

다장기 발암모델을 이용한 dimethyl disulfide와 diallyl disulfide의 항발암효과

강부현, 손화영, 하창수, 노정구

한국화학연구소, 스크리닝-안전성연구센터

A study of anticarcinogenic effects of dimethyl disulfide and diallyl disulfide in a rat multi-organ carcinogenesis model

Boo-Hyon Kang, Hwa-Young Son, Chang-Su Ha, Jung-Koo Rho

Korea Research Institute of Chemical Technology, Screening & Toxicology Research Center

Abstract. The anticarcinogenic effects of dimethyl disulfide(DMDS, methyl disulfide) and diallyl disulfide(DADS, allyl disulfide) were studied in a 28 weeks rat multi-organ carcinogenesis model. Neoplastic and preneoplastic lesions were observed in the liver, kidney, thyroid gland, esophagus, duodenum, colon, rectum and adrenal gland. Results showed that neoplastic lesions in the kidney, liver and thyroid gland were inhibited by DADS but those in the liver and colon were enhanced by DMDS when compared to positive control group. Incidence of neoplastic lesions in the other organs were not changed by DMDS or DADS exposure. While GST-p positive foci in the liver were increased by DMDS, DADS had no effect. There was no significant histopathological lesion in DMDS or DADS treated group without pretreatment with carcinogens.

Key words: Garlic, DMDS, DADS, rat, multi-organ carcinogenesis

서 론

발암의 원인은 크게 유전적 요인과 환경적 요인이 있는데 사람의 발암원인중 80-90%정도는 환경적 요인으로 알려져 있다.⁷ 이 중 약 75%는 환경화학물질이라고 한다.¹⁶ 어떤 화학물질들은 종양을 유발하거나 촉진시키는 반면 다른 화학물질들은 종양의 발생을 억제하기도 한다. 이런 화학물질의 발암성 또는 항발암성을 검색하는 방법은 세균에서의 변이원성을 검사하는 방법, 생화학적인 분석에 의한 검색, 역학적 검색, 실험동물을 이용한 발암성실험, 단기발암물질 검색법등 여러가지가 있다.

이중 세균의 변이원성을 검색하는 방법³은 시간이 적게 들고 비용이 싸기 때문에 발암물질 검색의 일환으로 많이 이용되고 있다. 그러나 의양성 반응이 많고,⁴ 변이원성과 발암성 상호간의 관련성이 항상 일치하지 않는 단점이 있다.^{18,43}

역학적 조사에 의해 검색하는 방법은 음식이 암의 발생과 예방에 매우 중요함이 밝혀지면서 지역간 식습성을 조사함으로써 음식물 내 성분의 발암성 또는 항발암 효과를 밝히는 연구가 최근 많이 이루어졌

다.^{8,17,30,41} 종양과의 관계에 있어서 신뢰할 만한 역학적 자료가 풍부한 경우에는 사람에게 대한 어떤 물질의 발암성 또는 항발암성 여부를 결정하기가 용이하다. 그러나 대부분의 경우 신뢰할 만한 자료를 추적하기가 용이하지 않으며, 시간이 장기간 요구되므로 특정물질을 항발암 또는 발암물질로 규정하기가 어렵다.

선진국 및 우리나라의 정부기관에서는 화학물질의 제조, 판매 및 수입신청시 요구되는 발암성실험에 랫드, 마우스, 햄스터등을 이용하여 동물종에 따라 18개월에서 24개월간 시험물질을 투여하도록 권고하고 있다.^{10,29,44,45} 이러한 실험은 최종보고서가 나오기까지 적어도 5년이상의 긴 기간이 소요되기 때문에 시간, 인력, 경비가 너무 많이 드는 단점이 있다.

시간과 비용을 절약하기 위해 2단계 발암이론에 기초한 *in vivo* 단기검색법들이 많이 개발되어 *in vivo* rat liver neoplasm model, mouse skin-painting test, strain A mouse pulmonary tumor test, subcutaneous injection test, rat mammary neoplasm test, mouse colon cancer model등과 같은 방법들이 이용되고 있다.²⁵ 이

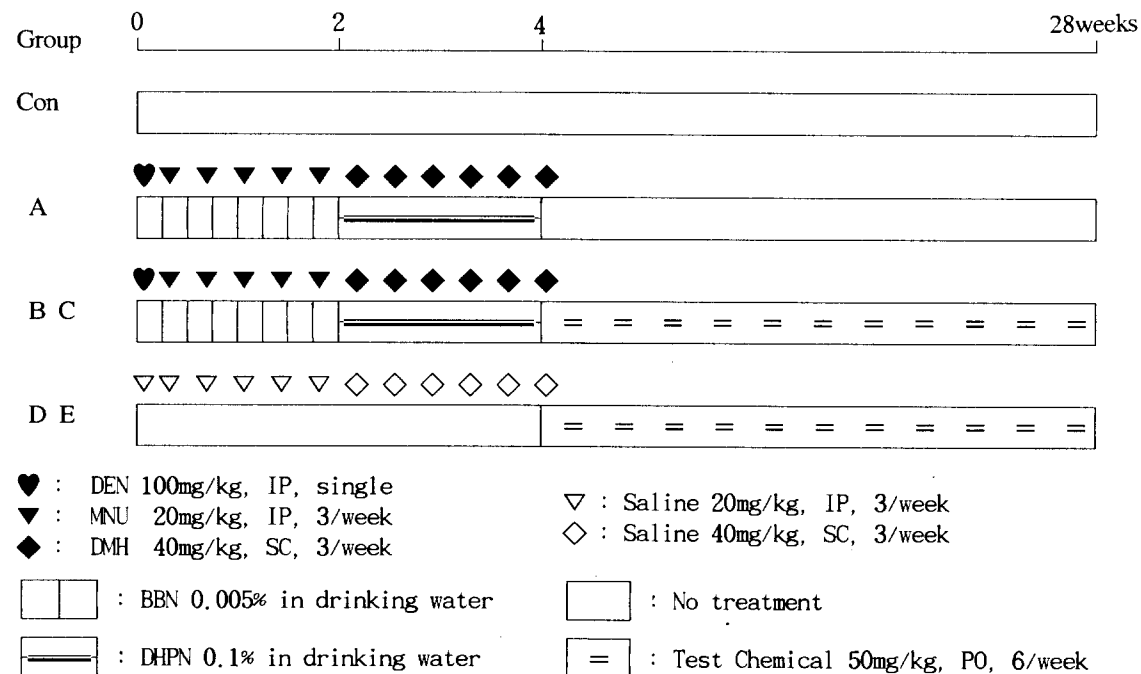
러한 검색법들은 각각의 장기에 대한 화학물질의 발암성을 검색하는데 매우 유용한 방법으로 많이 이용되고 있다. 그러나 이러한 방법들은 전암병변의 출현이 암 발생과 얼마나 긴밀한 관계가 있는지를 추측하는 정도에 불과하다. 또한 NCI/NTP에서 연구한 결과 88종의 발암물질중 40(45%)종이 장기에 따라 각기 다른 작용을 하는 것으로 밝혀졌다.¹⁴ 즉 화학물질들이 장기에 따라 종양을 억제하기도 하고 증가시키기도 하는데, 예를들어 butylated hydroxyanisole(BHA)은 마우스에서 폐장, 피부, 전위종양을 억제하며, 랫드에서는 유선종양을 억제한다.^{32,36,37} 반면, 이 물질은 F344 랫드를 이용한 2년간의 발암성실험에서 전위종양을 유발하는 것으로 밝혀졌다¹⁹. 이와같이 많은 화학물질들이 장기에 따라 효과를 다르게 나타내기 때문에 발암성실험은 whole-body multi-organ의 개념으로 실시하는 것이 바람직하다.^{14,20}

