

# N-Nitrosamine과 단순포진성 바이러스가 햄스터의 구강암발생에 미치는 영향에 관한 실험적 연구

홍정표\*, 이재현, 민병무, J.P. Sapp, 박노희

## Combined Effect of N-Nitrosamines and Herpes Simplex Virus on Oral Carcinogenesis in Hamsters.

(J.P. Hong\*, J.H. LEE, B.M. Min, J.P. SAPP, and N.H. PARK, UCLA, School of Dentistry, L.A., Calif.)

We have previously reported that simulated snuff dipping in conjunction with type 1 Herpes simplex virus(HSV-1) induced oral malignant changes in hamsters. Present study was designed to investigate the carcinogenic effect of tobacco specific-N-nitrosamines(TSNAs) and type 1 Herpes simplex virus(HSV-1), alone or in combination, in hamsters. Hamsters were divided into 6 groups and the right buccal pouch mucosa were treated as follows: Grp 1, Control (Mock inoculation)[MI]+Topical application [TA] of mineral oil [MO]; Grp 2, TA of 1% N'-nitrososornicotine [NNN]+IM; Grp 3, TA of 1% 4-N-nitrosomethylamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone [NNK]+MI; Grp 4, HSV-1 inoculation [HI]+TA of MO; Grp 5, TA of 1% N-nitrososornicotine [NNN]+HI; Grp 6, TA of 1% NNK+HI, TA of MO or TSNAs was initiated 1 day after the MI or HI and given 3 times per week for 20 consecutive weeks. At the end of the 30th week after the initiation of experiment, the animals were sacrificed and the buccal pouches were fixed for light microscopic examination. No animals developed tumors or malignant histopathologic changes in the mucosa of the buccal pouches. These data indicate that individual TSNAs, alone or in conjunction with HSV-1 infection, do not develop malignant changes in hamster buccal pouches.

## I. 서 론

단순 포진성 바이러스(이하 HSV라 칭함)는 포진계 바이러스의 하나로서, 비흡연 담배(smokless tobacco)에 함유되어 있는 화학성 발암 물질과 서로 상호작용을 하여 암을 유발시킨다고 알려져 있다.(1, 2)

HSV는 인간에게 매우 널리 퍼져있는 바이러스로서, 10세이하의 아이들 90%이상이 HSV의 항체를 가지고 있을 정도이다.(3)

이 HSV는 보통 감각신경절내에 잠재되어 있다. Anderson 등.(1961)(4), Hurd과 Robinson(1977)(5), Hill 등.(1978)(6), Sekizawa 등.

\* 본 논문은 대학교수 국비 해외파견 연구계획의 일환임.

- 목 차 -

- I. 서론
  - II. 실험재료 및 방법
  - III. 실험방법 및 관찰
  - IV. 총괄 및 고안
- 참고문헌

(1980)(7), Kao과 Shillitoe(1980)(8)등이 보고한 바와 같은 여러가지 물리적 촉진인자, 즉 Arthus 반응(4), 탈모(5), 셀로판 테이프를 사용한 박리(6), dry ice의 적용(7), 화학적 발암물질의 도포(8)등의 자극에 의해 감염성 바이러스가 무증상으로 구강내로 떨어져 나와, 구강내에 포진성 병소를 유발시키곤 한다.(9) 따라서 비흡연 담배의 사용자에게 있어서는 HSV와 비흡연 담배의 발암물질이 구강내에서 서로 반응하게 되는 많은 기회를 갖게 된다.

HSV와 담배의 발암물질이 암을 유발시킨다는 것에 대한 임상적, 실험적 예로는 Smith 등(1976)(10)이 담배흡연자에 비해 혈청내 HSV-specific titer가 높게 나타나며 구강암은 HSV-1에 대한 면역반응을 증가시켜준다고 보고한 것과, Park 등 (1987)(1), (1982)(11), (1985)(12)과 Hirsch와 Johansson(1984)(13)이 실험동물에 HSV를 반복 감염시키면서 snuff-dipping의 상황을 부여해주거나, tar 등을 도포해 주어 햄스터 협낭점막에 암이 발생되고, proto-oncogenes 이 활성화 된다는 것을 보고함으로써 증명된바 있다.

