Kor. J. Food Hygiene 6(1), 13-26(1991)

신생랫드를 이용한 화학적 간암발생의 조기진단에 관한 연구

장민열 · 김형진 · 이영순

서울대학교 수의과대학 수의학과

Studies on Early Detection of the Chemical Hepatocarcinogenesis in Newborn Rats

Min-Youl Chang, Hyoung-Chin Kim and Yong-Soon Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744

ABSTRACT—This study was performed for searching for non-hepatectomy medium-term bioassay model by using newborn female rats.

Newborn female Sprague-Dawley rats (1 day old) were given an intraperitoneal injection of 150 mg/kg of diethylnitrosamine (DENA). After three weeks, all rats were weaned and divided into three groups. Group 1 were fed on diets containing 0.01% 2-acetylaminofluorene (2-AAF) as a promoter for three weeks. Group 2 were given 0.05% phenobarbital (PB) in drinking water as a promoter for 8 weeks. Group 3 was control group. The autopsy was carried out at 4 weeks and 8 weeks after weaning. Preneoplastic lesions were indentified with immunohistochemical staining for glutathione S-transferase placental form (GST-P).

In liver weight to body weight ratios, group 2 showed significant difference from group 3 ($p<0.001$) at 4 weeks after weaning. Group 1 and group 2 showed significant difference from group 3 at 8 weeks after weaning ($p<0.01$, $p<0.001$), respectively. In quantitative analysis for GST-P positive lesion area by using Image Analyzer, group 1 and group 2 represented significant difference in comparison with group 3 at early 4 weeks after weaning ($p<0.01$, $p<0.05$), respectively. Also, there were significant difference at 8 weeks after weaning ($p<0.01$, $p<0.05$), respectively. So, it is capable of detecting the hepatocarcinogenicity in short period by using newborn rats without hepatectomy. Therefore, from the results mentioned above, it is considered that the newborn rat model is useful for medium-term bioassay.

Keywords□non-hepatectomy model, newborn rat model, female Sprague-Dawley rats, glutathione S-transferase placental form (GST-P).

암의 발생원인은 크게 유전적 요인과 환경적 요인으로 대별할 수 있는데, 사람의 암발생 원인 중 80~90%가 환경적 요인에 의한 것으로 알려져 있다[5,19]. 한편 과학이 발달함에 따라 사람이 살아가는 생활환경이 천연적으로 존재하지 않는 많은 합성화학물질들에 의해 오염되어 왔다. 의약품, 농약, 첨가물, 화장품, 산업 오염물질 등 화학물질의 증가와 방사선, 바이러스 및 자외선에 의한 암발생, 곰팡이독소,[1,17] 식물성독소,[28] 스테로이드,[6,8] 및 담즙산[7,8,61] 등의 발암성 또는 발암촉진 작용이 보고되어 있다. 더욱이 사람이 이러한 물질에 노출될 수 있는 위험성이 날로 증가하는 가운데, 생물학적, 화학적인 측면과 환경적인 측면에서 이들 각종 물질의 발암성을 빠르고 정확하게 검색할 필요성이 날로 더해가고 있다.

그러나 실제로 발암성을 평가하는데는 2년 이상의

Received for publication 15 January, 1991
Reprint request: Dr. Y.S. Lee at the above address.

긴 시간과 많은 비용이 소요됨에 따라, 시간과 비용을 절약할 목적으로 *in vitro* 시험인 변이원성 시험(Ames' test SOS-chromosome test 등)으로 잠정적으로 발암성을 검색하고 있으나,[2,5,64] 장기 생체시험 성적에 비하여 적중율이 낮고 위양성(false positive) 율이 높아[4,41] 실제 적용에는 어려움이 많아서 참고 사항으로 밖에는 이용되고 있지 않다. 따라서 *in vitro* 시험법과 장기 생체시험법의 교량역할을 할 수 있는 중기 생체시험법이 요구되었다.

화학적 발암물질에 의한 암의 발생은 유발(initiation) 및 촉진(promotin) 과정을 거쳐 이루어진다는 2단계이론(two-step theory)[22,27,36,59-61]의 기초하에 진행과정(progression)을 거쳐 암세포를 형성한다는 다단계 발암화 작용(multistage carcinogenesis)의 개념이 정립되고,[13,29,35] 여러 가지 *in vivo* 발암성검색법이 개발되었다.[23,38,49,52,54] 그 중에서도 Ito 등[23]이 개발한 방법은 시험기간이 짧고(8주), 장기 생체시험에의 적중율이 높으며,[6,7] 위양성(flasepositive)이 없다는 점[24]에서 화학물질의 발암성 유무를 검색하는데 유용한 방법으로 인정되고 있다. 이 방법은 발암유발물질인 diethylnitrosamine(DENA)을 투여한 후 촉진제(promoter)로서 2-acetylaminofluorene(2-AAF)을 사료에 0.02% 비율로 섞어 투여한 후 간변화의 증폭을 위해 시험개시(DENA 투여) 3주 후에 간의 2/3를 절제하는 수술을 하게 된다.[18] 이 때 간의 부분적으로 절제하는 수술을 초심자가 하기에는 어렵다는 단점이 있을 수 있다.

지난 20년 동안 신생동물(newborn : neonatal)과 영아기(infant)의 동물을 이용한 실험이 화학적으로 암을 발생시키는 과정 중의 일련의 변화들을 연구하는데 매우 유용하다는 보고들이 많이 있었다.[9,31,33,57,65,67-70] 이와 같이 신생동물과 영아기의 동물들을 이용한 실험의 장점에는 경제적인 면과, 시간을 단축할 수 있다는 점, 그리고 간을 부분적으로 절제하는 수술을 하지 않아도 된다는 점 등이 있다. Uchida와 Hirono 등[63]은 신생마우스에 dimethylnitrosamine(DMNA)을 투여하고, phenobarbital(PB)로 촉진시켜, 16주에 DMN만 투여한 군과 비교해서 10배나 많은 간 종양을 발생시켰다. 또한 Peraino 등[33]은 신생랫드를 이용한 실험이 발암성 물질의 검색을 비교적 간단하고 단기간에 할 수 있으므로 간 발암성 물질을 검색함에 유용하다고 하였다. 또한 Vesselinovitch 등[70,67,65,69,68]은 영아 마우스모델을 정립시켰으며, 발암화과정의 연구나 화학물질의 발암성 평가에 영아 마우스모델이 유용하다고 하였으며, 이 밖에도 신생랫드나 신생마우스를 이용한 실험이 많이 보고되었다.[16,40,51,32]

International Agency for Research on Cancer (IARC : 1982-1988)의 보고에 의하면, 실험동물에서 발암성이 확인된 65종의 물질 중에서 52%에 해당하는 물질이 간을 표적장기로 하고 있기 때문에 대부분의 화학물질의 발암성은 주로 랫드의 간을 이용하여 검색한다.[24] 한편 Sato 등(1984)이 랫드의 간에서 glutathione S-transferase placental form (GST-P)이 유용한 전암병변의 지표효소가 될 수 있다고 보고한 이후, Ito 등[24]과 Ogiso 등[30]은 이 지표효소를 이용한 중기발암성 시험의 결과가 장기 발암성 생체시험에 높은 적중율을 보였음을 보고하였다. 그래서 GTS-P를 지표효소로 이용하여 화학물질의 발암성을 검색함이 매우 유용함을 알 수 있다.

