

랫드에서 Folpet의 발암성에 관한 연구

이영순 · 조재진 · 강경선 · 김배환 · 남기환 · 서광원 · 강성근 · 임윤규* · 허강준**

서울대학교 수의과대학,
제주대학교 수의학과*
충북대학교 수의과대학**
(1994년 5월 13일 접수)

The carcinogenicity study of Folpet in rats

Yong-soon Lee, Jae-jin Cho, Kyung-sun Kang, Bae-hwan Kim, Ki-hoan Nam
Kwang-won Seo, Seong-keun Kang, Yun-kyu Lim*, Kang-jun Heo**

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University,
Department of Veterinary Medicine, Cheju National University,*
College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University**
(Received May 13, 1994)*

Abstract : This study was performed for assessing carcinogenicity of Folpet using medium-term carcinogenicity bioassay.

Sprague-Dawley rats aged six weeks divided into four groups and were initially given an intraperitoneal injection of diethylnitrosamine at 200mg/kg body weight.

Two weeks later, group 1(negative control) was treated with basal diet. A Folpet was given per oral administration to group 2(100 ppm) and group 3(1,000 ppm).

Group 4 was fed on water containing 0.05% phenobarbital sodium as a promotor for six weeks. At three weeks after beginning of the experiment, partial hepatectomy was performed in all rats.

The tumor-promoting effects were examined by the numbers and areas per cm² of induced glutathion S-transferase placetal form(GST-P) positive foci in liver, and silver stained nucleolar organizer regions(AgNORs) which have recently introduced as one of the indicators for the cell proliferative activity.

As the results, Folpet didn't have tumor-promoting effects on GST-P positive foci development and AgNORs during promoting stage after initiation, whereas phenobarbital sodium treatment group showed promoting effect.

It was concluded that Folpet didn't have promoting effect at 500, 1,000 ppm using this medium-term carcinogenicity bioassay model.

Key words : rat, Folpet, carcinogenicity, GST-P, AgNORs

현재 농촌실태를 환경위생학적으로 살펴보면 유해물질을 배출하는 공장이 많이 들어서고 골프장이 많이 건설됨에 따라 농업생산과 인간의 식생활에 절대 필요한 농업용수나 식수원, 토양의 오염에 대한 우려가 높아지고 있다. 이와같이 농업용수나 식수원, 토양을 오염시켜 국민건강에 위해를 줄 수 있는 물질로서는 농약, 곰팡이독, 유해중금속 등을 들 수 있는데, 그것들에 대한 우리나라의 잔류기준, 그리고 그것을 기준으로 한 각종 물질들에 대한 안전성 평가가 절실히 필요하다. 이 중 발암성 평가는 의약품, 호르몬제제¹, 백신제제² 등에서는 국내에서 어느정도 이루어지고 있으나 농약에 대한 발암성 평가는 미미한 편이다.

농약(fungicide)으로 알려진, Folpet(N-(trichloromethylthio) phthalimide)은 포도, 딸기 등 농작물에 널리 사용되고 있는 농약으로 점막표면에 자극독성을 갖는 물질로서, 기존의 랫드를 사용한 동물실험에서 그 LD₅₀가 5,000mg/kg BW로 보고되어 있다. 이에 본 연구는 중기 발암성 스크리닝법 모델을 이용하여 농약인 Folpet의 발암성을 알아보기 위해, 랫드의 간에서 전암병변의 지표효소인 glutathion S-transferase placental form (GST-P)을 이용하여 증명하고, Color Video Image Analyzer를 이용하여 전암병변의 수와 면적을 계산한 후² Folpet 투여군과 대조군을 비교분석하여 Folpet의 전암병변의 수와 면적을 대조군과 비교해 보았다.

한편, 최근들어 조직에서 은과 친화성이 있는 nucleolar organizer regions(NORs)의 수와 세포증식능 사이에 밀접한 상관성이 있다고 보고되어, AgNORs이 세포의 증식능을 알아보는데 매우 유용한 지표로 인정되고 있다^{3,4}. Nucleolar organizer regions(NORs)는 ribosomal RNA를 생산하는 DNA 고리로서 세포핵내에 존재하며 분열중기(metaphase)의 핵소체 부위에서 나타난다고 알려져 있다^{5,6,7}. 그러므로 증식이 활발한 세포에서는 NORs의 수가 늘어나게 되므로 이 NORs의 수와 형태는 일반적으로 세포들의 활성을 나타낸다. 최근들어 증식성 및 종양성 병변에서 핵당 은염색되는 NORs 수와의 상관성 연구가 많이 진전되어, 실제로 NORs를 이용한 염색법이 유의한 결과를 얻어, 간단하고 빠르며 재생성이 있는 유용한 방법으로 추천되고 있다.

