J. Fd Hyg. Safety, 13(1), 29 - 33(1998)

식품 중 Ellagic acid의 발암수식효과

장동덕† · 신동환 · 홍충만 · 조재천 · 한정희*
*식품의약품안전청 병리부, *강원대학교 수의학과*

Modifying Effects of Ellagic Acid in Food on Carcinogenesis

Dong Deuk Jang†, Dong Whan Shin, Choong Man Hong,
Jae Chon Cho and Jung Hee Han*
Department of Pathology, Korea Food and Drug Administration, Seoul, 122-704, Korea
**Depr. of Veterinary Medicine, College of Animal Agriculture, Kangwon Nation Univ., Chuncheon 200-701, Korea*

ABSTRACT—The effect of ellagic acid (EA) on hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine (DEN), and promoted by phenobarbital (PB), and hepatectomized partially was investigated in male Wistar rats. All rats were injected 200 mg of DEN intraperitoneally, received 0.05 % of PB in drinking water at week 2, and hepatectomized 2/3 of liver at week 3. Rats of group 2, 3 and 4 were fed diet containing 400ppm EA for 1week before DEN administration, for 9 weeks from beginning of experiment to sacrifice and for 6 weeks from PB treatment to sacrifice respectively. Rats of group 5, 6 and 7 were fed 800 ppm EA in the same manner as group 2, 3 and 4. Animals were killed at 8 weeks after DEN administration. The number and area of preneoplastic lesions were quantified the glutathione-S-transferase placental-form (GST-P) positive foci using immunohistochemical method. Decrease of number and area of the positive foci was observed in the rats fed 400 ppm EA for 9 weeks. In addition, the reduction of the foci can examine in all group fed 800 ppm EA. In conclusion, EA inhibited the hepatocarcinogenesis induced by DEN when it was administrated 800 ppm.

Key wods □ Ellagic acid, hepatectomy, GST-P positive foci, carcinogenesis

의약품과 식품을 포함한 자연이나 환경속에 포함되어 있는 여러가지 화학물질들은 암 및 돌연변이를 유발할 수 있기 때문에 이로인한 유해작용을 줄이려 노력하고 있으나 완전제거는 불가능하다. 따라서 식생활 습관을 개선하여 암의 발생을 줄이기 위한 연구가 관심의 대상이며 이런 목적으로 음식물 중에 자연적으로 존재하는 항암 및 항돌연변이 물질을 찾아내려는 시도가 암의 치료제 개발 못지않게 주요한 연구의 대상으로 주목받고 있다.

자연속에 존재하는 항발암물질 중 ellagic acid(EA)는 전구물질이 ellagitannin이며, 포도, 딸기, 나무딸기, 땅콩류 및 녹차 등에 존재하는 식물성 페놀이다.[1] EA는 강력한 항발암물질인 동시에 혈액응고를 촉진하기 때문에 과일쥬스나 포도주 제조회사들은 흥미를 가지고 연구하고 있다.[2,3] EA는 발암물질인 benzo(a)pyrene(BP), nitrosocompounds, N-2-fluorenyacetamide 및 aflatoxin B_1 등에 의하여 유전자에 손상을 주는 대사산물로의 전환을 억제하거나 glutathione S-transferase의 활성을 증가시켜 체내에서 발암물질을 대사시키거나 발암물질에 직접 EA가 결합하여 발암작용을 없애는 방법 등에 의하여 발암을 억제하는 것으로 알려져 있다.[3-6] EA에 의한 발암억제 연구로는 EA를 사료나 복강으로 마우스에 급여시 B(a)P로 유발된 폐선종양 발생의 억제[7,8] 그리고 MBNA에 유발된 랫드의 식도암 발생이 EA에 의해 감소[9] 등이 있다. 또한 EA는 피부암과[10] 간암의 발생도 억제한다.[11]

발암촉진및 억제물질의 조기검색 방법으로는 신생마우스를 이용하여 diethylnitrosamine을 신생마우스의 복강에 투여하여 암을 유발하고 phenobarbital을 음수로 복용시켜 단기간에 간장이나 폐장 등에서 종양이나 전암병변을 관찰하거나, Ito 등[12,13]이 개발한 간장의 전암지표효소인 glutathione-S-transferase placental form(GST-P)에 의한 간암유발물질 검색법 그리고 간장외의 다른 장기에 발암촉진이나 억제효과를 검색할 수 있는 중기 다장기 발암성시험법

†Author to whom correspondence should be addressed.

(Medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay) 등이 이용되고 있다. 본 실험은 GST-P 양성증식소를 측정하여 EA에 의한 간장의 발암억제 효과를 조기에 검색할 수 있는지 알아보기 위해 수행하였다.

재료및 방법

실험동물

식품의약품안전본부 실험동물자원실에서 분양받은 5주령의 Wistar 수컷 랫드를 실험실에서 1주일간 순화시킨 후 실험에 이용하였다. 실험동물의 사육환경은 온도 23±2°C, 습도 50±10% 그리고 12시간 점등, 12시간 소등을 유지하였으며, 한 개의 사육상자에 3마리의 동물을 수용하였고 사료와 물은 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다.

실험설계(Fig. 1)

동물을 7군으로 나누어 실험시작시 모든 시험군의 동물에 diethylnitrosamine(SIGMA, USA)을 200 mg/kg, 체중의 농도로 생리식염수에 섞어 복강에 1회 투여하였고 2주후부터 phenobarbital(SIGMA, USA)이 음수에 0.05%되게 하여 실험종료시 까지 급여하였고 3주후에는 간장의 2/3(좌우 중심엽과 좌측외엽)를 절제하였다. 2, 3 그리고 4군은 EA가 400 ppm되게 사료를 만들어 급여하였는데 2군은 diethylnitrosamine 투여전 1주일간, 3군은 1주일전부터 종료시까지, 그리고 4군은 phenobarbital 급여시 부터 실험종료시까지 각각 급여하였다. 5, 6 그리고 7군은 EA가 800 ppm되게 사료를 급여하였는데 방법은 2, 3 및 4군과 각각 같게 하였다.

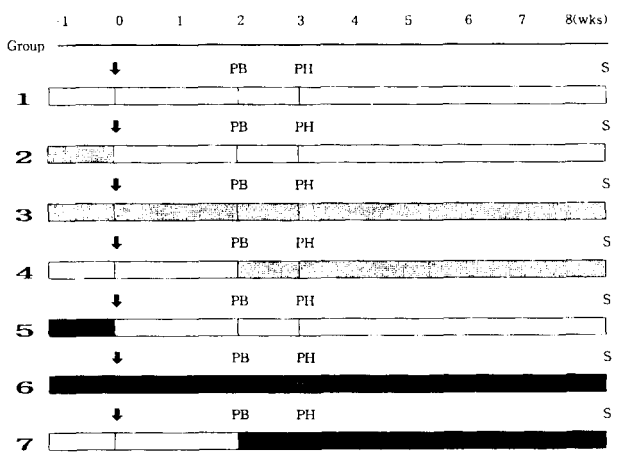

Fig. 1. Experimental design.
▨: EA 400 ppm, ■: EA 800 ppm, ⬇: DEN, 200 mg/kg i.p, PB: phenobarbital 0.05% in drinking water for 6wks, PH: partial hepatectomy, S: sacrifice, i.p.: intraperitoneally.

혈액 및 혈액생화학적 검사

부검시 체중과 간장의 무게를 측정하였고, 채혈한 후, 혈액학적 검사는 자동혈액분석기(H1 system, Technicon, USA)를 이용하여 백혈구수(White Blood Cell, WBC), 적혈구수(Red Blood Cell, RBC), 혈색소농도(Hemoglobin, HGB), 혈소판수(Platelets, PLT)를 측정하였다. 그리고 혈청생화학적 검사는 자동분석기(RA-XT, Technicon, USA)를 이용하여 알부민(Albumin, ALB), 총단백(Total Protein, TP), Alanine Aminotransferase(ALT), Aspartate Aminotransferase(AST), Alkaline Phosphatase(ALP), 그리고 Gamma-Glutamyl Transpeptidase(GGT)를 측정하였다.

GST-P 측정

부검 즉시 간조직을 2~3 mm 두께의 strip으로 만들어 cold acetone에 고정하였고 일반적인 조직처리 과정을 실시한 후 GST-P 양성 증식소를 면역염색하였고, 그리고 자동영상분석기(IBAS, Kontron, Germany)를 이용하여 cm^2 당 GST-P 양성 증식소의 수와 면적을 측정하였다. 또한 Student's t-test를 실시하여 통계학적 유의성을 검정하였다.