따라서 본 연구는 발암물질에 민감한 신생랫드를 이용하여, 간의 부분적 절제 수술을 하지 않고 단기간에 간 발암성을 검색하는 방법을 찾기 위해서 실시하였으며, 발암성의 검색은 생체시험에 적중율이 높은 GST-P를 이용하였다.

재료 및 방법

실험동물—(주) 유한양행 중앙연구소로부터 Sprague-Dawley(SD) 랫드 암컷 20마리, 수컷 10마리를 분양받아 한 케이지당 암·수를 2 : 1의 비율로 교배시켜 신생랫드를 얻었다.

사육 및 실험기간 동안 사육실 환경은 23± 2℃, 상대습도 60± 10%를 유지하였고, 이유후 군분리를 하여 자연 채광하에서 랫드용 케이지(polycarbonate, 26×24×18 cm, 명진기계제작)에 4마리씩 넣어서 사육하였으며, 사료(제일제당 실험동물사료)와 식수는 자유로이 급여하였다.

실험설계 및 시험물질—실험동물은 각 군 12마리씩 3군으로 나누어 배치하였으며(Fig. 1), 각 실험군 모두 1일령 때 간암 유발물질(initiator)인 diethylnitrosamine(DENA, Sigma)을 생리적 식염수에 희석하여 체중 kg당 150 mg씩 복강내로 투여하였으며

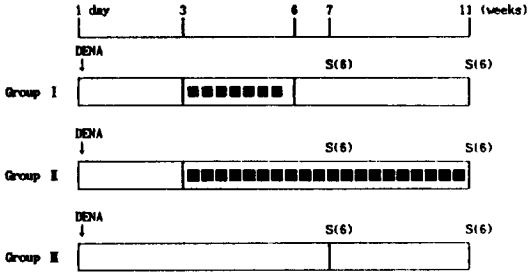

Fig. 1. Experimental design. DENA, a single application of diethylnitrosamine (150 mg/kg body weight) by i.p.; S( ), numbers in parenthesis mean sacrificed animals; ■■■, basal diet containing 2-acetylaminofluorene (2-AAF) at 0.01%; ■■■, drinking water containing phenobarbital in drinking water at 0.05%; □□□, basal diet.

3주 후에 이유시켜 체중별 군분리를 하였다.

제 1군은 이유와 동시에 3주동안 강력한 간암발생 촉진물질(promoter)인 2-acetylaminofluorene(2-AAF, Sigam)을 사료에 0.01%가 되도록 사료에 혼합하여 급여하였으며, 제 2군은 이유와 동시에 약한 간암발생 촉진물질인 phenobarbital(PB, Tokyo KASEI)을 음수에 0.05%되게 희석하여 실험 종료시까지 투여하였다. 그리고 제 3군은 대조군으로 이유와 동시에 Basal diet만 급여하였다.

각군은 이유 후 4주(시험개시 후 7주) 및 8주(시험개시 후 11주)에 각각 6마리씩 부검하여 조사하였다.

간 무게의 측정—시험종료 하루전에 모든 군의 동물을 절식시켰으며, 체중을 측정한 후 부검하여 간을 적출하고, 간의 무게를 측정하여 체중에 대한 간의 무게비를 계산하였다.

광학 현미경적 관찰—간의 외측좌엽과 내측우엽에서 2~3 mm 두께로 간조직을 채취하여 10% phosphate buffered formalin 액에 고정한 후, 일반적인 paraffin 절편을 만들고, hematoxylin 및 eosin 염색을 하여 병변을 관찰하였다. 그리고 우측외엽과 미상엽에서 간조직을 채취하여 냉아세톤(cold acetone)에 고정하여 6 μm 두께로 paraffin 절편을 만들고, 전암병변(preneoplastic lessions)의 지표효소(marker enzyme)인 glutathione S-transferase(GST-P) 양성 병변에 대한 면역조직 화학적 염색을 하였으며,[30] 연속절편으로 hematoxylin 및 eosin 염색을 하였다.

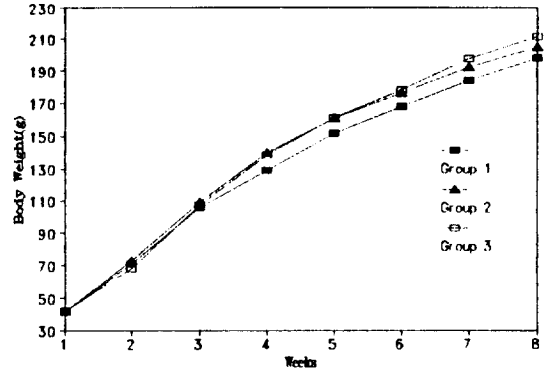

Fig. 2. Mean body weight changes.

칼라 화상분석기(Color Image Analyzer, Q520, Cambridge)를 이용하여 직경 2 mm이상의 GST-P 양성 병변의 수와 면적을 계산하였다.[74]

면역조직 화학적 염색—간 조직내의 GST-P 양성병변의 분포를 확인하기 위해 avindin biotin peroxidase complex(ABC)법을 이용하여 염색을 하였다.[30] Rabbit-anti-GST-P antibody(1차 항체)는 나고야시립대학교 의과대학으로부터 공급받았으며, 0.01 M phosphate bufferred saline(PBS)으로 항체를 10배 희석한 후 bovine serum albumin이 1%가 되도록 첨가하여 냉장보관하면서 사용하였다. Biotin-labeled goat anti-rabbit IgG(2차 항체)와 Avidine-Biotin-Peroxidase Complex(Vectastain Elite ABC kit, PK 6101)는 Vector Laboratories에서 구입해 사용하였다. Paraffin 조직절편은 xylene에서 paraffin을 녹여내고, 농도하강순의 단계적 알콜과정을 거쳐, moisture chamber에서 비특이 반응을 줄이기 위해 정상 goat 혈청(1 : 5 희석; 0.01 M PBS, pH 7.4)으로 blocking 시켰고, rabbit anti-GST-P antibody (1 : 6000 희석), biotin labeled goat anti-rabbit IgG (1 : 4000 희석), avidin biotin peroxidase complex (ABC)를 각각 moisture chamber에서 반응시킨 후, H_2O_2 0.02% diaminobenzidine(DAB; 0.2 M Tris buffer, pH 7.6)에 incubation시켜 정색반응을 일으킨 후 hematoxylin으로 대조염색(counterstain)하여 광학현미경으로 관찰하였다.

자료의 통계처리—시험결과치는 two-tailled t-test를 이용하여 대조값과 비교, 분석하였다. 전 항목에 대하여 공히 5%, 1% 및 0.1%의 수준에서 유의성을 검정하였다.