따라서, 본 연구는 실험적으로 유도한 랫드의 간 발암성 모델에서 농약(fungicide)인 Folpet의 암발생 촉진효과가 있는지 알아보기 위하여 본 연구를 실시하였다.

시험물질 : Folpet은 농약연구소에서 공급받아 냉장 보관하면서 사용하였다.

실험동물 : 6주령의 Sprague-Dawley 랫드를 서울대학교 실험동물사육장에서 분양받아 1주간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시켰으며, 순화기간 중 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 동물실의 환경조건은 온도 23±3 ℃, 상대습도 60±10%, 환기 회수 10-12 회/hr, 조명시간(오전 7시-오후 7시), 조도 150-200 Lux로 설정된 서울대학교 수의과대학 공중보건학교실 동물실험실에서 실시하였다. 순화기간 및 시험기간중에 랫드용 폴리카보네이트 케이지(polycarbonate, 26×24×18cm, 명진기계제작)에 3마리씩 넣어서 수용하였다.

사료는 랫드용 가루사료(삼양사료 주식회사)를 섭취시켰으며, 음수는 상수도를 자유음용토록 하였다.

실험설계 및 시험물질 투여 : 시험계는 크게 대조군(양성대조군, 음성대조군)과 투여군(저용량, 고용량)으로 나누었다. 고용량 투여군은 실제 살포농도인 1,000ppm을 기준으로 하였으며, 저용량 투여군은 ×0.1 배로 100 ppm 시험개시 2주부터 8주까지 6주간 사료에 섞어 경구로 주 5회 투여하였으며, 고용량 투여군은 Folpet 1,000ppm을 저용량과 같은 방법으로 투여하였다. 음성대조군은 기본사료를 투여하였다.

양성대조군은 약한 발암촉진물질로 알려진 Phenobarbital sodium(PB)을 시험개시 2주부터 8주까지 6주간 음수에 0.05%농도로 섞어 투여하였다.

모든 군은 시험개시일에 발암유발물질인 diethylnitrosamine(DEN)을 복강내로 체중 kg당 200mg을 투여하였고, 간변화의 증폭을 위하여 시험개시 3주에 간의 2/3(좌우중심엽 및 좌측외엽)을 절제하는 수술을 실시하였다.

체중, 사료 및 음수 섭취량 측정 : 체중변화의 추이를 알기위해 시험개시일과 이후 매주 1회 랫드의 체중을 측정하였다. 랫드의 체중 kg당 1일 사료섭취량을 계산하기 위해 체중측정과 병행해서 매주 1회 사료섭취량을 측정하였다. 사료통에 충분한 양의 사료를 채워 무게를 측정한 후 굽여하고, 다음날 같은 시각에 남은 양을 측정하여 사료섭취량을 계산하였다.

장기의 처리 : 시험 종료 하루전에 모든 군의 동물을 절식시키고 체중을 측정한 후 부검하여 간을 적출하고 간의 무게를 측정하여 체중에 대한 간의 무게비를 계산하였다.

광학 현미경 및 면역조직화학적 관찰 : 간 부분절제 후 남은 우측외엽(right lateral lobe) 및 미상엽(caudate

lobe)에서 2-3mm 두께로 간 조직을 채취하여 일부는 10% phosphate buffered formalin에 고정한 후 일반적인 paraffin 절편을 만들어 hematoxylin 및 eosin 염색을 하여 병변을 관찰하였다. 간 조직의 일부는 냉아세톤(cold acetone)에 고정하여 4 μ m의 paraffin 절편을 만들어 전암병변(preneoplastic lesion)의 marker enzyme인 glutathione S-transferase placental form(GST-P) 양성 foci와 nodules에 대한 분포를 확인하기 위해서 avidin-biotin peroxidase complex(Vectastain Elite ABC kit, PK 6101)법을 사용하여 면역조직화학적 염색을 하였다. Rabbit anti-GST-P antibody(1차 항체)는 0.01M phosphate buffered saline으로 10배 의석한 후 bovine serum albumin이 1%가 되도록 첨가하여 냉장보관하면서 사용하였다.