자연적으로 존재하는 음식물 중에는 여러가지 발암 성분 및 항발암성분들이 들어있다. 최근 채소, 과일, 향신료등 음식물에 들어 있는 화학물질들의 항발암효과가 동물실험을 통해 많이 밝혀지고 있다. 이들 중에는 organosulphur compounds, indols, tocopherols, aromatic isocyanates, caumarins, carotines, retinoid, selenium, methylated flavones, terpens, ascorbic acid, 섬유소등이 있다.^{11,39,40} 특히 마늘(*Allum sativum*)은 오래 전부터 향신료와 의약품으로 사용되어 왔으며, 항발

암, 살충, 항균, 항진균, 항고혈압, 항혈전, 항고혈당, 항동맥경화등의 다양한 약리학적 작용을 가지고 있다.^{1,2,6,12,21,22} 최근에는 마늘추출액의 항발암 작용에 많은 관심이 모아지고 있으며, 여러가지 실험방법에 의해 항발암 효과가 밝혀지고 있다. 마늘의 성분은 oxygen-containing compounds와 sulfur-containing compounds로 대별되며, 항발암효과를 나타내는 것은 sulfur-containing compounds로서 methyl allyl sulfide, dimethyl disulfide(DMDS), diallyl sulfide(DAS), dimethyl trisulfide, allyl methyl disulfide(AMD), allyl methyl trisulfide(AMT), diallyl trisulfide(DAT), diallyl disulfide (DADS)등 28종 이상의 성분이 있다.⁴² 마늘의 항발암효과는 자연발생종양,²⁴ transplantable tumor,²³ 화학적으로 유발된 종양^{5,9,28,31}에 모두 효과를 가지고 있다. 중국의 Shandong지방에서 실시된 역학적 연구에서 하루 평균 20g의 마늘을 섭취하는 Gangshan Country 주민은 위장관암에 의한 사망률이 가장 낮았고(3.45/100,000) 마늘을 적게 섭취하는 Quixia Country 주민은 위장관암에 의한 사망률이 가장 높음(40/100,000)을 보고한 바 있다.¹⁷

본 실험에서는 Ito et al²⁰이 고안한 중기다장기 발암모델을 실험방법으로 선택하였는데 이 방법의 장점은 발암물질의 표적장기를 찾을 수 있고 기간도 비교적 적게 소요된다. 실험에 종양유발물질로 사용된 diethylnitrosamine (DEN)은 잘 알려진 간암

Table 1. Multi-organ carcinogenesis model in a rat



유발물질이며, N-methylnitrosourea (MNU)는 갑상선, 방광, 유선 및 조혈계에 종양을 유발한다. N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine(BBN)은 식도와 전위의 종양발생을 증가시키며, dihydroxy-di-N-propylnitrosamine(DHPN)은 갑상선, 폐, 신장, 방광에 종양을 유발시키고, dimethylhydrazine (DMH)은 장관에 종양을 유발한다. 이들 발암물질을 투여하여 종양유발 여건을 조성한 후에 마늘을 구성하고 있는 많은 성분들 중 그 효능이 어느 정도 알려진 diallyl disulfide(DADS, allyl disulfide)와 이에 비해 효능이 잘 밝혀지지 않은 dimethyl disulfide (DMDS, methyl disulfide)에 대하여 그 항발암효과가 어느 정도인지를 밝혀서 그 성분들을 암예방에 활용할 수 있도록 하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

공시동물

한국화학연구소 스크리닝-안전성연구센터의 차폐 시설내에서 생산된 SPF Ktc:SD랫드로서 4주령 수컷 120마리를 입수하여 2주 동안 순화기간을 둔 후 건강한 동물 78마리를 이용하였다.

사육환경

공시동물은 철망사육상자(410mm×220mm×200mm)에 3마리씩 배치하여 온도는 23±3℃, 상대습도는 50±10%, 환기횟수는 시간당 13-18회, 조도는 150~300Lux에서 12시간 조명하는 조건에서 사육하였다.

사료와 음수

사료는 실험동물용 고품사료(제일사료주식회사)를 자유섭취하게 하였다. 음수는 상수도수를 자유섭취하게 하였다.

실험 방법

Table 1에 의거하여 시행하였다. 즉, A군은 발암물질을 4주간 투여한 후 28주까지 무처리 하였다. B군은 발암물질을 4주간 투여한 후 DADS를 28주까지 투여하였으며, C군은 발암물질을 4주간 투여한 후 DMDS를 28주까지 투여하였다. D군은 생리식염수를 4주간 투여한 후 DADS를 28주까지 투여하였으며, E군은 생리식염수를 4주간 투여한 후 DMDS를 28주까지 투여하였다. 대조군은 아무 것도 처치하지 않았다.

Table 2. Abbreviation, unit, and analysis methods of the hematology and chemistry

Items	Unit	Method
WBC (White blood cell)	x 10 ³ /mm ³	Coulter S-880 electronics
RBC (Red blood cell)	x 10 ³ /mm ³	Coulter S-880 electronics
HGB (Hemoglobin concentration)	g/dl	Cyanomethemoglobin
HCT (Hematocrit)	%	Calculated from MCV and RBC
MCV (Mean corpuscular volume)	fl	Coulter S-880 electronics
MCH (Mean corpuscular hemoglobin)	pg	Calculated from HGB and RBC
MCHC (Mean corpuscular hemoglobin concentration)	g/dl	Calculated from HGB and HCT
PLT (Platelet)	x 10 ³ /mm ³	Coulter S-880 electronics
AST (Aspartate aminotransferase)	IU/l	UV-Rate
ALT (Alanine aminotransferase)	IU/l	UV-Rate
ALP (Alkaline phosphatase)	IU/l	P-NPP
BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dl	Urease-UV
CRE (Creatinine)	mg/dl	Jaffe
GLU (Glucose)	mg/dl	Enzyme
TCHO (Total cholesterol)	mg/dl	Enzyme
TP (Total protein)	g/dl	Biuret
ALB (Albumin)	mg/dl	BCG
TBIL (Total bilirubin)	mg/dl	Enzyme
IP (Inorganic phosphorus)	mg/dl	UV
CPK (Creatine kinase)	IU/l	UV
A/G (Albumin-globulin ratio)	ratio	ALB/(TP-ALB)
Na (Sodium)	mmol/l	Flame photometer
K (Potassium)	mmol/l	Flame photometer

실험항목

체중측정 전 동물에 대하여 주 1회 체중을 측정하였다.