더우기 TSNA의 중요한 성분인 NNN, NNK는 강력한 발암제로서, 이를 HSV에 감염된 실험동물에 도포했을 경우에는, 서로 강력하게 상호작용을 하여 발암효과가 상승되리라고 생각되나 이에 대한 결과는 아직 밝혀진 바 없을 뿐만 아니라, 향후 담배와 관련된 발암과정을 이해하는데 많은 도움이 되리라 생각된다.

이에 저자는 햄스터 협낭점막에서 HSV와 비흡연 담배와 관련된 화학적 발암물질의 복합적 발암효과를 관찰하기 위하여, 이를 육안적, 현미경으로 관찰하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험동물

Simonsen Laboratories, Gilroy, California에서 구입한 체중 120 g 내외의 5~6주된 웅성 Golden Syrian 햄스터 151마리를 사용하였으며, HSV 감염에 사용한 바이러스는 ATCC(American Type Culture Collection), Rockville, Maryland에서 배양된 HSV-1(F-strain)을 Vero Cell Monolayer에서 배가시켜 Viral titer를  $2 \times 10^8$  PFU(plaque forming unit).ml로 하여 사용하

였다.

### 2. 화학적 발암물질

Chemsyn Science Laboratories, Lenexa, Kansas에서 구입한 NNN(N'-nitrosomornicotine)과 NNK(4-[N-nitrosomethylamino]-1-but-anone)을 사용하였다.

### 3. 바이러스 감염

햄스터에 ketamine Hcl(100mg of body weight Parke-Daves Warner-Lambert Co. Morris Plains, New Jersey)을 근육주사하여 전신마취시킨후, 협낭에 26gauge 주사침으로 교차선을 그어 절피하고 부드럽게 마사지 한 다음, 500ml의 E-MEM(Eagle's minimum essential medim)이나 HSV-1(107PFU / pouch)를 도포하여 감염하였다.

### 4. 실험군

E-MEM만으로 접종시킨후 2주간, 중광물유(heavy mineral oil)를 협낭에 도포한 실험 1군(대조군)(20마리)과, 중광물유에 1%로 희석한 NNN을도포한 실험 2군(20마리), 중광물유에 1%로 희석한 NNK를 도포한 실험 3군(20마리), 그리고 HSV-1을 접종시킨후 중광물유를 동기간 동안 도포한 실험 4군(32마리), 1% NNN을도포한 실험 5군(27마리), 1% NNK를 도포한 실험 6군(32마리)으로 나누어 실험하였다.

## III. 실험방법 및 관찰

### 1. 육안적 소견

실험동물은 일부가 HSV 감염후 초기에 접종부위가 발적되었고, 종창을 보였으며, 점차 눈 주위의 병소와 운동실조, 하순의 수포성 병소, 탈모증, 안면부 점상출혈과 구순과 협부의 종창 설하부의 궤양, 체중감소등의 증상을 보였으며, 대부분은 시일이 경과된 후 실험 3군은 2~3주후에, 실험 4, 5군은 1~2주후에 회복되었다.