직경 2mm 이상의 GST-P 양성 병소의 수와 면적은 칼라 화상분석기(Color Image Analyzer, Q520, Cambridge)를 이용하여 계산하였다.

Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs)의 염색 및 측정 : 부검과 동시에 채취한 간 조직을 10% 포르말린에 고정한 후, 4 μ m 두께의 파라핀 포매조직 절편을 만들어 xylene으로 탈파라핀 시키고 에틸알콜과 증류수를 거쳐 함수시켰다. 슬라이드에 silver colloid 용액을 도포한 후 빛을 차단하도록 뚜껑을 덮어 실온에서 40분 가량 반응시킨 다음, 흐르는 물과 증류수에 수세하고 탈수과정을 거쳐 glycerin jelly로 봉입하였다.

여기서 silver colloid 용액은 1% 포름산 용액(formic acid solution)에 젤라틴(gelatin)을 2% 되도록 녹인 용액과 50% 질산은 용액(silver nitrate solution)을 1:2비율로 섞어 조제하여 관찰하였다.

관찰자료의 해석 및 평가 : 시험결과는 two-tailed t-test를 이용하여 대조값과 비교 분석하였다. 전 항목에 대하여 공히 5%($p < 0.05$), 1%($p < 0.01$) 및 0.1%($p < 0.001$)의 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

체중변화 및 사료섭취량 : 모든 군에서 간암 유발물질인 DEN를 투여한 후 증가가 거의 보이지 않다가 1주후부터 현저히 체중이 증가하였다. 간 부분절제술 후 모든군에서 현저히 감소하다가 1주후부터 다시 회복되었다(Table 2). 사료섭취량은 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table 1).

Table 1. Feed consumption changes in rats treated with Folpet

Weeks	(unit: gm/rat)			
	Control	Low	High	PB
1	9.20 ±0.30	10.23 ±0.65	10.22 ±0.86	9.68 ±0.32
2	23.23 ±6.27	25.68 ±0.86	42.50 ±5.08	11.61 ±3.75
3	18.31 ±5.37	10.62 ±4.43	11.79 ±6.85	13.55 ±4.82
4	19.21 ±1.94	25.51 ±3.79	16.75 ±12.34	6.04 ±0.94
5	30.20 ±2.60	16.43 ±7.88	26.33 ±3.18	24.45 ±1.08
6	33.15 ±2.62	32.58 ±9.70	33.36 ±5.51	34.75 ±1.35
7	29.62 ±0.38	20.89 ±4.98	29.12 ±2.01	42.83 ±8.00
8	33.17 ±0.33	38.00 ±8.23	33.83 ±5.72	47.50 ±6.83

PB, phenobarbital sodium

Table 2. Body weight changes of rats treated with Folpet

Weeks	(unit: gm/rat)			
	Control	Low	High	PB
0	156.74 ±34.12	157.37 ±30.43	165.03 ±32.80	164.23 ±30.58
1	189.40 ±40.86	170.70 ±35.76	163.05 ±35.40	167.32 ±29.55
2	207.71 ±37.00	231.17 ±47.92	217.16 ±47.19	245.73 ±29.40
3	250.24 ±29.32	223.08 ±39.19	240.36 ±35.83	234.07 ±27.80
4	285.88 ±24.26	267.39 ±49.31	250.01 ±56.38	267.67 ±33.00
5	308.55 ±21.04	297.44 ±60.99	298.96 ±63.05	308.15 ±31.91
6	365.25 ±25.80	335.50 ±66.47	327.22 ±63.60	364.90 ±37.03
7	366.67 ±25.15	336.00 ±58.60	336.06 ±68.11	344.92 ±32.00
8	348.25 ±23.75	334.22 ±65.33	315.39 ±54.76	347.75 ±32.43

PB, phenobarbital sodium

체중에 대한 간의 중량비율 : 체중에 대한 간의 무게비는 대조군에 비해 시험물질 투여군이 약간 증가하였으나 유의성은 나타내지 않았고, PB 투여군과 비교하여 유의하게 높았다($p < 0.05$)(Table 3).