혈액채취 및 혈액학·혈액생화학적 검사 랫드를 채혈 전 약 12시간 절식시킨 후에 테르마취하여 한국화학연구소 스크리닝-안전성 연구센터의 표준작업지침(standard operating procedure; SOP)에 따라 후대정맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액의 일부는 EDTA-2K 처리된 병(CBC bottle, 녹십자)을 사용하여 응고를 방지하였고, 나머지는 혈액생화학적 검사를 위해 혈청분리용 플라스틱시험관(Iatron Lab. Inc., Japan)에 옮겨 담았

다. 혈액학적 검사는 채혈 후 20분 이내에 Coulter S-880을 사용하여 실시하였으며, 일부는 도말표본을 만들어 감별계산을 하였다. 혈액생화학적 검사는 채혈 후 30분 이내에 3000rpm으로 10분간 원심분리한 후 분리된 혈청을 deep freezer(-80°C)에 보관하여 3개월 이내에 Clinalyzer (JCA-VX1000, Jeol Co.)로 측정하였고, Na와 K는 전해질자동분석장치(IL943 Flame photometer, Instrumentation Lab.)를 이용하여 측정하였다. 혈액 및 혈액생화학적 검사의 방법과 단위는 Table 2와 같다.

부검 전 동물을 채혈이 끝난 후 방혈 치사시켜 부검을 하여 육안적으로 모든 장기를 검사하고, 고환과 부고

Table 3. Summary of final body and relative organ weights(g) in the study using a rat multi-organ carcinogenesis model

Organ \ Group		Con	A	B	C	D	E
No. of animals		15	15	13	11	12	12
Body weight	Mean	551.087	497.063**	508.361*	531.130	583.075	593.898*
	SD	36.4844	30.3472	35.6140	42.5561	46.9305	28.4127
Pituitary gland	Mean	0.002	0.003	0.002	0.004	0.003	0.002
	SD	0.0008	0.0009	0.0010	0.0048	0.0018	0.0004
Adrenal gland-Lt	Mean	0.005	0.006	0.006	0.006	0.005	0.006
	SD	0.0010	0.0011	0.0012	0.0020	0.0007	0.0018
Adrenal gland-Rt	Mean	0.004	0.005	0.005**	0.005**	0.005	0.005
	SD	0.0006	0.0009	0.0009	0.0008	0.0009	0.0008
Liver	Mean	2.504	2.449	2.638	2.459	2.561	2.456
	SD	0.1344	0.1700	0.2184	0.1563	0.1810	0.1584
Spleen	Mean	0.121	0.189**	0.162*	0.195**	0.125	0.156*
	SD	0.0126	0.0575	0.0315	0.0475	0.0147	0.0254
Kidney-Lt	Mean	0.267	0.302	0.324**	0.289	0.287	0.279
	SD	0.0327	0.0290	0.0727	0.0205	0.0315	0.0266
Kidney-Rt	Mean	0.275	0.309*	0.311*	0.294	0.287	0.281
	SD	0.0349	0.0362	0.0301	0.0219	0.0341	0.0306
Testis-Lt	Mean	0.320	0.358	0.339	0.321	0.322	0.324
	SD	0.0533	0.0343	0.0362	0.0275	0.0391	0.0263
Testis-Rt	Mean	0.321	0.360	0.346	0.329	0.319	0.326
	SD	0.0615	0.0377	0.0360	0.0319	0.0384	0.0220
Urinary bladder	Mean	0.023	0.059	0.026	0.025	0.030	0.029
	SD	0.0054	0.1054	0.0085	0.0053	0.0123	0.0107
Pancreas	Mean	0.186	0.193	0.204	0.218	0.221	0.202
	SD	0.0550	0.0707	0.0455	0.0281	0.0571	0.0510
Adrenals(Lt+Rt)	Mean	0.009	0.010	0.011*	0.011**	0.009	0.010
	SD	0.0015	0.0016	0.0014	0.0026	0.0013	0.0022
Kidneys(Lt+Rt)	Mean	0.542	0.611*	0.635**	0.582	0.575	0.560
	SD	0.0658	0.0639	0.0920	0.0409	0.0649	0.0563
Testes(Lt+Rt)	Mean	0.641	0.718	0.686	0.651	0.641	0.650
	SD	0.1144	0.0696	0.0719	0.0576	0.0771	0.0468

*; Significant difference from Con p<0.05

**; Significant difference from Con p<0.01

Con; No treatment A; Carcinogens B; Carcinogens+DMDS C; Carcinogens+DADS D; DMDS E; DADS

환은 Bouin 용액에 안구와 하더리안선은 Davidson 용액에 고정하였다. 간장의 일부는 GST-p 양성 foci에 대한 면역조직화학적 염색을 위하여 좌엽, 중간엽, 우엽의 일부를 각 2-3mm 정도의 두께로 4°C 아세톤에 고정하였다. 피부, 뇌, 뇌하수체, 갑상선(부갑상선 포함), 대퇴골, 흉선, 폐, 기관, 심장, 흉골, 타액선, 간장, 비장, 신장, 부신, 췌장, 정낭선, 전립선, 난소, 자궁, 질, 골격근, 악하림프절, 식도, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 방광, 장간막림프절, 좌골신경, 척수, 혀, 안구, 대동맥은 10% 중성완충 포르말린용액에 고정하였다.

장기중량 측정 전 동물에 대해서 신장, 간장, 췌장, 방광, 부신, 비장의 중량을 측정하였다.

병리조직학 검사 전 동물의 상기조직에 대한 조직 표본을 제작하여 H&E 염색후 광학현미경으로 검경하였다. 간장의 경우는 GST-p foci를 ABC법으로 면역조

직화학적 염색을 하여 숫자와 면적을 Immage analyzer(LA 500, PIAS, Japan)로 측정하였다.

통계처리

측정된 자료는 컴퓨터 프로그램인 LABCAT(Innovative programming Associates, Inc., USA)에 자동으로 저장되었으며, 이를 추출하여 Dunnett법을 사용하여 체중, 혈액학, 혈액생화학, 장기중량에 대하여 군간 유의성을 검정하였다. GST-p foci의 수와 면적의 군간 유의성은 SAS(SAS Institute, Inc., Cary, N.C.) 통계처리용 프로그램으로 Dunnett법을 사용하여 검정하였다.