결 과

실험종료시 측정한 체중과 간장의 상대중량을 Table 1에 표시하였다. DEN과 PB 그리고 부분간절제술로 발암을 유발시키고 촉진시킨 1군과 비교하여 EA의 투여시기와 방법을 달리한 2, 3, 4, 5, 6 및 7군 사이에 통계적 유의성은 관찰되지 않았다.

혈액생화학적 검사에서는 1군과 비교하여 TP와 ALB은

Table 1. Final body weights and relative liver weights of rats

Group	Treatment	No. of rats	Body weights (gm)	Relative liver
1	D, P, H	10	307.4±22.25	4.5±0.5
2	E(400, 1wk), D, P, H	6	314.4±33.25	4.1±0.3
3	E(400, 9wks), D, P, H	9	316.0±23.68	4.3±0.4
4	D, E(400, 6wks), P, H	7	332.7±27.90	4.4±0.3
5	E(800, 1wks), D, P, H	11	333.6±21.82	4.4±0.5
6	E(800, 9wks), D, P, H	10	302.1±22.97	4.4±0.4
7	D, E(800, 6wks), P, H	10	320.0±37.89	4.6±0.1

each value is the Mean±S.D.
D: diethylnitrosamine, P: phenobarbital, H: hepatectomy, E: ellagic acid

Table 2. Hematological values in the rats treated with chemicals

Group	Treatment	No. of rats	WBC ($10^3/\mu l$)	RBC (10^6 μl)	HGB (g/dL)	PLT ($10^3/\mu l$)
1	D, P, H	10	7.0±3.6	8.3±0.4	15.0±0.8	1144.8±104.9
2	E(400, 1wk), D, P, H	6	7.2±2.9	8.4±0.4	15.1±0.7	1049.8±118.7
3	E(400, 9wks), D, P, H	9	6.0±2.0	8.7±0.4*	15.3±0.7	1068.8±102.3
4	D, E(400, 6wks), P, H	7	6.6±2.4	8.7±0.3*	15.3±0.2	1115.7±164.8
5	E(800, 1wks), D, P, H	5	7.2±1.7	8.7±0.4*	15.7±0.8	1045.0±71.6*
6	E(800, 9wks), D, P, H	11	7.2±2.8	8.7±0.3*	15.6±0.5	1067.7±141.3
7	D, E(800, 6wks), P, H	10	10.3±2.5**	9.1±0.3**	16.0±0.5**	902.3±56.5**

each value is the Mean±S.D.
*: significantly different from group 1 ($p<0.05$)
**: significantly different from group 1 ($p<0.01$)
D: diethylnitrosamine, P: phenobarbital, H: hepatectomy, E: ellagic acid

Table 3. Biochemical values in the rats treated with chemicals

Group	Treatment	No. of rats	ALB (g/dL)	TP (g/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)
1	D, P, H	10	4.5±1.6	8.2±0.3	61.0±12.5	97.7±16.9	90.4±15.1	7.0±3.6
2	E(400, 1wk), D, P, H	6	4.7±0.7	8.5±1.0	51.8±12.7	100.4±15.3	107.1±28.2	4.6±2.5
3	E(400, 9wks), D, P, H	9	4.6±0.3	8.4±0.5	63.3±11.6	119.5±16.1**	103.8±26.6	4.6±3.9
4	D, E(400, 6wks), P, H	7	4.9±0.5*	9.5±1.1**	70.2±9.5	115.8±8.1**	103.6±33.8	5.1±2.7
5	E(800, 1wks), D, P, H	11	4.8±0.4*	9.6±1.2**	68.8±25.0	116.0±24.7*	113.7±22.8**	4.9±4.7
6	E(800, 9wks), D, P, H	10	4.8±0.4*	9.5±0.8*	51.1±20.0	104.2±13.5	93.6±22.6	5.5±4.3
7	D, E(800, 6wks), P, H	10	4.0±0.3**	8.2±0.6*	47.1±15.6*	82.8±7.8**	97.8±26.7	5.0±2.7

each value is the Mean±S.D.
*: significantly different from group 1 ($p<0.05$)
**: significantly different from group 1 ($p<0.01$)
D: diethylnitrosamine, P: phenobarbital, H: hepatectomy, E: ellagic acid

4, 5 및 6군에서, AST는 3, 4 및 5군에서 각각 통계학적으로 유의성있게 증가하였으나 7군에서는 TP, ALB와 AST가 감소되었다(Table 2). 혈액학적 검사에서 RBC가 3, 4, 5, 6 및 7군에서 모두 증가하였고 7군에서는 WBC와 HGB는 증가한 반면 PLT는 감소하였다(Table 3). 그러나 혈액 및 혈액생화학적 검사에서 이런 변화는 정상 실험동물의 생리적 범위내로 EA에 의한 영향은 아닌 것으로 생각된다.

