 세포로 구성되어진 trabecular를 볼 수 있으며 (Terracini 등, 1967), 정상적인 간엽성 구조는 상당한 정도로 상실되어 있다. 종종 acinar와 alveolar구조를 가진 부분이 관찰되며, acini의 내강은 넓이가 다양하며, 내강내에 피사세포가 잔류하는 것으로 보아 acini의 형성은 간세포 피사와 밀접하게 관련이 있는 것으로 보고 (Forget과 Daoust, 1970) 되어 있으며, 본 연구에서도 관찰되었다. 또한 종양세포들의 외양은 대부분이 polygon하고 핵은 비교적 크며, vesicular한것도 관찰되었다. 세포분열상도 약하게 나타나며, 비교적 세포질이 풍부하고 호산염색 성을 가지며, 대소의 지방적이 산재해 있거나, 국소적으로 존재하는 소견이 관찰되었다. 간세포암종의 pseuglandular type은 trabecular type과 밀접하게 관련되어 있다 (Forget과 Daoust; 1970). 즉 trabecular 구조가 국소적으로 병합되어 pseudoglandular type으로 변하게 되는 것으로 사료되어지며, 넓이가 다양한 내강을 가진 선양 구조물을 관찰할 수 있다. 종양세포는 내강 주위를 구성하고 있으며, 종종 입방형이거나, 편평하다.

담관종은 simple type과 cystic type으로 나눌 수 있는데 (Schauer와 Kunze, 1976), 본 실험에서는 cystic type이 주로 관찰되었다. 이들의 조직학적 성상은 유사하며, cystic type의 경우 선양구조가 비교적 뚜렷하고, 이의 기원을 Opie (1946)는 새로이 형성되는 작은 담관에서 기인되는 것으로 보고하였다. 한편 Bannasch와 Reiss (1971)는 cholangiofibrotic 부위에서 많은양의 점액 (mucus)을 생산하면서 담관이 증식하는 것을 이 종양의 기원으로 간주하였다. 각각의 cyst의 크기는 종양내에서 현저히 크며, cyst의 상피는 어느정도까지 상피세포와 유사하며, 국소증식이 일어날 경우의 상피층은 다층으로 구성되어져 있다. 담관종의 cystic type은 말기단계에서 관찰되는 병변으로서 많은 cyst에 의해 육안적으로 간은 변형되어 있거나, 위축되어 있다 (Schauer와 Kunze, 1976). Cystic 간의 조직발생적 기원은 거의 확실하지 않다.

담관세포암종은 adenocarcinoma로 표현하며, 이의 glands를 구성하는 내피는 그 형태가 입방형에서 원주형에 이르기까지 다양한 부정형의 단층상피로 이루어져 있다. 이러한 세포들의 핵은 상당히 편평하며 기저층에 위치하고 드물게 내강내에 PAS-positive한 점액을 볼 수 있다. 특히 실험적 담관세포 암종은 3'-Me-DAB(Goldfarb, 1973)나 p-dimethylaminobenzene-azo-2-naphthalene (DA-2-N; Firminger와 Muly, 1952)을 적용한 실험에서 유발되는 것으로 보고하고 있다.

랫드의 간에서 실험적으로 유도한 맥관종은 mice와 hamster의 경우와 비교해 볼때 드물게 나타난다 (Erturk등, 1969). 최근에 맥관종의 높은 발생율을 보이는 두개의 발암제는 5-acetamido-3-(5-nitro-2-

furyl)-6H-1,2,4-oxadiazine와 methylallylnitrosamine (Erturk등, 1969)으로 알려지고 있다. 본 연구에서 발현된 맥관종은 내피세포의 과도증식과, 증식되는 내피세포사이에 존재하는 간세포는 부분적으로 위축되거나, 괴사되는 소견을 보인다. 조양성 내피세포는 정상내피세포보다 크며, 편평하고, 큰 핵소체를 가진 핵상을 나타내고 있다. 또한 괴사성 내피세포로 꽉 채워진 단단한 복합체들이 형성되어, 혈관내강에 존재하는 것이 관찰되었는데, 이들의 성상은 Erturk 등(1969)의 보고와 일치하고 있다.

종양의 진단에 있어서 원발성인지, 전이되어 발생된 것인지를 결정역시 중요하다. 종양의 원발부위를 결정하는 것은 쉽지 않은데, 특히 종양세포의 분화정도가 미약할 때는 더욱 어렵다. 다양한 종양의 전이 장소로 빈발하게 일어나는 기관이 폐와 뼈 및 간장이다 (Rudon, 1987). 이처럼 전이되기 위하여, 종양 세포는 림프관 (lymphatic channels)이나, 혈관을 경유하는 것으로 보고하고 있다 (Filder, 1978). Thioacetamide를 24개월 동안 섭취시켜 유도한 간암과 결절성 간경변 실험에서 폐에 전이된 보고를 Gupta (1956)가 보고하였으나, 본 연구에서는 발암물질의 단기간 섭취후 일정기간후 폐에 전이된 예를 발견할 수 있었다. 특히 폐에 전이된 예는 악성정도가 높은 것으로 사료되어지는 전 실험의 제 3군과 제 4군에서 발생 되었다.