Table 1. Final body weights and Liver/B.W. Ratios at 4 weeks after weaning in female rats injected with DENA 1 day after birth

Group	Final liver weight (g)	Final B.W. (g)	Liver/B.W. ratio (%)
Group 1	7.78± 1.56	150.43± 14.89	5.12± 0.55
Group 2	10.97± 1.52**	160.57± 14.52	6.81± 0.45***
Group 3	7.90± 0.77	165.50± 10.94	4.77± 0.22

Each value is the mean± S.D. Group 1 and group 2 showed significant difference from group 3 (**$p<0.01$, ***$p<0.001$); B.W. means body weight.

Table 2. Final body weights and Liver/B.W. Ratios at 8 weeks after weaning in female rats injected with DENA 1 day after birth

Group	Final liver weight (g)	Final B.W. (g)	Liver/B.W. ratio (%)
Group 1	10.44± 0.83	213.00± 15.95	4.90± 0.29**
Group 2	12.19± 0.32*	213.71± 10.94	5.71± 0.27***
Group 3	9.70± 1.25	224.86± 24.85	4.31± 0.22

Each value is the mean± S.D. Group 1 and group 2 showed significant difference from group 3 (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$); B.W. means body weight.

결과 및 고찰

체중변화—2-AAF를 투여한 제 1군은 이유 후부터 대조군에 비해 유의성은 없었지만 체중감소가 보였으며, PB를 투여한 제 2군은 대조군과 비교하여 체중변화에 유의성이 없었다(Fig. 2).

간의 무게비—체중에 대한 간의 무게비에 있어서 이유 후 4주째(7주) 부검해본 결과 2-AAF를 투여한 제 1군은 대조군에 비해서 유의성은 없지만 높게 나타났고, PB를 투여한 제 2군은 대조군에 비해 유의성($p<0.001$) 있게 높았다(Table 1). 그리고 8주째(11주) 부검해본 결과 제 1군과 제 2군 모두 대조군에 비해서 체중에 대한 간의 무게비가 각각 유의성($p<0.01$, $p<0.001$) 있게 높았다(Table 2).

육안 및 광학 현미경적 소견—간암 유발물질인 DENA을 투여한 후 2-AAF를 투여한 제 1군과 PB를 투여한 제 2군에서 이유 후 8주(11주)째 부검해 본 결과 모두 간표면에 소수의 회백색의 증식 결절들이 관찰되었다. 그리고 대체로 간의 변연부는 둔탁하였고 전체적으로 종창된 감을 보였다. 특히 PB를 투여한 군에서는 더욱 종창감이 더 하였다. 다만 DENA만을 투여한 제 3군에서는 육안적으로 증식결절이 거의 관찰되지 않았다.

모든 군에서 확인된 GST-P 양성병변(GST-P positive lesions)의 광학현미경적 소견은 주위의 정상 간조직과 경계가 뚜렷한 원형으로 결절의 크기가 다양하게 나타났으며 간 전체에 산재해 있는 것이 관찰되었다(Fig. 3, 5, 7). 병변내 세포들의 염색성은 약간의 호산성 또는 호염기성이었으며, 특히 PB를 투여한 군에서는 호산성 병변들이 두드러지게 많이 관찰되었다(Fig. 5). 증식성 병변들은 다양한 크기의 세포들로 구성되어 있었으며, 핵이 확대되어 있었으며, 일부의 병변에서는 공포성 변화를 보이는 것도 있었다(Fig. 9).

또한 크기가 작은 증식소를 관찰할 수 있었으며, 대부분 호산성이었으며, 주위의 실질조직과의 경계가 뚜렷하지 않았다. 그러나 이의 GST-P에 대한 면역조직 화학적 염색은 주의의 정상 간 조직과 확실하게 구분할 수 있었다(Fig. 4, 6, 8).

전암병변의 수와 면적—각 실험군의 간 조직 1 cm^2 당 증식병변의 수와 면적(mm^2)은 Table 3과 같다.

전암병변의 면적에 있어서 DENA 투여 후 촉진제로서 2-AAF와 PB를 투여한 제 1군과 제 2군 모두 이유 후 4주(7주)째에 각각 유의성($p<0.01$, $p<0.05$)이 인정되었으며, 이유 후 8주(11주)째에도 각각 유의성($p<0.01$, $p<0.05$)이 인정되었다. 전암병변의 수에 있어서는 이유 후 4주째에 제 1군과 제 2군 모두 각각 유의성이 각각($p<0.01$, $p<0.05$) 인정

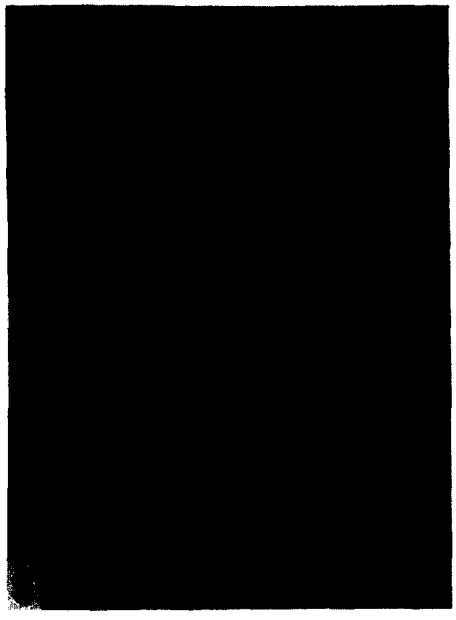

Fig. 3. Preneoplastic lesion induced with DENA as an initiator and promoted by a diet containing 2-AAF for 3 weeks in newborn rat (at 8 weeks after weaning). H & E, ×40.

Fig. 4. GST-P positive lesion induced with DENA as an initiator and promoted by a diet containing 2-AAF for 3 weeks in newborn rat (at 8 weeks after weaning). Serial section to that of Fig. 1. ABC staining, ×40.

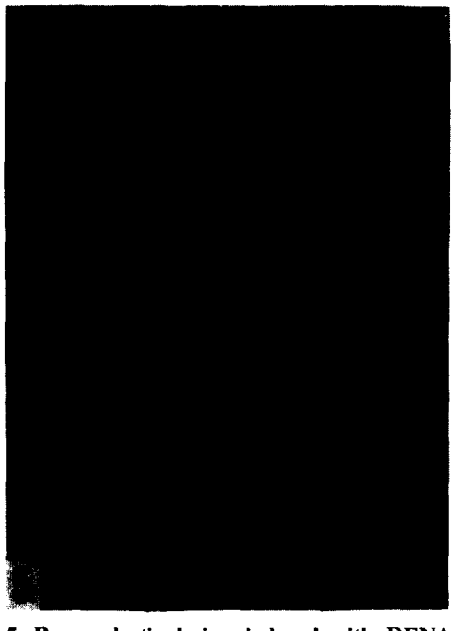

Fig. 5. Preneoplastic lesion induced with DENA as an initiator and promoted by 0.05% PB for 8 weeks in newborn rat (at 8 weeks after weaning). H & E, ×40.

Fig. 6. GST-P positive lesion induced with DENA as an initiator and promoted by 0.05% PB for 8 weeks in newborn rat (at 8 weeks after weaning). Serial section to that of Fig. 3. ABC staining, ×40.