Table 4. The number of GST-P positive foci in the rats

Group	Treatment	No. of rats	No. of foci (No./cm^2)	Area of foci (mm^2/cm^2)
1	D, P, H	10	16.26±5.81	1.30±0.37
2	E(400, 1wk), D, P, H	6	12.16±0.92	0.96±0.18
3	E(400, 9wks), D, P, H	9	7.50±0.68*	0.56±0.11**
4	D, E(400, 6wks), P, H	7	11.75±4.30	1.24±0.17
5	E(800, 1wks), D, P, H	11	9.24±0.87*	0.50±0.07**
6	E(800, 9wks), D, P, H	10	6.00±1.30**	0.59±0.07**
7	D, E(800, 6wks), P, H	10	7.29±0.64*	0.35±0.03**

each value is the Mean±S.D.
*: significantly different from group 1 ($p<0.05$)
**: significantly different from group 1 ($p<0.01$)
D: diethylnitrosamine, P : phenobarbital, H : hepatectomy, E : ellagic acid

GST-P 양성증식소와 면적에 대한 결과를 Table 4에 표시하였다. EA 400 ppm 급여군 중 발암유발전 1주간만 그리고 PB 투여시부터 실험종료시까지 EA를 투여한 2와 4군은 1군과 비교하여 통계적 유의성을 관찰할 수 없었으나 발암유발전부터 실험종료시까지 EA를 급여한 3군과는 GST-P 양성 증식소의 면적과 숫자가 모두 감소되어 나타났다. 또한 EA 800 ppm 급여군은 투여시기와 기간에 관계없이 증식소의 면적과 숫자가 모두 감소하였다.

고 찰

랫드의 간장에서 화학적 발암물질에 의해 유발된 간세포의 병변으로는 주위조직을 압박하지 않는 증식소(foci)와 주위의 실질조직을 압박하는 증식결절(hyperplastic nodule) 그리고 종양(adenoma, carcinoma)으로 분류되는데 증식소와 증식결절이 종양의 전암병변이라고 여러 연구자들은 주장하여 왔다. 전암병변에서 면역조직화학적 방법으로 쉽게

검출할 수 있는 GST-P는 해독작용과 밀접한 관련이 있는 효소인 glutathione S-transferase group의 하나로 여러가지 전암지표 중 가장 특이성이 높은 것으로 알려져있다. 본 실험에서는 여러가지 중기 발암성시험 중 GST-P를 이용하여 시험기간이 8주가 소요되는 Ito 등[12]이 개발하여 널리 사용되고 있는 중기 간암시험법 모델을 이용하였다.

혈액 및 혈액생화학적 결과에서 EA 급여군과 발암유발군간에 몇개의 측정항목에서 통계적 유의성은 관찰되고 있었으나 모두 생리적 범위내의 변화로 인정되어서 발암억제 효과와의 관련성을 설명할 수는 없었다. 그러나 본 실험의 혈액 및 혈액생화학검사는 경시적인 결과가 아니므로 투여물질에 의한 변화로 판단할 수 없었으나 앞으로 경시적으로 측정하여 발암단계에서 이러한 검사결과의 변화와 발암억제효과간의 관련성을 연구해볼만한 가치가 있으리라 생각된다. 또한 GST-P 양성증식소의 면적과 숫자가 EA를 400 ppm의 농도로 발암유발전부터 실험종료시까지 투여한 군에서는 모두 증가되어 발암억제 효과가 있는 것으로 나타났으며, 발암유발전 1주간, 발암유발전부터 실험종료시까지, 그리고 PB 투여시부터 실험 종료시까지 800 ppm의 농도로 투여한 모든군에서 발암억제 효과가 나타나고 있었다. 따라서 EA는 용량의존적이며 투여기간이 길수록 발암억제효과가 높게 나타나고 있었다. 이는 methylbenzylnitrosamine으로 유발한 식도암이 EA에 의해 용량의존적으로 감소했다는 Mandal 등[9]의 보고와 유사하였다.