참고문헌

- Anisimov, V.N. (1981): Carcinogenesis and aging. I. Modifying effects of aging on N-methyl-n-nitrosourea-induced carcinogenesis in female rats, *Exp. Pathol.*, **19**, 81-90.
- Berenblum, I. (1979): Theoretical and practical aspects of the two-stage mechanism of carcinogenesis, *Carcinogens: Identification and mechanisms of action* (Giriffin, A.C., Shaw, C.R. (eds.), Raven press., New York), p. 25-36.
- Boutwell, R.K. (1964): Some biological aspects of skin carcinogenesis, *J. Natl. Cancer Res.*, **34**, 207-250.
- Cairns, J. (1981): The origin of human cancers, *Nature*, **289**, 353-357.
- Columbano, A., Rajalakshmi, S. and Sarma, D.S.R. (1981): Requirement of cell proliferation for the initiation of liver carcinogenesis as assayed by three different procedures, *Cancer Res.*, **41**, 2079-2808.
- Drew, R.t., Boorman, G.A., Haseman, J.K., McConnell, E.E., Busey, W.M. and Moore, J.A. (1983): The effect of age and expoure duration on cancer induction by a known carcinogen in rats, mice, and hamsters, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **68**, 120-130.
- Erturk, E., Cohen, S.M., Price, J.M., von Esch, A.J., Crevetti, A.J. and Bryon, G.T. (1969): The prodduction of hemangioendotheliosarcoma in rats by feeding 5-acetamido-3-(5-nitro-2-furyl)-6H-1,2,4-oxaldiazine, *Cancer Res.*, **29**, 2212-2218.
- Farber, E. (1984): The multistep nature of cancer development, *Cancer Res.*, **44**, 4217-4223.
- Firminger, H.I. and Mulay, A.S. (1952): Histochemical and morphologic differentiation of induced tumors of the liver in rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, **3**, 19-34.
- Fisher, E.R. and Fsher, B. (1967): Recent observation on the concept of metastasis,

Arch. Pathol., **83**, 321-325.

- Ghoshal, A., Roomi, M.W., Ahluwalia, M. Simmonds, W., Rushmore, T.H., Farber, E. and Ghoshal, A.K. (1988): Glutathione and enzymes related to free radical metabolism in liver of rats fed a choline-devoid low methionine diet, *Cancer Lett.*, **41**, 53-62.
- Goldfarb, S. (1976): Sex hormones and hepatic neoplasia, *Cancer Res.*, **36**, 2584-2588.
- Goldfarb, S., Zak, F.G. (1961): Role of injury and hyperplasia in the induction of hepatocellular carcinoma, *J.A.M.A.*, **178**, 729-731.
- Gupta, D.N. (1956): Nodular cirrhosis and metastasising tumours produced in the liver of rats by prolong feeding with thioacetamide, *J. Path. Bact.*, **LXXII**, 415-426.
- Hasegawa, R., Tsud, H., Shirai, T., Kurata, Y., Masuda, A. and Ito, N. (1986): Effect of timing of partial hepatectomy on the induction of preneoplastic liver foci in rats given hepatocarcinogens, *Cancer Lett.*, **32** 15-23.
- Higgins, G.M. and Anderson, R.M. (1931): Experimental pathology of the liver; I. Restoration of the white rat following partial surgical removal, *Arch. Pathol.*, **12**, 186-202.
- IARC (1972-1985): Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Vol. 1-37, IARC, Lyon.
- Ito, N., Inoue, T., Tagawa, Y., Aoki, T. and Kagawa, M. (1986): Development of new rapid bioassay for carcinogens to predict the results of long term carcinogenicity test, *Toxicol. Forum.*, **9**, 601-611.
- Ito, M., Tatematsu, M., Nakanishi, K., Hasegawa, R., Takano, T., Imaida, K. and Ogiso, T. (1980): The effects of various chemicals on the development of hyperplastic liver nodules in hepatectomized rats treated with N-nitrosodiethylamine or N-2-acetaminofluorene, *Gann*, **71**, 832-842.
- Jang, J.J. and Kim, S.H. (1988): The promoting effect of capsaicin on the development of diethylnitrosamine initiated enzyme altered hepatic foci in male Sprague-Dawley rats, *J. Korean Cancer Asso.*, **20**, 1-7.
- Kriek, E., Englelse, L.D., Scherer, E. and Westra, J.G. (1984): Formation of DNA modifications by chemical carcinogens identification, localization and quantification, *Biochim. Biophys. Acta*, **738**, 181-201.
- Leuschner, I., Harms, D. and Schmidt, D. (1988): The association of hepatocellular carcinoma in childhood with hepatitis B virus infection, *Cancer*, **62**, 2363-2369.
- Maekawa, A., Onodera, H., Tanigawa, H., Furuta, K., Kanno, J., Matsuoka, C., Ogiu, T. and Hayashi, Y. (1987): Long-term studies on carcinogenicity and promoting effect of phenylbutazone in DONRYU rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, **79**, 577-584.
- Magee, P.N. and Barnes, J.M. (1956): The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine, *Brit. J. Cancer*, **10**, 115-123.