결 과

체중

최종 부검시 동물의 체중은 대조군에 비해 A군은

Table 4. Summary of absolute organ weights(g) in the study using a rat multi-organ carcinogenesis model

Organ \ Group		Con	A	B	C	D	E
No. of animals		15	15	13	11	12	12
Pituitary gland	Mean	0.012	0.013	0.013	0.024	0.016	0.013
	SD	0.0048	0.0036	0.0055	0.0261	0.0083	0.0026
Adrenal gland-Lt	Mean	0.026	0.027	0.028	0.030	0.028	0.033
	SD	0.0049	0.0048	0.0060	0.0090	0.0043	0.0084
Adrenal gland-Rt	Mean	0.023	0.025	0.027	0.028*	0.026	0.027
	SD	0.0040	0.0041	0.0042	0.0030	0.0041	0.0041
Liver	Mean	13.788	12.158**	13.438	13.049	14.907	14.584
	SD	1.0217	0.9244	1.7624	1.2208	1.3327	1.1688
Spleen	Mean	0.663	0.933**	0.821	1.026**	0.723	0.922**
	SD	0.0578	0.2556	0.1652	0.2322	0.0601	0.1220
Kidney-Lt	Mean	1.465	1.500	1.645	1.530	1.672	1.656
	SD	0.1520	0.1299	0.3901	0.1097	0.1860	0.1700
Kidney-Rt	Mean	1.511	1.532	1.579	1.554	1.671	1.668
	SD	0.1551	0.1762	0.1418	0.1182	0.1960	0.1738
Testis-Lt	Mean	1.759	1.775	1.719	1.700	1.865	1.921
	SD	0.2737	0.1280	0.1741	0.1155	0.1602	0.1272
Testis-Rt	Mean	1.763	1.783	1.756	1.739	1.848	1.934
	SD	0.3145	0.1478	0.1642	0.1117	0.1572	0.1008
Urinary bladder	Mean	0.126	0.293	0.136	0.131	0.174	0.169
	SD	0.0302	0.5238	0.0479	0.0318	0.0733	0.0613
Pancreas	Mean	1.025	0.958	1.038	1.158	1.276	1.198
	SD	0.3325	0.3457	0.2428	0.1783	0.2947	0.3079
Adrenals(Lt+Rt)	Mean	0.049	0.051	0.055	0.058*	0.055	0.059*
	SD	0.0079	0.0078	0.0090	0.0105	0.0069	0.0101
Kidneys(Lt+Rt)	Mean	2.976	3.031	3.224	3.083	3.342*	3.324*
	SD	0.2967	0.3011	0.4859	0.2201	0.3768	0.3347
Testes(Lt+Rt)	Mean	3.522	3.558	3.475	3.439	3.713	3.854
	SD	0.5865	0.2610	0.3364	0.2152	0.3136	0.2181

*; Significant difference from Con p<0.05

**; Significant difference from Con p<0.01

Con; No treatment A; Carcinogens B; Carcinogens+DMDS C; Carcinogens+DADS D; DMDS E; DADS

심하게 감소하였으며, B, C군은 약간 감소하였다. D, E 군은 대조군에 비해 현저한 체중의 증가를 보였다 (Table 3).

장기중량

장기중량은 A군에서는 간장의 절대중량이 심하게 감소하였으나 체중에 대한 상대중량은 변화가 없었다. 비장, 신장은 체중에 대한 상대중량이 유의성 있게 증가하였다. B군에서는 절대중량의 변화는 없었으나 부신, 신장, 비장의 체중에 대한 상대중량이 유의성 있게 증가하였다. C군에서는 부신과 비장의 절대중량이 증가하였으며, 이들의 상대중량도 유의성 있게 증가하였다. D군에서는 신장의 절대중량이 유의성 있게 증가하였으나 상대중량은 유의성이 없었다. E군에서는 비장, 부신,

신장의 절대중량이 유의성 있게 증가하였으나 상대중량에서는 비장만 유의성을 나타내었다 (Table 3, 4).

혈액학적 검사

B군에서는 MCHC가 유의성 있게 증가하였으며, C군에서는 RBC, HGB, HCT가 유의성 있게 감소하였다. D군에서는 MCHC가 유의성 있게 감소하였다. E군에서는 RBC는 유의성 있게 감소하였으며, MCV, MCH는 유의성 있게 증가하였다. 그 이외의 항목은 큰 변화가 없었다 (Table 5, 6).

혈액생화학적 검사

A군에서는 ALT는 유의성 있게 증가하였으며, GLU는 유의성 있게 감소하였다. B군에서는 GLU가 유의성 있게

Table 5. Summary of hematological tests in the study using a rat multi-organ carcinogenesis model

Group/Items		WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
Con	Mean	7.61	8.71	15.84	45.42	52.13	18.17	34.88	1210
	SD	1.635	0.470	0.715	2.158	1.358	0.338	0.729	90.0
A	Mean	7.41	8.75	15.82	45.43	51.93	18.10	34.86	1139
	SD	2.092	0.540	0.798	2.688	0.978	0.523	0.762	182.0
B	Mean	10.35	8.61	15.54	45.31	52.58	18.06	34.37**	1135
	SD	3.683	0.493	0.741	3.012	1.198	0.634	1.416	130.1
C	Mean	10.62	7.80**	14.20**	41.67*	53.38	18.18	34.07	1297
	SD	5.656	0.694	1.339	3.888	1.754	0.469	1.191	232.2
D	Mean	7.51	8.48	15.21	45.31	53.44	17.90	33.52*	1146
	SD	1.781	0.765	1.860	4.132	1.361	1.090	2.332	90.0
E	Mean	7.74	7.96**	15.03	44.27	55.59**	18.89*	34.00	1214
	SD	2.060	0.440	0.879	2.939	1.876	0.715	1.226	82.4

*; Significant difference from Con p<0.05

**; Significant difference from Con p<0.01

Con; No treatment A; Carcinogens B; Carcinogens+DMDS C; Carcinogens+DADS D; DMDS E; DADS

Table 6. Summary of differential count in the study using a rat multi-organ carcinogenesis model

Group/Items		Neutrophils	Eosinophils	Basophils	Lymphocytes	Monocytes
Con	Mean	1.326	0.069	0.000	6.086	0.125
	SD	0.6591	0.0919	0.0000	1.7591	0.1147
A	Mean	1.359	0.047	0.000	5.864	0.135
	SD	0.4758	0.0664	0.0000	1.7254	0.1233
B	Mean	2.680	0.044	0.000	7.461	0.162
	SD	2.6271	0.0824	0.0000	2.0473	0.1279
C	Mean	3.376	0.035	0.000	7.100	0.111
	SD	4.7523	0.0686	0.0000	2.4150	0.1290
D	Mean	1.709	0.054	0.000	5.602	0.142
	SD	0.7211	0.0795	0.0000	1.2207	0.0921
E	Mean	1.436	0.030	0.000	6.186	0.090
	SD	0.4997	0.0377	0.0000	1.7403	0.0978

Con; No treatment A; Carcinogens B; Carcinogens+DMDS C; Carcinogens+DADS D; DMDS E; DADS

감소하였다. C군에서는 AST, GLU는 유의성있게 감소하였으며, ALT는 유의성있게 증가하였다. D군에서는 ALP, GLU가 유의성있게 감소하였다. E군에서는 TBIL이 유의성있게 감소하였다. 그 이외의 항목은 큰 변화가 없었다(Table 7).

병리조직학적 검사

병리학적 검사에서 A군은 신장에서 renal tubule basophilia 1례, renal tubule hyperplasia 6례, renal tubule adenoma 4례가 발생하였으며, 이들 병변의 정도도 높게 나타났다. 간장에서는 clear cell foci 7례, eosinophilic foci 3례, hepatocellular hyperplasia 1례, hepatocellular adenoma 1례 및 fibrosis, cholangiofibrosis, cystic cholangitis 등이 관찰되었으며, 병변의 정도도 높게 나타났다. 부신에서 cortical hyperplasia가 2례 나타났으며, 갑상선에서 C-cell adenoma가 1례 관찰되었다. 다른 장기에서는 특이한 병변이 관찰되지 않았다.