Table 3. Final body weight and liver/body weight ratios treated with Folpet

Group Treatment	No of rats	Final body weight(gm)	Final liver weight(gm)	Liver-body weight ratio(%)
1 DEN→BD	6	348.25 ± 23.75	9.20 ± 1.09	2.65 ± 0.38
2 DEN→Folpet (Low)	7	334.22 ± 25.33	9.78 ± 1.38	2.98 ± 0.38
3 DEN→Folpet (High)	7	315.39 ± 54.76	9.33 ± 1.48	2.98 ± 0.31
4 DEN→PB	6	347.75 ± 32.43	13.92 ± 0.86	4.04 ± 0.26*

Each value was mean ± S D.

DEN, diethylnitrosamine; PB, phenobarbital sodium; BD, basal diets.

*, Significantly different(p<0.05) from control.

육안 및 광학현미경 소견 : 간암 유발물질인 DEN을 투여한 후 saline을 투여한 대조군, 시험물질인 Folpet 저용량, 고용량군 모두 육안으로 아무런 증식소견을 관찰할 수 없었으나, PB를 투여한 군은 대체로 간의 변연부가 둔탁하고 종대되어 있었다. 모든 군에서 확인된 GST-P 양성병변(GST-P positive lesion)의 광학현미경적 소견은, 주위의 정상조직과 구분이 되지만(Fig 1), 한계가 명확하지 않은 원형의 병소들이 간소엽 전체에 드물게 산재해 있는 것이 관찰되었으며(Fig 2) 세포질이 거의 없이 공포를 형성하고 있었고, 핵은 염색상이 흐리고 종창되어 있었다(Fig 3). 또한, PB 투여군의 핵은 은호성 점(AgNOR, Agnucleolar organiazier region)들이 여러개씩 관찰되었으나(Fig 4) 대조군 및 Folpet

투여군에서는 거의 관찰되지 않았다(Fig 5). 은호성 점들은 핵소체가 분산되거나 세포의 ploidy가 증가되어 염색체수가 증가될 때와 전사능이 증가될 때 수가 증가하게 되며, 종양발현과정에서도 그 수가 증가하는 것으로 되어 있다.

Avidin-biotin peroxidase complex 키트(ABC kit)를 이용한 GST-P에 대한 면역조직화학적 염색 결과, DEN 투여 후 Folpet 저용량군, 고용량군 모두 대조군과 비교하여 증가하는 경향은 보였지만, 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 그러나, 양성대조군인 PB투여군은 대조군에 비하여 GST-P 양성병소의 수와 면적에서 유의하게 증가하였다(Table 4)(p<0.01).

Table 4. Number and total area of glutathione s-transferase placental form(GST-P) positive lesions in the liver of rats treated with Folpet

Treatment	No of Rats		No of GST-P foci nodules/cm ²	Total area of GST-P foci and nodules(mm ² /cm ²)
	initial	final		
DEN→Saline	10	6	9.70 ± 2.50	0.32 ± 0.05
DEN→Folpet(Low)	10	7	8.18 ± 4.90	0.38 ± 0.22
DEN→Folpet(High)	10	6	10.18 ± 4.30	0.61 ± 0.39
DEN→PB	10	7	14.31 ± 3.64**	0.69 ± 0.24**

Each value was mean ± S D.

DEN, diethylnitrosamie, PB, phenobarbital sodium.

**, Significantly different(p<0.01) from control.

고 찰

본 시험에서는 포도, 딸기 등 농작물에 널리 사용되고 있는 농약중 Folpet이 실험동물(랫드)에 발암촉진이 있는지 알아보기 위하여, 중기발암성 검색법을 이용하여 실시하였다. 발암촉진여부는 랫드의 간에서 전암병변의 지표효소인 GST-P를 이용하였다. 그리고, 칼라화상분석기로 전암병변의 지표효소인 GST-P 투여군, PB 투여군과 음성대조군을 비교 분석하였다. 양성대조물질인 PB의 투여는 간에서 이물질대사 효소의 유발과 간세포의 비대(hepatocyte hypertrophy), DNA 합성의 증가, smooth endothelial reticulum의 증식⁸등을 유발시킨다고 보고된 바 있다. 또한 단백질합성, 인지질합성, cytochrome P-450 isoenzyme⁹, glutathion conjugation 및 혈류 등이 증가한다고 한다¹⁰. 위 보고들은 본 실험에서 PB투여군이 대조군과 비교해서 체중에 대한 간중량이 유의성 있게 높게 나타나는 이유가 될 수 있다. GST-P는 정상 랫드의 간에서는 거의 검출할 수 없는데, 화학적 발암물질에 의해 유발된 간의 전암병변에서는 특이적으로 그 수치가 증가되며^{11,12}, 화학적 발암물질을 투여해도 전암병변을 형성하기전에는 거의 그 수치가 증가되지 않아 전암병변의 가장 특이적인 지표효소로 평가되고 있다¹³.