- Miller, J.A. and Miller, E.C. (1976): Carcinogens occurring naturally in foods, *Federation Proc.*, **35**, 1316-1321.
- Newberne, P.M. (1985): Assessment of the hepatocarcinogenic potential of chemicals: Response of the liver in *Toxicology of the Liver* (Plaa, G.L. and Hewitt, W.R. (eds.), Raven press., New York), p. 243-290.
- Niitsu, Y., Takahashi, Y., Saito, T., Hirata, Y., Arisato, N., Maruyama, H., Kohgo, Y. and Listowsky, I. (1989): Serum glutathione-s-transferase- π as a tumor marker for gastrointestinal malignancies, *Cancer*, **6**, 317-323.
- Nowell, P.C. (1986): Mechanisms of tumor progression, *Cancer Res.*, **46**, 2203-2207.
- Ogawa, K., Medline, A. and Farber, F. (1979): Sequential analysis of hepatic carcinogenesis, *Lab. Invest.*, **41** 22-35.
- Peraino, C., Michael Fry, R.J., Staffeldt, E. and Christopher, J.P. (1975): Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin, and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat, *Cancer Res.*, **35**, 2884-2890.
- Pitot, H.C. (1989): Progression: The terminal stage in carcinogenesis, *Genn*, **80**, 599-607.
- Pitot, H.C. (1977): The natural history of neoplasia, *Am. J. Pathol.*, **89**, 401-412.
- Rabes, H. M., Scholze, P. and Jantsch, B. (1972): Growth kinetics of diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient "preneoplastic" liver cell population *in vivo* and *in vitro*, *Cancer Res.*, **32**, 2577-2586.
- Rudon, R.W. (1987): The epidemiology of cancer and biology of tumor metastasis in *Cancer Biology* (2nd ed., Oxford University Press., Oxford) p. 25-67, p. 443-467.
- Russell, J.J., Staffeldt, F., Wright, B.J., Prapuolenis, A., Carnes, B.A. and Peraino, C. (1987): Effects of rat strain, diet composition, and phenobarbital on hepatic γ -glutamyl transpeptidase histochemistry and on the induction of altered hepatocyte foci and hepatic tumors by diethylnitrosamine, *Cancer Res.*, **47**, 1130-1134.
- Sato, K. (1988): Glutathione s-transferases and chemical carcinogenesis; GST-P as a preneoplastic marker, *J. Korean Toxicol.*, **4**, 73-88.
- Schaurer, A. and Kunze, E. (1976): Tumours of the liver in *Pathology of Tumours in Laboratory Animals* (Turusov, V.S. (ed.), IARC, Lyon), p. 41-72.
- Scherer, E. and Emmelot, P. (1976): Kinetics of induction and growth of enzyme deficient islands involved in hepatocarcinogenesis, *Cancer Res.*, **36**, 2544-2554.
- Solt D.B., Cayama, E., Tsuda, H., Enomoto, K., Lee, G. and Farber, E. (1983): Promotion of liver cancer development by brief exposure to dietary 2-acetylaminofluorene plus partial hepatectomy or carbon tetrachloride, *Cancer Res.*, **43**, 188-191.

- Solt, D.B., Medline, A. and Farber, E. (1977): Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis, *Am. J. Pathol.*, **88**, 595-618.
- Solt, D. and Farber, E. (1976): New principle for the analysis of chemical carcinogenesis, *Nature*, **263**, 701-703.
- Tatematsu, M., Lee, G., Hayes, A. and Farber, E. (1987): Progression in hepatocarcinogenesis: Differences in growth and behavior of transplants of early and later hepatocyte nodules in the rat spleen. *Cancer Res.*, **47**, 4699-4705.
- Tatematsu, M., Takano, T., Hasegawa, R., Imaida, K., Nakanowatari, J. and Ito, N. (1980): A sequential quantitative study of the reversibility or irreversibility of liver hyperplastic nodules in rats exposed to hepatocarcinogens, *Gann*, **71**, 848-855.
- Thamavit, W., Tatematsu, M., Ogiso, T., Mera, Y., Tsuda, H. and Ito, N. (1985): Dose-dependent effects of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and ethoxyquin in induction of foci of rat liver cells containing the placental form of glutathione S-transferase, *Cancer Lett.*, **27**, 295-303.
- Tsuda, H., Hasegawa, R., Imaida, K., Masui, T., Moore, M.A. and Ito, N. (1984): Modifying potential of thirty-one chemicals on the short-term development of γ -glutamyl transpeptidase-positive foci in diethylnitrosamin-initiated rat liver, *Gann*, **75**, 876-883 .
- Williams, G.M. and Weisburger, J.H. (1986): Chemical carcinogens in *Casarett and Doull's Toxicology* (Klassen, C.D., Amdur, M.O. and Doull, J. (eds.), Macmillan, New York), p. 99-173.
- Williams, G.M. (1980): The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens, *Biochim. Biophys. Acta*, **605**, 167-189.