B군은 신장에서 renal tubule hyperplasia 8례, renal tubule adenoma 3례, renal tubule carcinoma 1례(Fig. 1a, 1b)가 발생하여 A군에 비해 증가하였다. 간장에서는 clear cell foci 9례, eosinophilic foci 3례, hepatocellular hyperplasia 2례, hepatocellular adenoma 1례, hepatocellular carcinoma 1례(Fig 2a, 2b), biliary hyperplasia 1례 및 cystic cholangitis, fibrosis등이 관찰되어 A군에 비해 증가하였다. 갑상선에서는 C-cell adenoma가 1례 관찰되었다.

폐장에서 type II cell hyperplasia 1례, 십이지장에서

mucosa의 atypical hyperplasia 1례, 결장에서 adenocarcinoma 1례가 관찰 되었다. 다른 장기에서는 특이한 병변이 관찰되지 않았다.

C군은 신장에서 renal tubule hyperplasia 5례, renal tubule adenoma 2례가 발생하였으며, 이들 병변의 정도도 A, B군에 비해 낮게 나타났다. 간장에서는 clear cell foci 6례, eosinophilic foci 1례, basophilic foci 1례 및 fibrosis, cystic cholangitis등이 관찰되었으며, 이들 병변의 정도도 A, B군에 비해 낮게 나타났다. 그리고 결장에서 adenocarcinoma(Fig 3a, 3b)가 1례 관찰되었으며, 다른 장기에서는 특이한 병변이 관찰되지 않았다.

D, E군은 대조군에 비해 병변의 변화가 거의 관찰되지 않았다(Table 8).

종양의 발생률은 A군에서 15마리 중 7례가 발생하여 46.7%, B군은 13마리중 9례로 69.2%, C군은 11마리 중 4례로 36.4%의 발생률을 나타내었다. D와 E군에서는 종양이 한 레도 발생하지 않았다(Table 9).

GST-p 양성 foci의 수 및 면적

GST-p 양성 foci는 대조군에서는 소수가 관찰되었으며, 대조군에 비해 A, B 및 C군은 유의성있는 증가를 보였고 D와 E군에서는 유의성이 인정되지 않았다. A군에 비해 B군은 유의성 있게 증가하였으며, C군은 유의성은 없었다(Table 10).

Table 7. Summary of clinical chemistry in the study using a rat multi-organ carcinogenesis model

Group/Items	AST	ALT	ALP	BUN	CRE	GLU	TCHO	TP	ALB	TBIL	IP	CPK	A/G	NA	K	
Con	Mean	90.51	41.52	227.82	17.06	0.42	214.89	92.64	7.48	4.90	1.00	7.77	322.53	1.91	141.4	7.56
	SD	20.907	13.752	67.046	1.561	0.047	46.440	17.655	0.392	0.256	0.104	1.002	174.814	0.160	4.38	1.625
A	Mean	123.68	66.28*	258.07	18.89	0.40	172.27*	87.92	7.41	4.81	0.95	7.73	308.65	1.86	142.3	7.11
	SD	24.831	13.618	54.475	2.363	0.046	39.248	13.615	0.375	0.266	0.059	1.245	125.968	0.137	3.44	1.361
B	Mean	107.31	59.62	207.77	16.80	0.39	158.58**	89.99	7.44	4.86	0.95	7.64	317.99	1.88	141.7	6.98
	SD	19.764	15.035	53.427	2.368	0.050	26.283	20.554	0.416	0.362	0.049	0.893	175.424	0.151	4.61	1.602
C	Mean	148.19**	79.99**	210.08	17.23	0.41	167.01*	94.12	7.26	4.75	0.99	7.63	369.17	1.90	141.1	6.77
	SD	101.291	60.896	42.808	2.432	0.044	21.548	10.828	0.601	0.440	0.070	0.647	295.615	0.151	4.81	1.441
D	Mean	90.48	43.47	164.37**	16.65	0.42	163.84**	91.35	7.34	4.73	0.93	7.58	254.99	1.83	143.4	6.61
	SD	20.816	14.800	26.654	1.465	0.057	42.362	15.002	0.352	0.252	0.051	1.035	142.685	0.149	4.43	1.426
E	Mean	90.86	37.51	183.71	15.57	0.39	178.23	96.69	7.27	4.79	0.93*	7.58	271.97	1.94	142.9	6.81
	SD	26.185	11.252	47.762	1.840	0.040	55.413	23.168	0.319	0.260	0.050	1.171	131.567	0.129	3.62	1.739

*; Significant difference from Con p<0.05

**; Significant difference from Con p<0.01

Con; No treatment A; Carcinogens B; Carcinogens+DMDS C; Carcinogens+DMDS D; DMDS E; DADS