또한 본 연구에서는 최근 세포증식능의 지표로 각광 받고 있는 AgNORs를 사용하여 발암 촉진효과를 알아보았다. Nucleolar organizer regions(NORs)는 핵소체(nucleolus)내에 존재하는 여러 염색체(chromosome)에서 분리되어진 커다란 DNA loops와 여기에서 전사되어진 ribosomal RNA gene의 덩어리가 있는 부위를 말한다. NORs는 사람과 침팬지에서는 세포의 분열중기(metaphase)에 13, 14, 15, 21, 22번 염색체의 short arm에 위치하며, 세포분열의 간기(interphase)에 전자현미경적으로 관찰하면 밀집된 섬유부분(dense fibrillar component)과 섬유성중심부(fibrillar center)로 관찰되어진다^{5,6,7}.

세포 유전학자들은 이 NORs에 은을 이용한 빠르고 간편한 1 단계 염색법을 개발하여 더욱 선명하고 특이적인 염색이 가능하도록 발전시켜 병리조직에서도 Ag-NORs의 측정이 가능하게 만들었다. 이 NORs의 염색에서는 DNA가 염색되는 것이 아니고, RNA 전사장소와 관련되어 ribosome 형성에 촉매역할을 해주는 RNA-binding protein 및 small ribonucleoprotein particles가 염색되는 것인데, 이 핵단백의 carboxyl기, disulfide기 및 sulfhydryl기가 은과 친화성이 있는 것을 이용한 반응이다. 이로써 증가된 NORs를 간접적으로

측정 할 수 있게 된다. 실제 NORs의 수는 정상 이배체(diploid) 세포에서 20개이지만, 조직에서 은 염색을 하면 핵소체안에 모여서 나타나므로 1-2개 정도로 관찰된다. 그러나 세포증식이 활발해져서 핵소체가 분산되거나, 세포의 ploidy가 증가되어 염색체의 수가 증가될 때, 또는 전사능(transcriptional activity)이 증가될 때, 은 염색한 NORs(AgNORs) 수가 증가하게 된다^{6,7}. 결국 악성종양의 세포에서는 흩어져 있는 NORs의 수가 정상보다 증가하게 되는 것이다. AgNORs의 수는 은 염색의 시간, 조직절편의 두께, 고정액 종류 및 검색자에 따라서도 달라질수 있기 때문에 실험마다 수치에 있어서 상이한 결과를 얻을 수 있음에 주의해야 된다. 그러나 모든 실험에서 세포증식이 활발한 군의 AgNORs의 수가 정상보다 증가된다는 사실은 일치한다. 그리고 이 Ag-NORs 염색은 bromodeoxyuridine(BrdU) 면역염색¹⁴과 DNA flow cytometry³ 등의 결과와 비교하여 볼 때 좋은 상관성을 나타냄이 증명되어 있다. 결국 이 AgNORs는 세포증식에 있어서 좋은 지표가 될 수 있으리라 사료된다.

Folpet은 Salmonella typhimurium(His), E coli(mouse lymph(L5178Y)), recombination assay 등 여러가지 변이원성 시험에서 양성을 나타내었으나, hepatic homogenate(S9) 존재하에서는 변이원성이 감소되었다¹⁵. Folpet은 CD-1 B6C3F1 마우스에서 duodenal tumor를 유도하는 captan이란 물질과 구조적으로 유사한데, in vitro실험에서 human blood 존재하에서 신속히 degradation 된다. 이때 degradation product는 thiophosgene 인데 이는 captan의 metabolite 이다¹⁵.