그러나 실험기간중 실험 4군에서는 7마리(21.9%), 실험 5군에서는 2마리(7.4%), 실험 6군에서는 4마리(12.5%)가 위의 증상이 소실되지 않고 심화되어 사망하였다.(도표1)

Experiment	Group	Death	
Group 1	MI+TA / MO	0 / 20	
Group 2	MI+TA / NNN	0 / 20	
Group 3	MI+TA / NNK	0 / 20	
Group 4	HI+TA / MO	7 / 32	21.88 %
Group 5	HI+TA / NNN	2 / 27	7.41 %
Group 6	HI+TA / NNK	4 / 32	12.50 %

MI : Mock Inoculation

HI : HSV - 1 Inoculation

TA : Topical Application

MO : Mineral Oil

햄스터 혈관의 변화는 전 실험기간을 통해 초기에 발적되고 부종되었거나, 실험 6군의 16 주후에서, 납작한 모양의 상피증식물 한개가 관찰되었던 것외에는 모두 정상이었다.(사진1, 2, 3, 4)

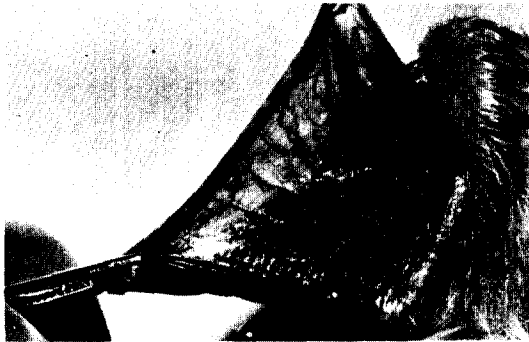


사진1. 실험 1군(대조군) : Mock Inoculation(MI) + Topical Application of Mineral Oil(TA / MO)



사진2. 실험 2군 : MI+TA / NNN

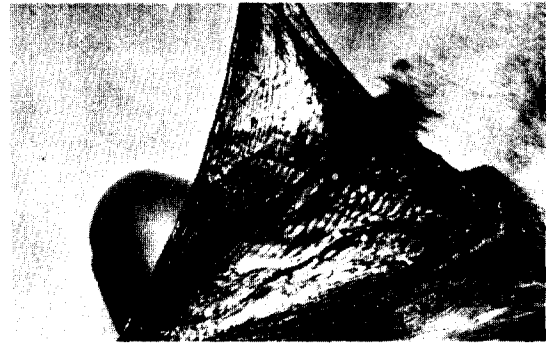


사진3. 실험 6군 : HSV-1 Inoculation(HI)+TA / NNK



사진4. 실험 6군 : HI+TA / NNK  
실험 16주후에 햄스터 혈관에 나타난 납작한 모양의 상피증식물

## 2. 현미경적 소견

실험 2군의 매우 작은 국소부위에서 기저세포의 증식, 상피층내 개세포의 각화, 세포간 이개, 과각화증을 보이는 소견과(사진 6), 실험 3군에서 대체로 두꺼워진 과각화증을 보이는 것(사진 7)이외에는, 전실험동물에서 염증세포의 침윤이나, 상피증식, 상피이형성, 암세포 침윤등의 소견은 관찰되지 않았다.(사진 5, 8, 9, 10)



사진5. 실험 1군 : 햄스터 혈관의 정상 조직소견 (×200, H & E 중염색)



사진6. 실험 2군 : 두꺼운 과각화층 형성(×100 H & E 중염색)



사진9. 실험 5군 : 햄스터 협낭의 거의 정상과 유사한 조직소견(×100, H & E 중염색)



사진7. 실험3군 : 국소 부위에 기저세포의 증식과 상피층내 개개세포의 각화, 세포 간이개, 과각화층(×200, H & E 중염색)



사진10. 실험 6군 : 햄스터 협낭의 거의 정상과 유사한 조직소견(×200, H & E 중염색)



사진8. 실험 4군 : 햄스터 협낭의 거의 정상과 유사한 조직소견(×200, H & E 중염색)

#### IV. 총괄 및 고안

인간에서 가장 흔한 전염성 바이러스이며, 지각 신경이나 교감신경절, 중추신경계에 잠복되어 건강에 매우 중요한 영향을 미치는 HSV는 (14), 신경절에서 다시 복제되기 시작되어, 새로 합성된 바이러스를 축삭형질의 주위로 이동시켜 결국에는 상피표면으로 떨어져 나오게 함으로써 (9), 여러가지 만성질환, 즉 재발성 구순포진, 음부포진, 안위포진, 뇌막포진, 뇌염성 포진과 유아성 포진등의 병소를 유발하게 된다.(3, 15)