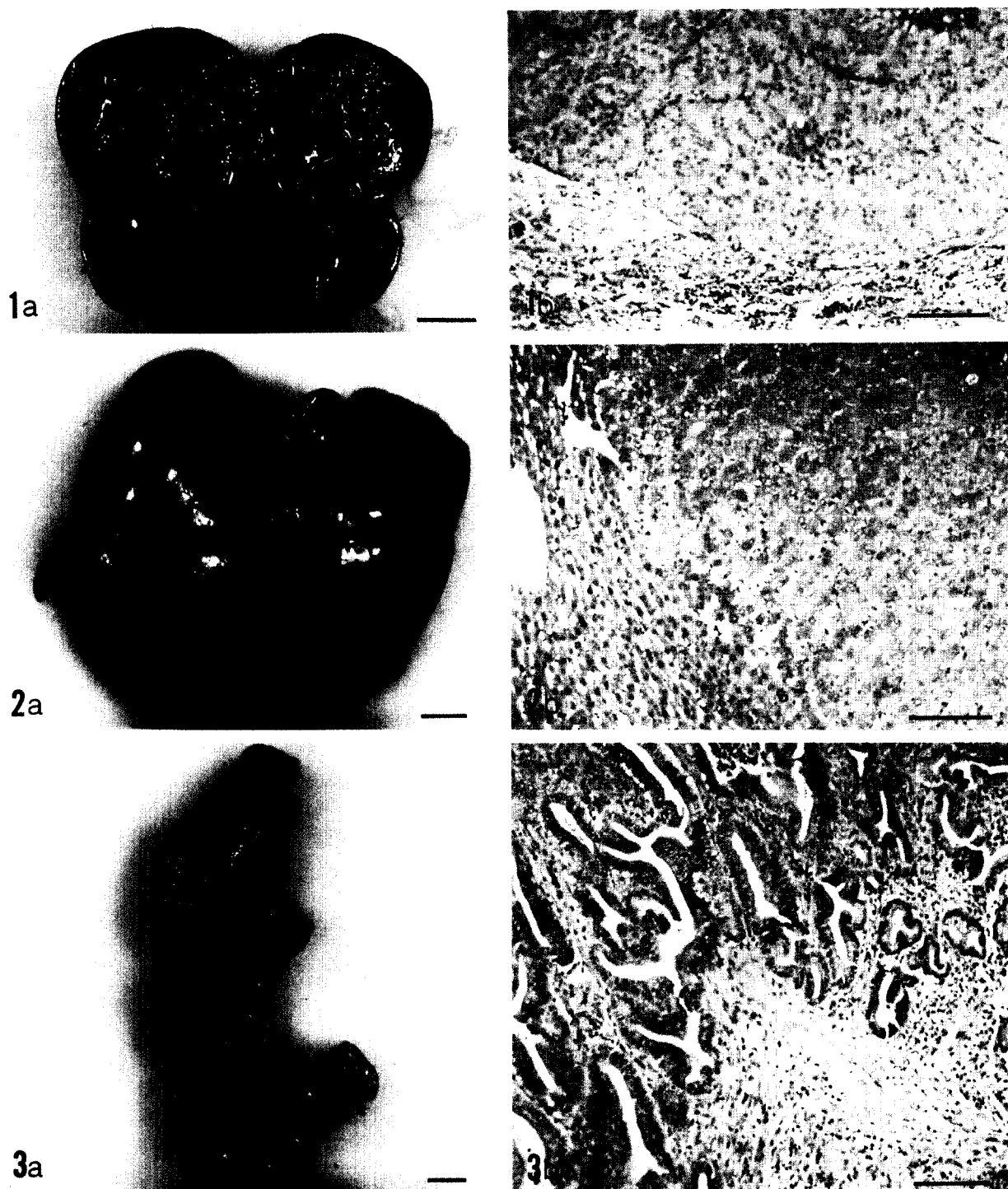


Fig. 1a. Kidney, SD rat. A large nodule of the kidney from carcinogen and DMDS treatment group showing well demarcation. Bar=1cm. **Fig. 1b.** Renal tubule carcinoma showing sharp demarcation and compression of the adjacent parenchyma, and focal necrosis(N). Bar=20 μ m **Fig. 2a.** Liver, SD rat. A irregular nodule(arrow head) from carcinogen and DMDS treatment group. Bar=1cm. **Fig. 2b.** Hepatocellular carcinoma(arrow head) showing solid growth pattern and invasion of the adjacent parenchyma. Bar=20 μ m **Fig. 3a.** Colon, SD rat. Multiple polypoid masses of the colon from carcinogen and DADS treatment group. Bar=1cm. **Fig. 3b.** Adenocarcinoma showing irregular architecture of glands with anaplastic appearance(arrow head) and inflammation in the lamina propria. Bar=20 μ m

Table 8. Histopathological observations in the study using a rat multi-organ carcinogenesis model

Group	Con	A	B	C	D	E
Number of rats	15	15	13	11	12	12
KIDNEY						
Renal tubule basophilia	0	1	0	0	1	0
Renal tubule hyperplasia	0	6	8	5	0	0
Renal tubule adenoma	0	4	3	2	0	0
Renal tubule carcinoma	0	0	1	0	0	0
Interstitial nephritis	3	3	1	0	4	0
Epithelial hyperplasia/pelvis	2	0	0	0	0	0
Pyelonephritis	1	1	0	0	0	0
Hyaline cast	2	1	0	0	0	1
Infarction	0	0	1	1	0	
LIVER						
Clear cell foci	2	7	9	6	1	0
Eosinophilic foci	0	3	3	1	0	0
Basophilic foci	0	0	0	1	0	0
Hepatocellular hyperplasia/focal	0	1	2	0	0	0
Hepatocellular adenoma	0	1	1	0	0	0
Hepatocellular carcinoma	0	0	1	0	0	0
Biliary hyperplasia	0	0	1	0	0	0
Cholangiofibrosis	0	7	0	0	0	0
Cystic cholangitis	0	6	4	6	0	1
Fibrosis	0	7	9	6	1	0
Spongiosis hepatis	0	2	3	3	0	0
Coagulative necrosis/focal	0	1	0	0	0	0
Lymphoid cell aggregation	0	2	0	0	0	0
Thrombosis	0	2	0	0	0	0
Hydrophic degeneration	0	1	0	0	0	0
Extramedullary hematopoiesis	0	1	0	0	0	0
Fatty change	0	3	0	1	0	
LUNG						
Type II cell hyperplasia	0	0	1	0	0	0
Perivascular lymphoid cell hyperplasia	1	0	0	0	0	0
Congestion	0	2	0	1	0	0
Fibrosis/visceral pleura	0	1	0	0	0	
DUODENUM						
Atypical hyperplasia/mucosa	0	0	1	0	0	0
COLON						
Adenocarcinoma	0	0	1	0	0	0
THYROID GLAND						
C-cell hyperplasia	1	0	0	0	0	0
C-cell adenoma	0	1	1	0	0	0
Cyst	1	0	0	0	0	0
Ultimobranchial cyst	3	2	0	1	1	1
ADRENAL GLAND						
Cortical hyperplasia/focal	0	2	0	0	0	0
Cytoplasmic vacuolation/focal	0	1	0	0	0	0

Con; No treatment A; Carcinogens B; Carcinogens+DMDS C; Carcinogens+DADS D; DMDS E; DADS

Table 9. Summary of tumor incidence in the study using a rat multi-organ carcinogenesis model

Items \ Group	Con	A	B	C	D	E
Total rats/group	15	15	13	11	12	12
Total primary tumors	0	7	9	3	0	0
Total rats with tumors	0	6	8	3	0	0
Total rats with multiple tumors	0	1	1	0	0	0
Total benign tumors	0	7	6	2	0	0
Total malignant tumors	0	0	3	1	0	0
Total malignant with metastasis	0	0	0	0	0	0

Con; No treatment A; Carcinogens B; Carcinogens+DMDS C; Carcinogens+DADS D; DMDS E; DADS

Table 10. Numbers and areas of GST-p positive foci in liver of rats in the study

Group	No.of rats	GST-p positive foci	
		No./Cm2	Area(mm2/Cm2)
Con	15	2.40 ± 2.10	0.010 ± 0.010
A	15	45.47 ± 27.77**	0.325 ± 0.160
B	13	80.23 ± 30.80**	0.639 ± 0.223
C	11	52.00 ± 43.85**	0.449 ± 0.309
D	12	3.09 ± 2.70	0.029 ± 0.028
E	12	3.00 ± 2.86	0.011 ± 0.014

Each value is mean ± SD

**significant difference from Con p<0.01

Con; No treatment A; Carcinogens B; Carcinogens+DMDS C; Carcinogens+DADS D; DMDS E; DADS

고 찰

본 연구에서 체중이 A, B군에서 유의성 있는 감소를 보였으며, C 군에서도 약간 감소를 보였는데 이것은 발암물질에 의한 영향이라고 판단된다. 그러나 발암물질을 투여하지 않은 D군과 E군은 체중의 증가가 관찰되었다(Table 3). D, E군의 체중이 증가한 것은 마늘이 발육에 미치는 영향에 관하여 Nakagawa et al²⁷의 연구에서 어린 랫트에 생마늘의 지속적인 투여가 체중감소와 성장장애를 유발한다는 보고와는 상반되었다. 이것은 마늘 중의 다른 성분들, 투여용량, DMDS와 DADS의 용매로 사용된 corn oil등 여러가지 요인에 의해 동물의 발육이 영향을 받을 수 있다고 생각된다.