일반적으로 우리들은 식품, 공기 혹은 음수와 같은 환경속의 발암물질에는 많은 관심을 가졌지만 여기에는 암을 억제하는 물질도 존재한다는 사실[14,15]에는 상대적으로 관심이 적었다. 즉, 식품 중에 존재하는 vitamin C나 tocopherol은 N-nitroso compounds가 발암물질로 전환되는 것을 억제하며, 항산화제인 butylated hydroxyanisole(BHA)은 benzo(a)pyrene을 비발암화물질로 빠르게 대사시켜 발암작용을 억제하는 것으로 각각 알려지고 있다.[16-19] 또한 대장암이나 유방암이 식품 중의 지방섭취와 비례하여 증가되고 섬유질 섭취와는 반비례하여 발생된다는 사실은 식품 중의 특정한 성분이 어느정도 암을 예방할 수 있음을 보여주는 좋은 예이다.[20,21] 현재 식품 중에 존재하는 발암물질뿐만 아니라 발암억제물질을 검색하는 연구가 증가추세에 있기 때문에 간편하게 이런 물질들을 검색하기위한 동물 실험모델에 대한 연구가 중요한 과제가 되고 있다. 지금까지 알려진 발암억제물질은 sodium ascorbate, tocopherol, catechol, BHA, BHT(Butylated hydroxytoluene), ethoxyquin 등의 항산화물질과 그외 disulfiram 관련 화합물, organic isothionates 및 selenium 등이 있으며, 물질에 따라 어느 장기에는 발암억제효과가 있으나 어느 장기에는 촉진효과가 있고 또한 투여시기에 따라 연구결과가 다를 수 있다.[22-23] 본 연구에서도 EA 400 ppm 투여군에서는 발암유발전부터 종료시까지 투여한 랫트에서 발암억제 효과를 관찰할 수 있었으나 800 ppm 투여군에서는 투여시기와 관계없이 발암억제 효과를 보이고 있었다. 따라서 종양의 발생억제 및 촉진효과의 검색은 어느 하나의 단편적인 연구결과에 의존하기보다는 작용기전, 용량, 투여시기와 다양한 장기를 대상으로 종합적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