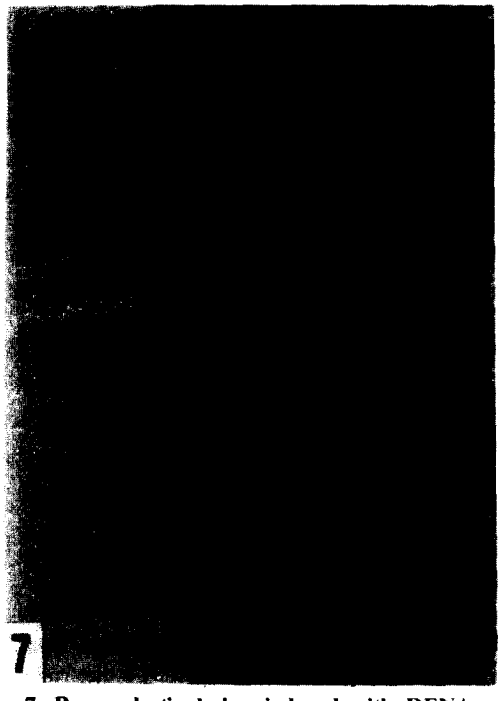

Fig. 7. Preneoplastic lesion induced with DENA as an initiator in newborn rat (at 8 weeks after weaning). H & E, ×40.

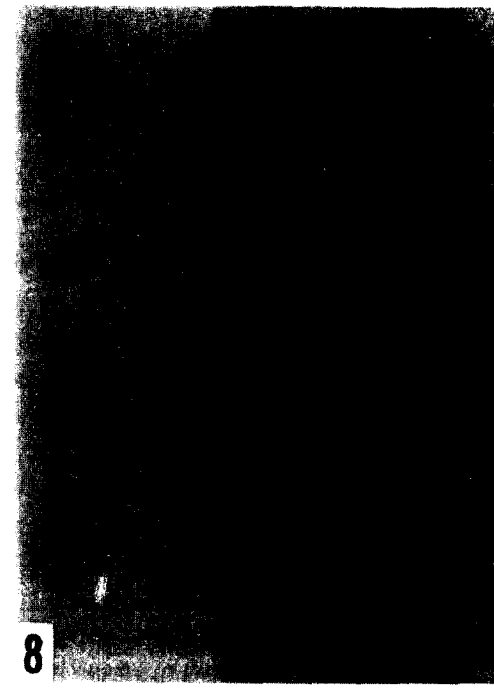

Fig. 8. GST-P positive lesion induced with DENA as an initiator in newborn rat (at weeks after weaning). Serial section to that of Fig. 5. ABC staining, ×40.

되었지만, 이유 후 8주(11주)째에는 제2군에서만 대조군에 비해 유의성($p<0.01$)이 인정되었다.

제1군과 제2군의 전암병변의 면적을 비교해 볼 때 제2군에서 비교적 높게 나타났으며, 이는 신생 랫드 중 암컷이 PB의 촉진효과에 민감하다는 것을 암시하고 있다.

제1군에서 이유 후 4주째(7주)에 유의성을 보인 전암병변의 수가 이유 후 8주째(11주)에 유의성을 보이지 않는 것은 병변들이 서로 융합되어져서 병변의 면적이 커졌다고 볼 수 있으며, 반면에 제2군은 전암병변의 수도 증가하고 면적도 커졌음을 알 수 있다.

화학적 발암제에 의한 암 발생의 연구는 학자에 따라 약간씩 견해의 차이를 보이고 있는데 유발(initiation)과 촉진(promotion)과정을 거쳐 암이 발생한다는 2단계이론[22,27,36,59-61]과, 발암유발 이후에 암으로 진행되는 모든 과정을 진행과정(progression)으로 보는 견해가 있다.[15] 그러나 오늘날에 와서는 많은 다단계 발암화 과정에 대한 연구결과, 2단계 이론과 진행과정을 결합한 개념인 유발, 촉진, 그리고 진행과정의 3단계 이론으로 종양의 발생을 설명하고 있다.[37] 즉 유발과정은 유전자에 직접 작용하는 발암물질의 투여로 일어나는 유전자 구조변화와 관련을 맺고 있는 비가역적인 과정으로, 비교적 짧은 시간 노출해도 가능하며, 세포증식이 활발하게 일

Fig. 9. Magnification of cells within the preneoplastic lesion induced with DENA as an initiator and promoted by 0.05% PB for 8 weeks in newborn rats (at 8 weeks after weaning). Most cell was eosinophilic. H & E ×200.

Table 3. Total area of glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive lesions at 4 and 8 weeks after weaning in female rats injected with DENA 1 day after birth

Group	Treatment	Total area (mm^2/cm^2) of GST-P positive lesions 4 weeks(6)[a]		8 weeks(6)[a]	
		No/cm^2	area (mm^2/cm^2)	No/cm^2	area (mm^2/cm^2)
1	DENA→2-AAF	17.60** ± 4.19	2.10** ± 0.56	17.00 ± 3.42	4.66** ± 1.49
2	DENA→PB	13.50* ± 4.43	2.70* ± 1.21	29.00** ± 7.19	5.03* ± 2.20
3	DENA	7.17 ± 2.11	1.01 ± 0.28	15.80 ± 2.67	2.00 ± 0.42

Each value is the mean± S.D. Group 1 and group 2 showed significant difference from group 3 (*$p<0.05$, **$p<0.01$). [a] Numbers in parenthesis mean sacrificed animal numbers.

어나는 간에서 그 유발율이 높은 것으로 보고되고 있다.[10] 한편 촉진과정은 긴 기간동안 직접적으로 유전자에 작용하지 않고 유발단계 때 생긴 변이세포의 발현을 도우면서 변이세포군들이 가역적으로 증식하도록 하는 과정이며, 진행단계는 유발, 촉진된 세포군이 악성종양으로 자율적으로 발달해 나가는 비가역적인 과정을 말한다.[37]

대부분의 암의 유발물질들(initiators)은 장기특이성이 강하다는 특징이 있으며,[11] 비록 유발물질에 노출되었다 하더라도 촉진제에 의해 보완될 때에야 비로소 암이 발생된다. 또한, 한 가지의 촉진제가 여러 장기에 작용하여 암발생을 촉진시키기 때문에,[62,59-61] 사람의 암발생에 결정적인 역할을 하는 환경적 요인은 촉진제들(promoter)이라고 생각된다.[59-61,37] 따라서 암의 예방적 차원에서 암유발물질들과 촉진물질들을 짧은 기간내에 정확하게 검색하는 방법이 요구되고 있다.