Stevens와 Cook(1971)(16)는 잠복기중에, 신경절에 존재하는 HSV가 cell-free ganglionic homogenates 에서 더 이상 분리되지 않았고, 바이러스 항체뿐만 아니라 바이러스 자체도 면역형광염색에서 관찰되지 않았다고 보고한 바 있으나, Park 등 (1982)(11)과 Park등(1985)(12)은 HSV를 실험동물에 접종시킨 후 3~4개월후에 바이러스가 삼차신경절에 잠복기의 형태로 존재

하고 있었다고 보고하였다.

HSV와 암발생에 관해서는 Naib등(1966)(17)과, Nahmias 등(1970)(18), Rawls등 (1969)(19), (1976)(20)이 역학조사를 통해 HSV-2가 자궁경부와 음부의 암을 발생 시킨다고 지적하였고, Frenkel 등(1972)(21)이 자궁경부 암세포에서 바이러스항원을, McDougall등 (1980)(23),(1982)(24)이 자궁경부 암세포에서 바이러스 RNA를 관찰함으로써, HSV-2와 자궁경부암의 상호관련성에 의해 많은 학자들이 증거를 제시한 바 있어, 암발생에 있어서의 HSV의 역할은 매우 큰 관심사가 되고 있다. 또한 Shillito등(1982)(25)과 Smith 등(1976)(26)은 인간의 구강암이 HSV-1에 대한 면역반응의 증가와 관련되는 것 같다고 보고면서, HSV가 어떤 상황에서는 구강내의 악성종양도 유발시킬 수 있다고 언급한 바 있다.

이에 대해 Duff와 Rapp(1971)(27), Li등(1975)(28)은 HSV가 실험관내에서 세포 변이를 시켰다고 보고하였고, Jariwalla 등(1980)(29)은 HSV의 DNA가 세포의 악성변화를 유도한다고 보고함으로써, HSV와 암발생과는 매우 큰 연관성이 있는 것 같다.

HSV가 암을 유발시킬 수 있는 조건에 관해서는 Duff와 Rapp(1971)(27)이 자외선조사를 받은 HSV가 세포의 악성변화를 유도함에 있어, HSV는 비활성화 되어야 하고 세포용해능력이 소실된 후에야 비로서 암을 유발시킬 수 있다고 하였으며, Duff와 Rapp(1971)(27), Li등(1975)(28), Wentz 등(1981)(30)도 발암능력을 가지고있는 바이러스 입자를 만들어 내려면 바이러스를 불활성시켜야 한다고 한 바 있다. 또한 Li 등(1975)(28)도 광력학적인 방법으로 비활성화 시킨 HSV가 세포의 악성변화를 유도한다고 보고한 바 있으며, Wentz 등(1981)(30)은 프로말린과 자외선으로 비활성화시킨 HSV가 백서의 자궁암을 유발시켰다고 보고하여 암발생에 있어서 HSV의 불활성은 중요하다 하겠다.

HSV를 불활성시키는 인자는 위에서 언급한 자외선, 프로말린등 외에도 최근 미국과 스칸디나비아의 청소년들에게서 급증하고 있는 후연초등의 담배성분을 들 수 있는데, 후연초는 미약하기는 하나 그 자체가 암을 발생시킬 수가 있어, HSV와 더불어 암발생에 매우 중요한 인자로 인식되고 있다.