B군에서 신장의 상대중량의 증가는 현미경적 조건에서 관찰된 병변발생의 증가와 더불어 고려해 볼 때 이들 장기에 형성된 병변의 영향으로 해석된다. 부신은 B군, C군에서 상대중량의 증가가 나타났으나 현미경적 조건에서는 큰 변화가 관찰되지 않았다. D군과 E군에서 일부 장기의 절대중량 변화는 상대중량의 변화가 없는

것으로 보아 체중의 증가에 의한 것으로 사료된다. 전체적으로 비장의 중량변화가 인정되었으나, 병리조직학적 검사에서는 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았다. (Table 3, 4).

혈액학적 검사에서 DADS 투여군의 경우 적혈구와 hemoglobin의 감소가 관찰되어 DADS는 적혈구에 영향을 주는 것으로 나타났다. 이것은 Nakagawa et al²⁷이 생마늘의 지속적인 투여시 빈혈이 발생한다고 보고한 바 있어 이와 일치하는 결과이다. 그러나 DMDS 투여군에서는 감소가 나타나지 않았다. 기타 일부 항목에서 변화가 인정되었으나 구간 유의성이 관찰되지 않아 시험물질에 의한 영향은 아니라고 사료된다(Table 5, 6).

혈액생화학적 검사에서 발암물질 투여군, DMDS, DADS 투여군에서 AST와 ALT가 증가하여 이 물질들이 간장의 세포변성 및 괴사를 유발했음을 시사하였다. 또한 glucose가 대조군에 비해 모든 투여군에서 감소하였으며, E군을 제외하고 통계학적 유의성을 나타내었다. 이는 생마늘이 혈당강하효과를 가지고 있음이 여러 연구자들^{22,26}에 의해 보고된 바 있어 이와 관련된 것으로 사료된다. 이외 일부 항목에서 변화가 인정되었으나 구간 유의성이 관찰되지 않아 시험물질에 의한 영향은 아니라고 사료된다(Table 7).

병리학적 검사(Table 8, 10)에서 A군의 경우 간장, 신장, 부신 및 폐장에서 병변의 종류와 발생이 대조군에 비해 많게 나타났다. 그러나 다른 연구자들에 의해 보고된 바 있는 폐장, 위, 췌장, 방광, 갑상선, 식도등의 종양은 본 연구에서는 발생이 없거나 그 발생률이 비교적 낮게 나타나 차이를 나타내었다.^{13,20,35} B군은 A군에 비해 간장과 신장의 전암성 병변이 증가하였으며, 간장의 GST-p양성 foci의 수도 현저히 증가되어 이를 뒷받침하였다. 한편 십이지장에서 atypical hyperplasia, 결장에서 선암종이 각각 1례씩 관찰되었는데 발생률이 낮아 시험물질의 영향을 평가하는 데는 어려움이 있으나 시험물질의 영향으로 판단된다. C, E군에 투여한 DMDS에

관해서는 *in vitro* 에서 K562 종양세포에 대해 세포살해 효과가 있음이 보고된 바 있으나,³⁴ 그 외에 다른 보고가 없어 다른 연구자들과 비교하기는 어려웠다. C군은 병리학적 검사에서 A군에 비해 신장 및 간장의 병변이 감소한 반면, 간장의 GST-p 양성 foci의 수와 면적은 큰 변화가 관찰되지 않았다. 이 결과로 볼 때 전암병변의 지표인 GST-p 양성 foci와 H&E 염색 조직표본의 현미경적 소견 사이에 차이를 보였다. 그 외에 결장에서 악성종양이 1례 관찰되었다. Takahashi et al³⁵은 DADS가 대장 및 신장암의 발생을 감소시키며, 간장의 발암성 실험에서 DAS는 GST-p 양성 foci를 증가시키고 DADS는 영향을 없다고 하였다. 본 실험의 B군은 A군에 비하여 신장의 종양성 병변의 발생이 감소하여 같은 경향을 보였으나 간장의 종양성 병변에서는 차이를 나타내었다. Sumiyoshi와 Wargovich³³는 마우스에서 DMH로 유발된 결장의 핵이상(nuclear aberration)과 glutathione S-transferase 활성이 DADS에 의해 변화가 없음을 보고한 바 있으며, Goldberg¹⁵는 마우스에서 DMH로 유발된 결장의 핵이상에 억제효과가 크지 않음을 보고한 바 있어 연구자에 따라 차이가 있다. 본 실험에서는 결장의 종양발생이 발암물질과 DMDS를 투여한 B군에서만 1례가 발생하여 결장의 종양발생에 촉진효과가 있다고 사료된다. 또한 Watternberg³⁸는 암컷 A/J마우스에서 DADS의 전처치에 의해 N-nitrosodiethylamine에 의한 전위종양과 폐종양에 억제효과를 보고한 바 있다. 그러나 본 연구에서는 모든 대조군과 투여군에서 위장과 폐장의 종양발생이 관찰되지 않아 이를 해석하기가 어려웠다.

D군과 E군은 대조군에 비해 병리조직학적 병변이 거의 관찰되지 않았기 때문에(Table 8) DMDS나 DADS 단독으로는 발암성이 없는 것으로 사료된다.

각군의 동물수에 대한 종양의 발생율은 A군이 15마리 중 7례(46.7%), B군이 13마리 중 9례(69.2%), C군이 11마리 중 3례(27.2%)를 나타내었다. 악성종양은 B군에서 신장의 선암, 간장의 선암, 결장의 선암이 각각 1례씩 관찰되었으나 전이는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 다른 연구자들^{13,20,35}에 비해 적은 종양의 발생율을 보인 것으로 실험방법과 시험물질에 다소 차이가 있고 동물에 따른 차이로 사료된다. 대조군, D군 및 E군에서는 종양이 한 레도 발생하지 않았다(Table 9).

이상의 결과를 종합해 볼 때 이들 물질의 항발암성 또는 발암성을 명확히 규정하는 데는 여러가지 면에서 한계가 있으나 C군에서는 A군에 비해 간장, 신장 및 갑상선의 종양이 감소한 것으로 보아 DADS는 간장, 신장 및 갑상선의 종양에 항발암효과가 있는 것으로

사료된다. 반면에 B군에서는 A군에 비해 간장과 결장의 종양이 증가한 것으로 보아 DMDS는 간장과 결장의 종양발생에 촉진효과를 가지고 있는 것으로 사료된다.

본 연구에서 다른 연구자들에 의해 보고된 바 있는 폐장과 전위³⁸, 결장^{15,33,35} 등의 종양에 대한 억제효과를 확인하기에는 이들 장기에서의 종양발생이 없거나 낮게 발생하여 다소 어려움이 있으나 앞으로 동물의 수를 늘리고 시험물질의 투여량, 투여기간등을 조절한다면 여러가지 물질의 발암성 또는 항발암성을 검색하는데 본 연구에서 이용한 다장기 발암모델이 매우 유용하리라 생각한다.