랫드 간에서 화학적 발암물질에 의해 유발된 간암병변의 초기변화의 지표효소(marker enzyme)로서 γ-glutamyl transpeptidase(γ-GT) 및 glutathione S-transferase placental form(GST-P)이 잘 알려져 있는데, 이들 효소는 발암물질에 의해 특이적으로 활성이 유도된다.[44,14,25,45,43] 특히 GST-P는 간에서 해독작용에 관여하는 glutathione S-transferase group의 한 효소로서, 정상 랫드 간에서는 거의 검출할 수 없는데, 화학적 발암물질에 의해 유발된 간의 전암병변(preneoplastic lesions)에서는 특이적으로 그 level이 증가되며,[25,43,51] 화학적 발암물질을 투여해도 전암병변을 형성하기 전에는 거의 그 level이 증가되지 않는다.[44,42] 또한 이 효소는 장기 생체시험 성적에의 적중율이 높아서[30,24] 랫드 간에서 화학적 발암물질에 의한 전암병변의 가장 특이적인 지표효소로 평가되고 있다.[59-61,44,30,25,45,43] 따라서 본 연구에서는 GTS-P를 전암병변의 지표효소로 이용하여, 강력한 발암물질이며 촉진제인 2-acetylaminofluorene (2-AAF)[60,30]과 약한 촉진제이며 직접적으로 암을 유발시키지 못하는 phenobarbital(PB)을 투여하여 강한 촉진제에서나 약한 촉진제에서도 발암성을 검색할 수 있는 실험방법을 찾고자 하였다. 즉 PB에 대하여 민감하게 반응한다는 신생 암컷 랫드를[33] 사용한 결과, 비교적 짧은 기간(7주)에 GST-P 양성병변의 면적을 이용한 발암성의 검색이 강한 촉진제에나 약한 촉진제에서 모두 가능하였음을 알 수 있었다(Table 3).

본 실험에서 촉진효과를 보인 PB는 Ames' test에서 변이원성이 인정되지 않았으며, 단기 발암성 검색법에서 saline 투여 후 계속적으로 투여해도 전혀 증식결절을 유발하지 않은 반면 DENA 투여 후 급여시에는 촉진효과를 보였다고 한다.[54,23] PB의 촉진효과에 대해서는 많은 논란이 되고 있다. 15일령 B6C3F1 마우스에 DENA를 투여하고 이유와 동시에 PB를 투여한 결과 수컷마우스에서는 발암억제 효과가 있었으나, 암컷마우스에서는 발암 촉진효과가 있었다는 보고가 있다.[71] 또한 15일령의 수컷마우스를 이용한 PB의 투여시기를 달리해 본 실험에서도 PB의 투여시기에 관계없이 억제 효과를

보였다고 한다.[26] 반면 위에서 억제효과를 보인 15일령의 B6C3F1 마우스에 DENA를 4~8주째 투여한 다음에 PB를 투여하면 종양발생이 촉진되었다고 하며,[34,12] 종(species)을 달리한 실험에서는 15일령 때 DENA를 모두 같이 투여해본 결과 B6C3F1 마우스에서는 억제효과를 보인 반면 C3H 마우스에서는 촉진효과를 보였다고 한다.[72] 이와 같이 PB의 발암촉진 효과와 억제효과에 대한 원인을 규명되지 않았지만 위의 연구결과로 볼 때 암 유발물질의 투여시기와 종차이, 그리고 성(sex)에 따른 차이에 기인한다고 볼수 있다. 한편 랫드에 있어서도 종차이에 의한 PB의 효과가 달라진다는 보고가 진효과는 수컷보다 암컷이 더 민감하다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 신생 암컷 SD 랫드를 이용하여 실험하였으며, 나온 결과가 Peraino 등[31]이 주장하는 것과 같이 암컷 랫드가 PB에 민감함을 알 수 있었다(Table 3).

PB의 투여는 간에서 이물질 대사효소의 유발과 간세포의 비대(hepatocyte hypertropy), DNA 합성의 증가, SER(smooth endoplasmic reticulum)의 증식 등을 유발시킨다고 한다.[71,46,50] 또한 단백합성, 인지질합성, cytochrome P-450 isoenzyme,[48] glutathione conjugation 및 혈류 등이 증가한다고 한다.[50] 이러한 보고들은 본 실험에서 보여준 PB 투여 군이 대조군과 비교해서 간의 무게가 유의성있게 높게 나타남에 대한 이유가 될 수 있다. 또한 PB는 정상 간세포나 전암성 간세포(preneoplastic hepatocyte)에서 모두 DNA 합성과 세포증식을 증가시키지만 정상 간세포에서는 곧 정상으로 회복되고,[46] 전암성 간세포에서는 계속 증가함으로써 암 발생에 대한 촉진효과를 보인다고 한다.[71] 즉 PB는 전암성 간세포내의 cell attrition을 감소시키고, 정상적인 간세포로의 전환을 억제하며, 세포증식을 증가시켜 전암병변의 크기를 증가시킴으로써 촉진효과를 나타낸다고 한다.[71] 또한 Hermann 등[20]은 PB의 투여가 clear cell을 호산성과 호염기성의 세포로 변화시켜 주고, 미약하게 구별되는 전암병변을 뚜렷하게 구별되도록 하며, 전암병변의 크기를 증가시켜 발암에 대하여 촉진효과를 보인다고 하였다. 이러한 이론들은 본 실험에서 보여준 PB 투여군에서의 GST-P 양성 병변들의 수와 면적의 증가와 일치함을 보이고 있다(Table 3).

신생동물을 이용한 발암성 시험은 Toth 등(1968)이 성숙동물보다 어린동물이 민감하다고 보고한 이래 많은 연구가 있어왔다.[9,33,70,39] Peraino 등[33]은 신생 암컷랫드에 DENA, benzo[a]pyrene(BAP), benzo[e]pyrene(BEP) 등의 발암제를 투여한 후 이유와 동시에 PB를 투여하여 이유 후 4주째(7주)에 γ-GT 양성소로 발암성을 검색해 본 결과 강력한 발암제인 DENA를 투여한 군이 BAP를 투여한 군보다 많은 수의 양성소를 보였고, BEP를 투여한 군에서는 이유 후 8주(11주)에 미약하게 γ-GT 양성소를 보였음을 보고하였다. 즉 사용되는 발암제의 강약에 따라서 γ-GT 양성소의 발현되는 정도가 다름을 알 수 있으며, 신생랫드를 이용한 간발암성 검색 모델이 주위의 강력한 발암제의 검출에 유용하게 이용될 수 있다고 하였다. 또한 Cater 등[9]은 신생마우스에 dimethylnitrosamine(DMNA)을 투여한 후 이유와 동시에 PB로 촉진시켜 8주째에 전암병변의 검색에 사용되고 있는 철저항소와 γ-GT 양성소가 암컷과 수컷 모두에 나타났음을 보고하였으며, 이러한 모델이 단기간에 화학물질의 발암성 검색에 유용하다고 하였다.