실제 만성 발암성 시험에서는 사용동물의 종, 성별, 투여농도, 투여기간에 따라 상반되는 결과를 나타내고 있다. 몇가지 종류의 마우스와 랫드에서 0, 1,000, 5,000, 12,000ppm을 사료를 통하여 112-113 주간 투여한 결과 female의 duodenum에서 adenocarcinoma가 5,000 ppm(p<0.05)과 12,000 ppm(p<0.01) 농도군에서 나타났으며, B6C3F1 마우스에 1,000, 3,800, 7,600ppm 농도로 투여한 결과 모든 군에서 duodenum의 carcinoma가 발견되었다¹⁷. 그러나 B6C3F1마우스에 18 개월간 603 ppm을 투여 하였으나, tumor 발생이 control과 유의성이 없게 나타났다는 보고가 있다¹⁸. 또한 CD, SD 랫드(60/sex/group)에 0, 200, 800, 3,200 ppm 용량 단위로 104 주간 투여하였는데, 52 주 부검시 stomach tumor는 발견되지 않았고, stomach의 hyperkeratosis/acanthosis등을 나타냈을 뿐이었다. Thyroid와 testis의 interstitial cell tumor가 발견되었는데, compound-related tumor인지는 확실치 않다고 보고하였다¹⁵. 본 연구결과 Folpet의 전암병

변의 수와 면적은 음성대조군과 비교하였을 때 저용량군 및 고용량군 모두 증가하였으나 통계적 유의차를 나타내지 않았고, 양성 대조군인 PB투여군만이 GST-P 양성병소의 유의성있는 증가를 보였다($p < 0.05$). AgNORs 역시 PB 투여군에서는 다수 관찰되었으나, 대조군 및 Folpet 투여군에서는 거의 관찰되지 않았다. 본 연구에서 채택한 Folpet 고용량군은 실제 농약 살포시 회석비율인 1,000 ppm을 기준으로 하였는데, 랫드를 이용한 만성 발암성 시험결과 이정도에서 발암을 유발한 경우는 없었으며, 표적장기가 소화관으로 본 연구에서 사용한 간발암 검색용 중기 발암성 모델로는 약간의 전암병변 증가 경향만을 보였을 뿐 통계적 유의성을 나타내지는 않았다.

위의 결과로 미루어 농약으로 사용되는 Folpet은 간 발암촉진효과가 없는 것으로 사료되지만, 변이원성 시험 및 장기 발암성 시험결과 1,000 ppm 이상의 농도에서 다장기 모델을 이용하거나 장기 발암성 시험을 통한 추가 연구가 요구된다.

본 시험에서는 포도, 딸기 등 농작물에 널리 사용되고 있는 농약중 Folpet이 실험동물(랫드)에 발암촉진이 있는지 알아보기 위하여, 중기발암성 검색법을 이용하여 실시하였다. 발암촉진여부는 랫드의 간에서 전암병변의 지표효소인 GST-P를 이용하여 칼라화상분석기로 전암병변의 수와 면적을 계산한 후 Folpet 투여군, PB 투여군과 음성대조군을 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

DEN-PH 중기 발암성 모델을 이용하여 농약인 Folpet에 대한 발암촉진효과에 대해 알아본 결과 GST-P 효소 및 AgNORs 검색에서 최고 1,000ppm 투여군을 대조군과 비교하였을 때 전암병변이 증가하는 경향만 보였을 뿐 통계적 유의성을 나타내지 않았으므로 1,000ppm 농도에서는 간발암촉진효과가 없는 것으로 사료된다. 그러나, Folpet에 대한 변이원성 및 발암성에 대한 논란이 많으므로 장기 발암성 시험을 통해, 1,000 ppm 이상의 농도 투여군에 대한 추가 연구가 요구된다.