국문요약

의약품과 식품을 포함한 자연이나 환경속에 포함되어 있는 여러가지 화학물질들은 암 및 돌연변이를 유발할 수 있기 때문에 이런 것들에 의한 유해작용을 줄이려 노력하고 있으나 완전히 없애기는 어려운 현실이다. 따라서 식생활 습관을 개선하거나 식품내에 존재하는 발암억제물질을 이용하여 암의 발생을 줄이기 위한 연구는 암의 치료제 개발과 더불어 관심의 대상이 되고있다. 여러가지 식품속에 자연적으로 함유된 ellagic acid는 항돌연변이와 발암억제 효과가 있는 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 단기간에 ellagic acid의 발암억제 효과를 알아보기위하여 전암지표효소인 GST-P 양성증식소를 측정하였다. Diethylnitrosamine으로 간장에서 암을 유발하였고 phenobarbital과 간부분절제술로 암을 촉진시켰으며, ellagic acid를 400과 800 ppm 투여군으로 구분하고 투여시기를 달리하여 실험하였다. 실험결과 암이 유발되기전부터 실험종료시까지 ellagic acid 400 ppm 투여군의 동물에서만 발암 억제효과를 관찰할 수 있었으나, 800 ppm 투여군에서는 투여시기에 관계없이 종양억제효과가 나타났다. 따라서 diethylnitrosamine으로 유발된 간장의 발암은 ellagic acid에 의해 용량의존적으로 억제됨을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Mass, J.L. and Galletta, G.J.: Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries, a review. *Hortscience,* **26**, 10-14 (1991).
2. Ratnoff, O.D., Gleich, G.J., Shurin, S.B., Kazura, J. and Everson, B.: Inhibition of the activation hageman factor by eosinophils and eosinophilic constituents. *Am. J. Hematol.,* **42**(1), 138-135 (1993).
3. Wattenberg, L.W.: Inhibition of chemical carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.,* **60**(1), 11-18 (1978).
4. Lord, H.L., Snieckus, V.A. and Josephy, P.D.: Re-evaluation of the effect of ellagic acid on dimethylnitrosamine mutagenicity. *Mutagenesis,* **4**(6), 453-455 (1989).
5. Gali, H.U., Perchellet, E.M., Klish, D.S., Johnson, J.M. and Perchellet, J.P.: Antitumor-promoting activities of hydrolyzable tannins in mouse skin. *Carcinogenesis,* **13**(4), 715-718 (1992).
6. Barch, D.H.: Mechanism of the anticarcinogenic action of ellagic acid. FEDERIP Database, National Technical Information Service(NTIS), (1993).
7. Wood, A.W., Huang, R.L., Chang, R.L., Newmark, H.L., Lehr, R.E., Yagi, H., Sayer, J.M., Jerina, D.M. and Conney, A.H.: Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: Exceptional activity of ellagic acid. *Proc. Natl. Acad.. Sci.,* **79**(18), 5513-5517 (1982).
8. Lesca, P.: Protective effects of ellagic acid and other plant phenols on benzo[a]pyrene-induced neoplasia in mice. *Carcinogenesis,* **4**(12), 1651-1653 (1983).
9. Mandal, S.A., Ahuja, N.M., Shivapukar, S.J., Cheng, J.D. and Stoner, G.D.: Inhibition of aflatoxin B_1 mutagenesis in *Salmonella typhymurium* and DNA damage in cultured rat and human tracheobronchial tissues by ellagic acid. *Carcinogenesis,* **8**(11), 1651-1656 (1987).
10. Chang, R.L., Jerina, D.M. and Conney, A.H.: Effect of ellagic acid and hydroxylated flavonoids on the tumorigenicity of benzo(a)pyrene on mouse skin and in the newborn mouse. *Carcinogenesis,* **6**(8), 1127-1132 (1985).
11. Tanaka, T.I., Iwata, H., Niwa, K. and Mori, Y.: Inhibitory effect of ellagic acid on N-2-fluorenylacetamide-induced liver carcinogenesis in male ACI/N rats. *Jpn. J. Cancer Res.,* **79**(12), 1297-1303 (1988).
12. Ito, N., Tsuda, H., Tatematsu, M., Inoue, T., Tagawa, Y., Aoki, T., Uwagawa, S., Kagawa, M., Ogiso, T., Masui, T.: Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats-an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis,* **9**(3), 387-394 (1988).
13. Ito, N., Hasegawa, R., Imida, K., Hirose, M. and Shirai, T.: Medium-term liver and multi-organ carcinogenesis bioassays for carcinogens and chemopreventive agent. *Exp. Toxicol. Pathol.,* **48**(2-3), 113-119 (1996).
14. Giovannucci, E. and Willett, W.C.: Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann. Med.,* **26**(6), 443-452, 1994.
15. Negri, E., La Vecchia, C., Franceschi, S., D'Avanzo, B. and Parazzini, F.: Vegetable and fruit consumption and cancer risk. *Int. J. Cancer,* **48**(3), 350-354, 1991.
16. Mukhtar, H., Das, M., Tito, B.J. and Bickers, D.R.: Protection against 3-methylcholanthrene-induced skin tumorigenesis in BALB/c mice by ellagic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **119**(2), 751-757 (1984).
17. Mukhtar, H., Das, M. and Bickers, D.R.: Inhibition of 3-methylcholanthrene-induced skin tumorigeniciy in BALB/c mice by chronic oral feeding of trace amounts of ellagic acid in drinking water. *Cancer Res.,* **46**(5), 2262-2265 (1986).
18. Stoner, G.D.: Chemoprevention by inhibition of carcinogen-DNA adduct formation. Cell. Mol. Targets Chemoprev., CRC, Boca Raton, Fla., pp. 247-256, 1992.
19. Das, M., Bickers, D.R. and Mukhtar, H.: Effect of ellagic acid on hepatic and pulmonary xenobiotic metabolism in mice: Studies on the mechanism of its anticarcinogenic action. *Carcinogenesis,* **6**(10), 1409-1413 (1985).
20. Hursting, S.D., Thornquist, M. and Henderson, M.M.: Types of dietary fat and the incidence of cancer at five sites. *Prev. Med..,* **19**(3), 242-253 (1990).
21. Lipworth, L.: Epidemiology of breast cancer. *Eur. J. Cancer Prev.,* **4**(1), 7-30 (1995).
22. Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Tatematsu, M. and Asamoto, M.: Modifying effects of antioxidants on chemical carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.,* **14**(3), 315-323 (1986).
23. Tsuda, H., Hasegawa, R., Imaida, K., Massui, T., Moore, M.A. and Ito, N.: Modifying potential of thirty-one chemicals on the short-term development of gamma-glutamyl transpeptidase-positive foci in diethylnitrosamine-initiated rat liver. *Gann,* **75**(10), 876-883 (1984).