신생동물을 이용한 발암성 실험이 보다 민감하다는 것은 확실히 정립되어 있는 이론은 아니지만 다음으로 설명할 수 있다. 신생동물은 성숙동물에 비해 각 기관의 발달 속도가 빠르고 세포증식이 활발하며, 화학물질의 대사속도가 성숙동물에 비해 느리다는 점이다.[57] 그 예로서 Urethan의 발암성은 신생동물을 이용한 실험에서 높게 나타났으며, 이에 대한 설명으로 신생동물의 느린 대사속도를 들었다.[57,66] 또한 면역학적으로 결손상태인 신생동물은 악성으로의 진행이 성숙한 연령에 비해 더 빠르다[57,66]는 점이다. 한편 Vesselinovitch 등이 출생전의 간은 세포들이 조혈적이어서(hematopoietic liver cell) 민감성이 낮고, 성숙한 동물의 간은 고분자적 및 세포학적 증식비율(macromolecular and cellular replicating rate)이 낮기 때문에 간 발암화작용(hepatocarcinogenesis)에 대하여 저항적인 반면 신생마우스와 영아마우스가 간발암화 작용에 대해 높은 민감성을 보이는 것은 활발한 고분자 전환(macromolecular turnover)으로 인한 암의 유발(inception)을 촉진시키기 때문이라고 하였다.[70] 또한 비록 1일령 마우스의 간의 탈에틸화 활성도(de-ethylating activity)가 낮지만 10 μg DENA/g을 투여했을 때 96% 정도의 간암발생율을 보였으며, 이는 'overriding effect'에

의한 것이라고 하였다.[70,39]

신생동물이나 영아기의 동물을 발암성 실험에 이용함에는 대략 다음과 같은 장점이 있다.[9,33,67,68] 첫째로 민감한 모델이라는 것이다. 즉, 성숙한 동물에서 사용되는 실험물질의 양보다 훨씬 적은 양(약 1/50)으로 그 효과는 성숙한 동물을 이용한 것보다 더 높게 나타내므로써 신생동물을 이용한 발암성 실험이 민감함을 알 수 있다.[54,58,55,21] 둘째로 신속성을 들 수 있다. 즉, 본 실험 결과 발암성 검색이 이유 후 4주째(7주)에 가능하였음을 알 수 있었으며, 더욱 그 기간을 앞당길 수도 있다는 가능성을 시사해 주고 있다. 몇몇 보고에서는 성숙한 랫드에서 간의 부분적 절제수술을 한 다음에 발암물질에 투여한 후의 종양발생이 신생랫드를 이용한 실험보다는 빠르지 않다고 보고하였다.[54,58,55,21] 세째로는 간단하게 실험을 할 수 있다는 점이다. Ito 등[23]이 개발한 8주 모델에서 필요로 하는 간의 부분적 절제수술을 하지 않아도 된다는 점은 노력과 시간, 그리고 경제적인 면에서 장점일 수 있다. 또한 간의 증식을 위한 CCl_4 등의 투여[58,53]를 배제할 수 있으며, 결과의 해석에 있어서도 부가적인 물질에 대한 고려를 하지 않아도 된다는 장점이 있다.[73] 이상과 같은 장점들을 고려해볼 때, 신생랫드를 이용한 모델이 각종 화학물질들의 발암성을 연구하는데 매우 유용한 생체시험 방법이라고 할 수 있다.

본 실험 결과 신생 암컷 랫드를 이용하여 DENA로 암을 유발시킨 후 강력한 촉진제인 2-AAF를 사용하여 촉진시킨 제 1군과 약한 촉진제인 PB를 투여하여 촉진시킨 제 2군 모두 DENA만을 투여한 대조군과 비교하여 이유 후 4주째(7주)에 GST-P 양성병변의 면적이 각각 유의성($p<0.01$, $p<0.05$) 있게 높았다. 또한 이유 후 8주째(11주)에서도 각각 유의성($p<0.01$, $p<0.05$) 있게 높았다. 이는 많은 화학물질들의 간발암성과 발암촉진효과가 강하건 약하건 간에 검색이 가능함을 시사해 주고 있다. 따라서 신생랫드를 이용한 실험방법은 많은 화학물질의 발암성을 검색하는데 유용한 검색법으로 생각된다.

국문요약

간의 부분적 절제수술을 하지 않고 새로운 발암성 검색법을 찾고자, 화학물질에 민감한 신생암컷 Sprague-Dawley 랫드를 사용하여 diethylnitrosamine(DENA)으로 암을 유발시킨 후, 제 1군에는 강력한 촉진제로서 2-acetylaminofluorene (2-AAF)을 사료에 0.01%가 되게 섞어 투여하였고, 제 2군은 약한 촉진제인 phenobarbital을 암수에 0.05% 농도로 녹여 투여하였으며, 제 3군은 대조군으로 DENA만을 1회 투여하였다. 그리고 발암성 평가는 glutathione S-transferase placental form(GST-P)을 사용하여 검색하였다.

그 결과 체중에 대한 간의 무게비는 이유 후 4주째(7주)에 제 2군이 제 3군인 대조군에 비해 유의성 있게($p<0.01$) 높았으며, 이유 후 8주째(11주)에는 제 1군과 제 2군이 대조군이 비해 각각 유의성 있게($p<0.01$, $p<0.001$) 높았다. 그리고 이유 후 4주(7주)째에 GST-P 양성병변을 이용한 전암병변의 면적을 비교해 본 바 제 1군과 제 2군이 대조군인 제 3군에 비해 각각 유의성 있게($p<0.01$, $p<0.05$) 높았다. 또한 이유 후 8주(11주)째에도 제 1군과 제 2군이 각각 유의성 있게($p<0.01$, $p<0.05$) 높게 나타났다.

이상의 결과에서 신생랫드를 이용한 발암성 실험은 간의 부분적 절제수술을 하지 않고도 화학물질의 발암성을 좀 더 이른 시기에 검색할 수 있음을 알 수 있었다. 그러므로 신생동물을 이용한 발암성 실험은 많은 화학물질들의 발암성을 검색하는데 매우 유용한 방법으로 사료된다.

참고문헌

1. Ames, B.N.: Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, **221**, 1256-1264 (1983).
2. Ames, B.N.: Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer. *Science*, **204**, 587-593 (1979).
3. Asamoto, M., Tsuda, M., Kato, T., Ito, N., Masuko, T., Hashimoto, Y. and Nagase, S.: Strain differences in susceptibility to 2-acetylaminofluorene and phenobarbital promotion of hepatocarcinogenesis: Immunohistochemical analysis of cytochrome P-450 isozyme induction by 2-acetylaminofluorene and phenobarbital. *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 1041-