담배에 함유되어 있는 nitrosamines, tobacco specific N-nitrosamines(TSNA), 니코틴 등의 발암성 화학물질은 실험관내에서 HSV의 복제를 억제할수 있는데, Hirshc 등(1984)(31)은 후연초 추출물이 HSV-1의 복제와 감염성을 억제한다고 보고하였고, Hirsch 등(1984)(32)은 실험을 통해 후연초추출물이 Vero cell monolayers에서 HSV 복제 후연초의 추출물은 많은 생물학적 작용을 하는 물질들을 함유하고 있으므로, 어느 물질이 HSV의 복제와 세포용해를 억제하는지 가려내기 는 매우 힘들다, TSNA와 니코틴이 이 작용을 하리라고 추측하였다.

이에 대해 Stich 등(1987)(2)은 무연담배가 실험관내에서 HSV의 복제와, 햄스터 협낭에서 virus 병소를 유발시키는데 미치는 영향에 관한 연구를 통해 후연초 dipping이나 HSV감염중 어느 하나만으로는 암발생을 유도하지 않으나 후연초추출물은 바이러스의 DNA복제를 막아줌으로써 Vero cell monolayer에서 HSV가 증식하는 것을 막아주고, cell-free condition에서 후연추출물과 함께 접종시켰을때, HSV를 비활성시키고 세포용해작용도 소실되게 하여 암발생 확률이 높아진다고 하였다.

후연초에는 4가지의 TSNA(NNN : N'-nitrosomethylnicotine, NNK : 4-(N-nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, NAT : N-nitrosoanatabine, NAB-N'-nitrosoanabasine)와 2가지의 새로운 nitrosamine(NNAI : 4-(N-nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol, iso-NNAI : 4-(N-nitrosomethylamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol)이 함유되어 있어 (33), Peacock 등(1960)(34), Pindborg 등(1980)(35), Winn 등(1981)(36)은 Snuff dipping이나 tobacco 분말을 은협이행부에 물고 있는 사람에게서 구강암과 인두암의 발생율이 높다고 보고하는 등, 후연초 자체만으로도 인체조직에 암을 유발시킬 수 있다는 것은 이미 알려진 사실이다.

이중에서도 2개의 TSNA인 NNN, NNK는 매우 강력한 organ-specific carcinogens으로서 마우스, 흰쥐, 햄스터의 비강, 폐, 식도, 간에 암을 유발시키며(37), 역학적으로나 실험적으로도 인간의 구강이나 호흡기에서 암을 유발시키는 원인이 된다고 증명되었을 뿐만 아니라(38), Brunneemann 등(1987)(33)의 실험에서, NNN

과 NNK 혼압용액을 구강내에 도포한 결과 백서에서 구강암과 폐암이 유발되었으므로 이들은 organ-specific carcinogens로 작용할 뿐만 아니라 국소암의 유도작용도 가지고 있어 매우 중요시해야 할 발암물질인 것이다.

실험적으로, Hetch 등(1986)(39)은 30마리의 흰쥐 구강내에 NNN(135ppm)과 NNK(27.5 ppm) 수용액을 하루 두번씩 2년간 도포하여, 8마리에서는 구강암을, 5마리에서는 폐암을, 1마리에서는 선종을, 4마리에서는 악성 선종을 유발시켰는데, Hoffmann과 Hecht(1985)(37), Belinsky 등(1986)(40)은 이들 TSNA가 세포내에서 대사하여  $\alpha$ -hydroxynitrosamine으로 활성화되고, 이들 대사물질은 매우 불안정하고 반응성이 높은 diazohydroxides로 탈상분화되어 alkylating agent처럼 작용하게 되어 암이 호발되는 폐와 간, 비점막의 DNA에 O<sup>6</sup>-methylguanine과 O<sup>4</sup>-methylthymidine을 형성하여 DNA가 잘못 coding되게 함으로써 종양을 유발시킬 수 있게 한다고 하였다.