참고문헌

- 1 Adetumbi MA, Lau BHS. *Allium Sativum*(Garlic)-A Natural Antibiotic. *Medical Hypotheses* **12**:227-237, 1983.
- 2 Amer M, Taha M, et al. The effect of aqueous garlic extract on the growth of dermatophytes. *Int. J. Dermatology* **19**:285-287, 1980.
- 3 Ames BN. Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer. *Science* **204**: 578-593, 1979.
- 4 Ashby J, Styles JA. Factors influencing mutagenic potency in vitro. *Nature* **274**:20-22, 1978.
- 5 Belman S. Onion and garlic oils inhibit tumor promotion. *Carcinogenesis* **4**(8):1063-1065, 1983.
- 6 Bordia A, Verma SK. Effect of garlic feeding on regression of experimental atherosclerosis in rabbits. *Artery* **7**:428-437, 1980.
- 7 Bridges BA. Short-term screening tests for carcinogens. *Nature* **261**:195-200, 1976.
- 8 Doll R, Peto R. The cause of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancers in United States. *J natl cancer Inst* **66**:1192-1308, 1981.
- 9 Dwivedi C, Rohlfsl SL, et al. Effect of diallyl sulfide and diallyl disulfide on skin tumor development in SENCAR mice. *Pharm Res* **9**(12):1668-1670, 1992.
- 10 EPA/TSCA. Health effects test guidelines. Springfield, NTIS, U.S. Department of Commerce 1982.
- 11 Fiala ES, Reddy BS, et al. Naturally Occurring Anticarcinogenic Substances in Foodstuffs. *Ann Rev Nutr* **5**:295-321, 1985.
- 12 Fromtling RA, Bulmer GS. In vitro effect of aqueous extract of garlic(*Allium sativum*) on the growth and viability of *Cryptococcus neoformans*.

- Mycologia 70:397-405, 1978.
- 13 Fukushima S, Shibata MA, et al. Organ-specific Modification of Tumor Development by Low-dose Combinations of Agents in a Rat Wide-spectrum Carcinogenesis Model. *Jpn J Cancer Res* 82:784-792, 1991.
 - 14 Gold LS, Ward JM, et al. Association between carcinogenic potency and tumor pathology in rodent carcinogenesis bioassays. *Fundam Appl Toxicol* 6:677-690, 1986.
 - 15 Goldberg MT. Inhibition of genotoxicity by diallyl sulfide and structural analogues. In: *Anticarcinogenesis and radiation protection*, ed. Cerutti PA, Nygaard OF, et al, pp. 309-312. Plenum Press, New York, 1987.
 - 16 Holbrook DJ. Chemical carcinogenesis. In: *Introduction to biochemical toxicology*, ed. Hodgson E, Guthrie FE, pp. 310-329. Elsevier Science Publishing Co., New York, 1982.
 - 17 Horwitz N. Garlic as a plant du jour: Chinese study finds it could prevent G.I. cancer. *Medical Tribune*, August 12, 1981.
 - 18 ICPMC Publication No.9. Report of ICPMC task group 5 on the differentiation between genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Mutat Res* 133:1-49, 1984.
 - 19 Ito N, Fukushima S, et al. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 70:343-352, 1983.
 - 20 Ito N, Imaida K, et al. Wide-spectrum initiation models: possible applications to medium-term multiple organ bioassays for carcinogenesis modifiers. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 79:413-417, 1988.
 - 21 Jain RC. Effect of alcoholic extract of garlic in atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 31:1982-1983, 1973.
 - 22 Jain RC, Vyas CR. Garlic in alloxan induced diabetic rabbits. *Am J Clin Nutr* 28:684-685, 1975.
 - 23 Kimura Y, Yamamoto K. Cytological effect of chemicals on tumors. Influence of crude extracts from garlic and some related species on MTK-sarcoma III. *Gann* 55:325- 329, 1964.
 - 24 Kroning F. Garlic as an inhibitor for spontaneous tumors in mice. *Acta Unio Inter Contra Cancrum* 20:855-856, 1964.
 - 25 Maronpot RR. Chemical carcinogenesis. In: *Handbook of toxicologic pathology*, ed. Haschek WW, Rousseaux CG, pp. 92-125. Academic Press, San Diego, California. 1991.
 - 26 Nagai K, Nakagawa S, et al. Effect of aged garlic extract on glucose tolerance test in rats. *Basic Pharmacol Therapeut* 3:45-53, 1975.
 - 27 Nakagawa S, Masamoto K, et al. Effect of raw and extracted-aged garlic juice on growth of young rats and their organs after peroral administration. *J Toxicol Sci* 5: 91-112, 1980.
 - 28 Nishino H, Iwashima A, et al. Antitumor-Promoting Activity of Garlic Extracts. *Oncology* 46:277-280, 1989.
 - 29 OECD. OECD guidelines for testing of chemicals. Paris, OECD, 1981.
 - 30 Parkin DM, and Läärä E, et al. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 41:184-197, 1988.
 - 31 Rao AR, Sadhana AS, et al. Inhibition of skin tumors in DMBA-induced complete carcinogenesis system in mice by garlic(*Allium sativum*). *Indian Journal of Experimental Biology* 28:405-408, 1990.
 - 32 Slaga TJ, and Bracken WM. The effects of antioxidants on skin tumor initiation and aryl hydrocarbon hydroxylase. *Cancer Res* 37:1631-1635, 1977.
 - 33 Sumiyoshi H, Wargovich MJ. Chemoprevention of 1,2- dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice by naturally occurring organic sulfur compounds. *Cancer Res* 50:5084-5087, 1990.
 - 34 Tadi, PP. Anticarcinogenic, antitumor, and antifungal properties of *Allium Stivum*. *Diss Abstr Int B* 52(8):4144, 1992.
 - 35 Takahashi S, Hakoi K, et al. Enhancing effects of diallyl sulfide on hepatocarcinogenesis and inhibitory actions of the related diallyl disulfide on colon and renal carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 13:1513-1518, 1992.
 - 36 Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenic and toxic effects of polycyclic hydrocarbonones by phenolic antioxidants and ethoxyquin. *J Natl Cancer Inst* 48:1425-1430, 1972.
 - 37 Wattenberg LW. Inhibition of chemical carcinogen-induced pulmonary neoplasia by butylated hydroxyanisole. *J Natl Cancer Inst* 50:1541-1544, 1972.
 - 38 Wattenberg LW, Sparmins VL, et al. Inhibition of N-Nitrosodiethylamine Carcinogenesis in Mice by Naturally Occurring Organosulfur Compounds and Monoterpenes. *Cancer Research* 49:2689-2692, 1989.
 - 39 Willett WC, MacMahon B. Diet and cancer-an

- overview(first of two-parts). *New Engl J Med* **310**: 633-638, 1984.
- 40 Willett WC, MacMahon B. Diet and cancer-an overview(second of two-parts). *New Engl J Med* **310**:697-703, 1984.
- 41 You WC, Blot WJ, et al. Allium Vegetables and Reduced Risk of Stomach Cancer. *J Natl Cancer Inst* **81**:162-164, 1989.
- 42 Yu TH, Wu CM, et al. Volatile compounds from garlic. *J Agric Food Chem* **37**:725-730, 1989.
- 43 Ziger E, Carcinogenicity of mutagens: Predictive capability of Salmonella mutagenesis assay for rodent carcinogenicity. *Cancer Res* **47**:1287-1296, 1987.
- 44 국립보건안전연구원. 제 94-3호. 의약품등의 독성시험기준. 1994.
- 45 厚生省薬務國審査第1果. 毒性試験法解説 ガイドライン. 薬師日報社, 東京, 日本.