1046 (1989).
4. Ashby, J. and Styles, J.A.: Factors influencing mutagenic potency in vitro. *Nature,* **274**, 20-22 (1978).
5. Bridges, B.A.: Short-term screening tests for carcinogen: *Nature,* **261**, 195-200 (1976).
6. Cameron, R.G., Imaida, K. and Ito, N.: Promotive effects of ethynylestradiol in hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in male rats. *Gann,* **72**, 339-340 (1981a).
7. Cameron, R.G., Imaida, K. and Ito, N.: Promotive effects of deoxycholic acids on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in male rats. *Gann,* **72**, 635-636 (1981b).
8. Cameron, R.G., Imaida, K., Tsuda, H. and Ito, N.: Promotive effects of steroids and bile acids on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in male rats. *Gann,* **72**, 2426-2428 (1981c).
9. Cater, K.C., Gandolfi, A.J. and Sipes, I.G.: Characterization of dimethylnitrosamine-induced focal and nodular lesions in the livers of newborn mice. *Toxicologic Pathology,* **13**, 3-9 (1985).
10. Columbano, A., Rajalakshmi, S. and Sarma, D.S. R.: Requirement of cell proliferation for the initiation of liver carcinogenesis as assayed by three different procedures. *Cancer Res.* **41**, 2079-2083 (1981).
11. Coombs, M.M.: Organ specificity in tumor initiation and complete carcinogenesis(including species variation). In: Target organ Toxicity. Vol.II., Cohen, G.M.(ed), Boca Raton, CRC press Inc., pp. 181-208 (1986).
12. Diwan, B.A., Rice, J.M., Ward, J.M., Oshima, M. and Lynch, P.H.: Inhibition by phenobarbital and lack of effect of amobarbital on the development of liver tumors induced by N-nitrosodiethylamine in juvenile B6C3F1 mice. *Cancer Letters,* **23**, 223-234 (1984).
13. Farber, E.: The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.,* **44**, 4217-4223 (1984).
14. Fiala, S., Mohindru, A., Kettering, W.G., Fiala, A. E. and Morris, H.P.: Glutathione and gamma glutamyltranspeptidase in rat liver during chemical carcinogenesis. *J. Natl. Can. Inst.,* **57**, 591-598 (1976).
15. Foulds, L.: The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res.,* **14**, 327-339 (1954).
16. Fujii, K., Nomotto, K.I. and Nakamura, K.: Tumor induction in mice administered neonatally with 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b]indole or 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole. *Carcinogenesis,* **8**, 1721-1723 (1987).
17. Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F. O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggaar, R. and Kriek, N.P.J.: Fumonisins-Novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by Fusarium moniliforme. *Applied and Environmental Microbiology,* **54**, 1806-1811 (1988).
18. Hasegawa, R., Tsuda, H., Shirai, T., Kurata, Y., Masuda, A. and Ito, N.: Effect of timing of partial hepatectomy on the induction of preneoplastic liver foci in rats given hepatocarcinogens. *Cancer Letters,* **32**, 15-23 (1986).
19. Heidelberger, C.: Chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Biochem.,* **44**, 79-121 (1975).
20. Hermann, R.S., Trosiener, I.T., Barthel, G. and Bursch, W.: DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Res.,* **50**, 5127-5135 (1990).
21. Hirakawa, T., Ishikawa, T., Nemoto, N., Takauama, S. and Kitagawa, T.: Induction of enzyme-altered islands in rat liver by a single treatment with benzo[a]pyrene after partial hepatectomy. *Gann,* **70**, 393-394 (1979).
22. Ito, N., Tatematsu, M., Imaida, K., Hasegawa, R. and Murasaki, G.: Effects of various promoters on the induction of hyperplastic nodules in rats liver. *Gann,* **71**, 415-416 (1980a).
23. Ito, N., Tatematsu, M., Nakanishi, K., Hasegawa, R., Takano, T., Imaida, K. and Ogiso, T.: The effects of various chemicals on the development of hyperplastic liver nodules in hepatectomized rats treated with N-nitroso- diethylamine or N-2-acetylaminofluorene. *Gann,* **71**, 832-842 (1980b).
24. Ito, N., Inoue, T., Tagawa, Y., Aoki, T. and Kagawa, M.: Development of new rapid bioassay for carcinogens to predict the results of long term carcinogenicity test. *Toxicol. Forum,* **9**, 601-611 (1986).
25. Kitahara, A., Satoh, K., Nishimura, K., Ishikawa, T., Ruike, K., Sato, K., Tsuda, H. and Ito, N.: Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.,* **44**, 2698-2703 (1980).
26. Klaunig, J.E., Weghorst, C.M. and Pereira, M.A.: Effect of the age of B6C3F1 mice on phenobarbi-

tal promotion of diethylnitrosamine-induced liver tumors. *Toxicology and applied pharmacology*, **90**, 79-85 (1988).
27. Marx, J.L.: Tumor promoters: Carcinogenesis gets more complicated. *Science*, **201**, 515-518 (1978).
28. Miller, J.A. and Miller, E.C.: Carcinogens occurring naturally on foods. *Federation Proc.*, **35**, 1316-1321 (1976).
29. Nowell, P.C.: Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.*, **46**, 2203-2207 (1986).
30. Ogiso, T., Tatematsu, M., Tamano, S., Tsuda, H. and Ito, N.: Comparative effects of glutathione S-transferase-positive liver nodules in a long-term assay. *Toxicol. Patho.*, **13**, 257-265 (1985).
31. Peraino, C., Staffeldt, E.F., Carnes, B.A., Ludeman, V.A., Blomquist, J.A. and Vesselinovitch, S. D.: Characterization of histochemically detectable altered hepatocyte foci and their relationship to hepatic tumorigenes in rats treated once with diethylnitrosamine or benzo(a)pyrene within one day after birth. *Cancer Res.*, **44**, 3340-3347 (1984).
32. Peraino, C., Grdina, D.J. and Carnes, B.A.: Synergistic induction of altered hepatocyte foci by combined gamma radiation and diethylnitrosamine administered to neonatal rats. *Carcinogenesis*, **7**, 445-448 (1986).
33. Peraino, C., Staffeldt, E.F. and Ludeman, V.A.: Early appearance of histochemically altered hepatocyte foci and liver tumors in female rats treated with carcinogens one day after birth. *Carcinogenesis*, **2**, 463-465 (1981).
34. Pereira, M.A., Klaunig, J.E., Herren-Freund, S.L. and Ruch, R.J.: Effect of phenobarbital on the development of liver tumors in juvenile and adult mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **77**, 449-452 (1986).
35. Pitot, H.C. and Sirica, A.E.: The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochem. Biophys. Acta*, **605**, 191-215 (1980).
36. Pitot, H.C.: Biological and enzymatic events in chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Med.*, **30**, 25-39 (1979).
37. Pitot, H.C.: Progression: The terminal stages in carcinogenesis. *Gann*, **80**: 599-607 (1989).
38. Pitot, H.C., Barsness, L., Golworthy, T. and Kitagawa T.: Biochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after single dose of diethylnitrosamine. *Nature*, **271**, 456-458 (1978).
39. Rao, K.V.N. and Vesselinovitch, S.D.: Age- and Sex-associated diethylnitrosamine dealkylation activity of the mouse liver and hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, **33**, 1625-1627 (1973).
40. Rao, M.S., Subbarao, V. and Scarpelli, D.G.: Carcinogenic effect of N-nitrosobis(2-oxpropyl)amine in newborn rats. *Carcinogenesis*, **6**, 1395-1397 (1985).
41. Rinkus, S.J. and Legator, M.S.: Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the Salmonella typhimurium system. *Caner Res.*, **39**, 3289-3318 (1979).
42. Sato, K.: Tumor markers with special reference to marker enzymes for chemical hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Forum*, **10**, 55-64 (1987).
43. Sato, K.: Glutathione S-transferase and hepatocarcinogenesis. *J. Natl. Can. Inst.*, **79**, 556-572 (1988).
44. Sato, K., Kitahara, A., Satoh, K., Ishigawa, T., Tatematsu, M. and Ito, N.: The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gann*, **75**, 199-202 (1984).
45. Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., Inaba, Y., Hatayama, I. and Sato, K.: Purification, induction and distribution of placental glutathione transferase; A new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3964-3968 (1985).
46. Schulte-Hermann, R.: Two-stage control of cell proliferation induced in rat liver by α-hexachlorocyclohexane. *Cancer Res.*, **37**, 166-171 (1977).
47. Schulte-Hermann, R., Ohde, G., Schuppler, J. and Timmerman-Trosiener, I.: Enhanced proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver following treatment with the tumor promoters phenobarbital, hexachlorocyclohexane, steroid compounds and nafenopin. *Cancer Res.*, **41**, 2556-2562 (1981).
48. Schwarz, M., Peres, G., Buchmann, A., Friedberg, T., Waxman, D.J. and Kunz, W.: Phenobarbital induction of cytochrome P-450 in normal and preneoplastic rat liver: comparison of enzyme and mRNA expression as detected by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *Carcinogenesis*, **8**, 1355-1357 (1987).
49. Sherer, E., Hoffmann, M., Emmelot, P. and Friedrich-Freksa, M.: Quantitative study on foci of altered liver cells induced by diethylnitrosamine