NNN, NNK 등의 발암물질과 HSV, 암발생과의 상관관계에 대해서는 Hirsch과 Johansson(1983)(31)이 백서에서, Park 등(1987)(1)은 햄스터의 협낭에서 HSV감염과 Snuff-dipping과 유사한 상태를 반복시켜 구강암을 유발시켰고, Park 등(1982)(11), Park 등(1985)(12)도 Tobacco와 HSV를 함께 적용하여 마우스에서 전암병소를 유발시켰으므로 이를 증명하려 하였는데, Smith 등(1976)(26)과 Shillitoe 등(1982)(25)은 담배 흡연자가 비흡연자에 비해 혈청내 HSV-specific titer가 높게 나타나며 구강암은 HSV-1에 대한 면역반응을 증가시켜준다고 하였고, Park 등(1987)(1)은 담배 응축물인 tar와 후연초추출물이 HSV에 감염된 마우스의 구강점막에 미치는 영향에 관한 연구를 통해 담배 응축물인 tar만을 상순에 도포했을 경우에는 아무런 조직변화를 갖지 않았으나, 바이러스를 집중시키고 집중시켰던 상순에 담배 응축물인 tar와 후연초추출물을 2~3개월간 도포한 경우에는 10~20%에서 HSV가 활동성을 가지게 되었는데, 이는 담배 tar에 의한 만성적인 자극이 상피의 signal을 형성하여, 신경절에서 HSV가 전사되는 것을 차단하는 과정에 작용하는 것으로 생각한다고 하였고, 이때에는 실험 3개월후에 상피이형성과 과각화증, 극세포증, 고유판내의 염증침윤등의

변화가 관찰되었다고 보고하여, 담배와 HSV, 암과의 사이에 어떤 상관관계가 존재한다고 주장하였다.

그러나 본 실험에서는 전 실험을 통해, 육안적 소견에서 나타나는 증상과 사망율이 HSV-1만을 접종시킨 군에서보다, HSV-1을 접종시키고 TSNA(NNN, NNK)를 도포한 군에서 경미하여, NNN, NNK 성분이 HSV-1을 불활성시킨다는 선학들과 유사한 보고결과를 보였으나, 현미경적 소견에서는 햄스터 협낭점막에 아무런 암성변화나 악성변화가 나타나지 않아, 이는 TSNA(NNN, NNK)가 단독으로, 또는 HSV-1과 서로 상호작용을 하더라도 햄스터 협낭에 악성변화를 가져오지는 않았다는 것을 말해 주고있다.

## 참고문헌

1. Park, N.H., Sapp, J.P. and Herbosa, E.G. : Oral cancer induced in hamsters with herpes simplex infection and simulated snuff-dipping. *Oral Surg.*, 63 : 358~359, 1987.
2. Stich, J.E., Li, K.K., Chun, Y.S. and Weiss, R. : Effect of smokless tobacco on the replication of herpes simplex virus in vitro and on production of viral lesions in hamster cheek pouch. *Archs. Oral Biol.*, 32 : 291~296, 1987.
3. National Institutes of Health : Workshop on the treatment and prevention of herpes simplex virus infections. *J. infect. Dis.*, 127 : 127~119, 1973.
4. Anderson, W. A., Margruder B. and Kilbourne E. D. : Induced reactivation of herpes simplex virus in healed rabbit corneal lesions. *Proc. Soc. exp. Med.*, 107 : 628~632, 1961.
5. Hurd, J. and Robinson, T. W. E. : Herpes virus reactivation in a mouse model. *J. Antimicrob. Agents Chemother, Suppl. A* 3 : 99~106. 1977.
6. Hill, T. J., Blyth, W. A. and Harbour, D. A. : Trauma to the skin causes recurrence of herpes simplex in the mouse. *J. gen. Virol.*, 38 : 31~28, 1978.

7. Sekizawa, T., Openshaw, H., Wohlenberg, C. and Notkins, A. L. : Latency of herpes simplex virus in absence of neutralizing antibody : model for reactivation. *Science*, 210 : 1026~1028, 1980.
8. Kao, R. T. and Shillitoe, E. J. : Interaction between herpes simplex virus and DMBA in epithelial tumorigenesis. *J. dent. Res.*, 5 : 4322,(abstr.). 1980.
9. Openshaw, H., Asher, L. V. S., Wohlenberg, C., Sekizawa, T. and Notkins, A. L. : Acute and latent infection of sensory ganglia with herpes simplex : immune control and virus reactivation. *J. gen. Virol.*, 44 : 205~215, 1979.
10. Smith, H. G., Horowitz, N., Silverman, N. A., Henson, D. E. and Chretien, P. B. : Humoral immunity to herpes simplex viral-induced antigens in smokers. 38 : 1155~1162, 1976.
11. Park, N. H., Pavan-Langston, D., Boisjoly, H. M. and Declercq, E. : Chemotherapeutic efficacy of E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine for orofacial infection with herpes simplex virus type 1 in mice. *J. infect. Dis.*, 145 : 909~913, 1982.
12. Park N.-H., Herbosa E. G., Niukian K. and Shklar G. : Combined effect of herpes simplex virus and tobacco on the histopathologic changes in lips of mice. *Oral Surg.*, 59 : 154~158. 1985.
13. Hirsch, J. M., and Johansson, S. L. : Effect of long-term application of sunff of the oral mucosa-an experimental study in the rat. *J. oral Path.*, 12 : 187~198, 1983.
14. Baringer, J. R. and Swoveland, P. : Recovery of herpes simplex virus from human trigeminal ganglions. *New Engl. J. Med.*, 288 : 650 1973.
15. Dawson, C. R. and Togni, B. : Herpes simplex eye infections : clinical manifestations, pathogenesis and management, *Surv.* 21 : 121~135, 1976.
16. Stevens J. G. and Cook M. L. : Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science*, 173 : 843~845, 1971.
17. Naib, Z. M., Nahmias, A. J. and Josey, W. E. : Cytology and histopatholgy of cervical herpes simplex infection. *Cancer*, 19 : 1026~1031, 1966.
18. Nahmias, A. J., Josey, W. E., Naib, Z. M., Luce, D. F. and Guest, B. : Antibodies to herpes virus hominis types 1 and 2 in human. *Am. J. Epidem.*, 91 : 547~552, 1970
19. Rawlas, W. E., Tompkins, W. A. and Melnick, J. L. : The association of herpes virus type 2nd carcinoma of the uterine cervix. *Am. J. Epidem.*, 89 : 557+554, 1969.
20. Rawlas, W. E., Garfield, C. H., Seth, P. and Adam, E. : Serologic and epidemiological considerations of the role of herpes simplex virus type 2 in cervical. *Cancer Res.*, 36 : 829~835, 1976.
21. Frenkel, N., Roizman, B., Cassai, E. and Nahmias, A. : ADNA fragment of herpes simplex 2 and its transcription in human cervical cancer tissue. *Proc. nath Acad. Sci. U.S.A.*, 69 : 3784~3789, 1972.
22. Kaufman, R. H., Dreesman, G. R., Burek, J., Korhonen, M. O., Matson, D. O., Melnick, J. L., Powell, K. L., Purifoy, D.J.M., Courthey, R. J. and Adam, E. : Herpes virus-induced antigens in squamous-cell carcinoma in sity of the vulva. *New Engl. J. Med.* 305 : 488, 1981.
23. McDougall, J. K., Galloway, D. A. and Fenoglio, C. M. : Cervical carcinoma : detection of herpes simplex virus RNA in cells undergoing neoplastic change. *Int. J. Cancer*, 25 : 1~8, 1980.
24. McDougall, J. K., Galloway, D. A. and Fenoglio, C. M. : Cervical carcinoma : detection of herpes simplex virus RNA in cells undergoing neoplastic change. *Int. J. Cancer*, 25 : 1~8, 1980.
25. Shillitoe, E. J., Greenspan, D., Greenspan, J. S., Hansen, L. S. and Silverman, S. : Neutralizing antibody to herpes simplex