and partial hepatectomy. *J. Natl. Cancer Inst.*, **49**, 93-106 (1972).
50. Sipes, I.G. and Gandolfi, A.J.: Biotransformation of toxicants. In: Casarett and Doull's Toxicology. 3rd ed., Klassen, C.D., Amdur, M.O. and Doull, J.(ed), New York, Macmillan, pp.99-173 (1986).
51. Smirnova, I.O. and Turusov, V.S.: 1,2-Dimethylhydrazine carcinogenesis in neonatally androgenized CBA mice. *Carcinogenesis*, **9**, 1927-1929 (1988).
52. Solt, D. and Farber, E.: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, **263**, 701-703 (1976).
53. Takano, T., Tatematsu, M., Hasegawa, R., Imaida and Ito, N.: Dose- response relationship for the promoting effect of phenobarbital on the induction of liver hyperplastic nodules in rats exposed to 2-fluorenylacetamide and carbon tetrachloride. *Gann*, **71**, 580-581 (1980).
54. Tatematsu, M., Nakanshi, K., Murasaki, G., Mayata, Y., Hirose, M. and Ito, N.: Enhancing effects of inducers of liver microsomal enzymes on induction of hyperplastic liver nodules by N-2-fluorenylacetamide in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**, 1411-1416 (1979).
55. Tatematsu, M., Shirai, T., Tsuda, H., Miuata, Y., Shinohara, Y. and Ito, Y.: Rapid production of hyperplastic liver nodules in rats treated with carcinogenic chemicals: a new approach for in vivo short-term screening tests for hepatocarcinogenesis. *Gann*, **68**, 499-507 (1977).
56. Thamavit, M., Tatematsu, M., Ogiso, T., Mera, Y., Tsuda, H. and Ito, N.: Dose-dependent effects of butylated hydoxyanisole, butylated hydroxytoluene and ethoxyquin in induction of foci of rat liver cells containing the placental form of glutathione S-transferase. *Cancer Letters*, **27**, 295-303 (1985).
57. Toth, B.: A critical review of experimental in chemical carcinogenesis using newborn animals. *Cancer Res.*, **28**, 727-738 (1968).
58. Tsuda, H., Lee, G. and Farber, E.: Induction of resistant hepatocytes as a new principle for a possible short-term in vivo test for carcinogens. *Cancer Res.*, **40**, 1157-1164 (1980).
59. Tsuda, H., Masui, T., Imaida, K., Fukushima, S. and Ito, N.: Promotive effect of primary and secondary bile acids on the induction of γ-glutamyl transpeptidase positive liver cell foci as a possible endogenous factor for hepatocarcinogenesis in rats. *Gann*, **75**, 871-875 (1984a).
60. Tsuda, H., Hasegawa, R., Imaida, K., Masui, T., Moore, M.A. and Ito, N.: Modifying potential of thirty-one chemicals on the short-term development of γ-glutamyl transpeptidase-positive foci in diethylnitrosamine-initiated rat liver. *Gann*, **75**, 876-883 (1984b).
61. Tsuda, H., Sakata, T., Shirai, T., Kurata, Y., Tamano, S. and Ito, N.: Modification of N-methyl-N-nitrosourea initiated carcinogenesis in the rat by subsequent treatment with antioxidants, phenobarbital and ethinyl estradiol. *Cancer Letters*, **24**, 19-27 (1984c).
62. Tsuda, H., Fukushima, S., Imaida, K., Kurata, Y. and Ito, N.: Organ specific promoting effect of phenobarbital and saccharin in induction of thyroid, liver, and urinary bladder tumors in rats after initiation with N-nitrosomethylurea. *Cancer Res.*, **43**, 3292-3296 (1983).
63. Uchida, E. and Hirono, I.: Effect of phenobarbital on induction of liver and lung tumors by dimethylnitrosamine in newborn mice. *Gann*, **70**, 639-644 (1979).
64. Venitt, S.: Bacterial mutation as an indicator of carcinogenicity. *Br. Med. Bull.*, **36**, 57-62 (1980).
65. Vesselinovitch, S.D. and Mihailovich, N.: Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res.*, **43**, 4253-4259 (1983).
66. Vesselinovitch, S.D. and Mihailovich, N.: Significance of newborn age and dose of urethan in leukemogenesis. *Cancer Res.*, **26**, 1633-1637 (1966).
67. Vesselinovitch, S.D.: Infant mouse as a sensitive system for carcinogenicity of N-nitroso compounds. *IARC Sci. Path.*, **21**, 645-655 (1980).
68. Vesselinovitch, S.D.: Certain aspects of hepatocarcinogenesis in the infant mouse model. *Toxicologic Pathology ISSN*, **15**, 221-228 (1987).
69. Vesselinovitch, S.D., Hacker, H.J. and Bannasch, P.: Histochemical characterization of focal hepatic lesions induced by single diethylnitrosamine treatment in infant mice. *Cancer Res.*, **45**, 2774-2780 (1985).
70. Vesselinovitch, S.D., Rao, K.V.N. and Mihailovich, N.: Neoplastic response of mouse tissue during perinatal age periods and its significance in chemical carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **51**, 239-250 (1979).

71. Weghorst, C.M. and Klaunig, J.E.: Phenobarbital promotion in diethylnitrosamine-initiated infant B 6C3F1 mice: influence of gender. *Carcinogenesis*, **10**, 609-612 (1989a).
72. Weghorst, C.M., Pereira, M.A. and Klaunig, J.E.: Strain differences in hepatic tumor promotion by phenobarbital in diethylnitrosamine- and dimethylnitrosamine-initiated infant male mice. *Carcinogenesis*, **10**, 1409-1412 (1989b).
73. van der Heijden, C.A., Dormans, J.A.M.A. and van Nesselrooij, J.H.J. 11.: Short-term induction of preneoplastic nodules in the rat liver. I. The role of 2-AAF as selecting agent. *Eur. J. Cancer*, **16**, 1389-1398 (1980).
74. 김종수, 이영순 : 새로운 단기 항암성 스크리닝법에 의한 영지 추출물의 효과에 대한 연구, 한국독성학회지, 5권, 135-149 (1989).