- virus type 1 in patients with oral cancer. *Cancer* 49, 2315~2320, 1982.
26. Smith, H. G., Chretien, P. B., Henson, D. E., Silverman, N. A. and Alexander, J. C. : Viralspecific humoral immunity to herpes simplex-induced antigens in patients with squamous carcinoma of the head and neck. *Am. J. Surg.*, 132 : 541-548, 1976.
  27. Duff, R. and Rapp, F. : Properties of hamster fibroblasts transformed in vitro after exposure to ultraviolet-irradiated herpes simplex virus type 2. *J. Virol.*, 8 : 469~477, 1971.
  28. Li J. L., Jerkofsky M.A. and Rapp F. : Demonstration of oncogenic potential of mammalian cells transformed by DNA-containing viruses following photodynamic inactivation. *Int. J. cancer*, 15 : 190~202, 1975.
  29. Jariwalla, R. J., Aurelian, L. and TS'O.P.O.P. : Tumorigenic transformation induced by a specific fragment of DNA from herpes simplex virus tpe 2. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 77 : 2279~2283, 1980.
  30. Wentz, W. B., Reagan, J. W., Heggie, A.D., Fu, Y.S. and Anthony, D.D. : Induction of uterine cancer with inactivated herpes simplex virus, types, 1 and 2. *Cancer*, 48 : 1783-1790, 1981.
  31. Hirsch, J. M., Johansson, S. L. and Vahlne, A. : Effect of snuff and herpes simplex virus- 1 on rat oral mucosa : possible associations with the development of squamous cell carcinoma. *J. oral Path*, 13 : 52~62, 1984.
  32. Hirsch, J. M., Svennerholm, B. and Vahlne, A. : Inhibition of herpes simplex virus replication by toacco extracts. *Cancer Res.*, 44 : 1991~1997, 1984.
  33. Brunnemann, K. D., Rivenson, A., Adams, J. D., Hecht, S. S. and Hoffmann, D. : A study of sunff carcinogenesis. *IARD Sci. Publ.*, 84 : 456~459, 1987.
  34. Peacock, E. E., Greenberg, B. G. and Bra- wley, B. W. : The effect of snuff and tobacco on the production of oral carcinoma : an experimental and epidemiological study. *Ann. Surg.*, 151 : 542~550, 1960.
  35. Pindborg, J. J., Reibel, J., Roed-Petersen, B. and Mehta, F. S., : Tobacco-induced changes in oral leukoplastic epithelium. *Cancer*, 45 : 2230~2336, 1980.
  36. Winn, D. M., Blot, W. J., Shy, C. M., Pickle, L. W., Toledo, A. and Fraumeni, J. F. Jr. : Snuff dipping and oral cancer among women in the southern United States. *New Engl. J. Med.*, 304 : 745~749. 1981.
  37. Hoffmann, D. and Hecht, S. S. : Nicotine- derived N-Nitrosamines and tobacco- related cancer, current status and future direction. *Cancer Res.*, 45 : 935~944, 1985.
  38. Preston-Martin, S. : N-Nitroso compounds as a cause of human cancer. *LARD Sci. Publ.*, 84 : 477~484, 1987.
  39. Hecht, S. S., Rivenson, A., Braley, J., DiB- ello, J., Adams, J. D. and Hoffmann, D. : Introduction of oral tumors in F344 rats by tobacco-specific nitrosamines and snuff. *Cancer Res.*, 46 : 4162~4166, 1986.
  40. Belinsky, S. A., White, C. M., Boucheron, J. A., Richardson, F. C., Swenberg, J. A. and Anderson, M. : Accumulation and persistence of DNA Adducts in respiratory tissue of rats following multiple administ- ration of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1- butanone. *Cancer Res.*, 46 : 1280~1284, 1986.