Legends for figures

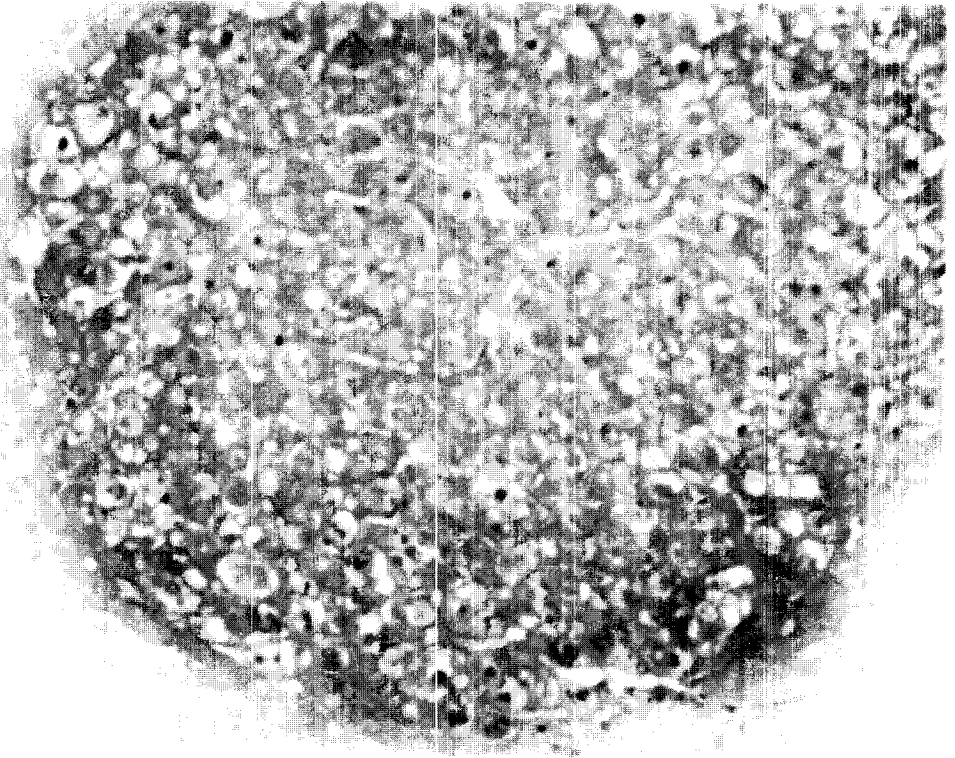
- Fig 1. Preneoplastic lesion of the rat liver induced by diethylnitrosamine(DEN) as an initiator and promoted with phenobarbital sodium, GST-P positive nodules are discerned with surrounding tissues.(GST-P immunohistochemical staining, $\times 200$).
- Fig 2. Preneoplastic lesion of the rat liver induced by diethylnitrosamine(DEN) as an initiator and promoted with phenobarbital sodium, GST-P positive foci are scattered.(GST-P immunohistochemical staining, $\times 100$).
- Fig 3. Hyperplastic nodule of the rat liver promoted with phenobarbital sodium after DEN-initiation.(H & E staining, $\times 100$).
- Fig 4. Hepatocytes of the preneoplastic lesion stained for AgNORs promoted with phenobarbital sodium after DEN-initiation.($\times 200$). Many hepatocytes have an increased numbers of AgNORs.
- Fig 5. Normal control liver stained for AgNORs($\times 200$). Most nuclei possess only one or two AgNORs dots.

참 고 문 헌

1. 임윤규, 강경선, 이영순. 단기발암성 검색법을 이용한 축산식품에 잔류할 수 있는 합성홀몬의 발암촉진효과에 관한연구. 한국식품위생학회지 1991; 5: 179-186.
2. Kang KS, Cho JJ, Kim BH, et al. The study on carcinogenicity of Coptis Rizome and Croton Tigilium L. *Kor J Toxicol* 1992; 8(1): 131-137.

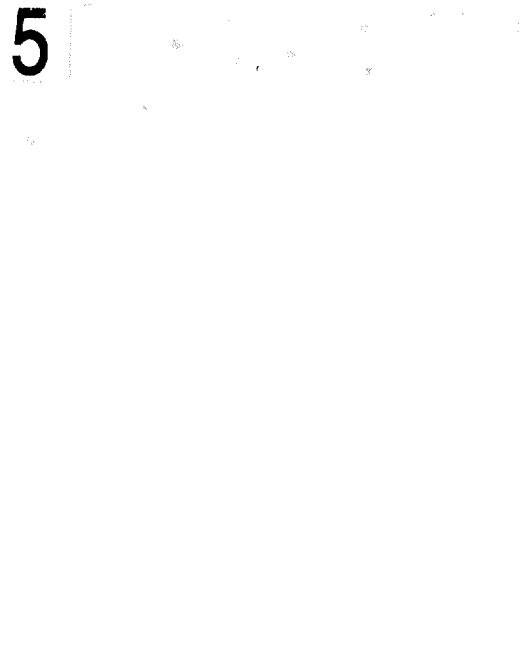
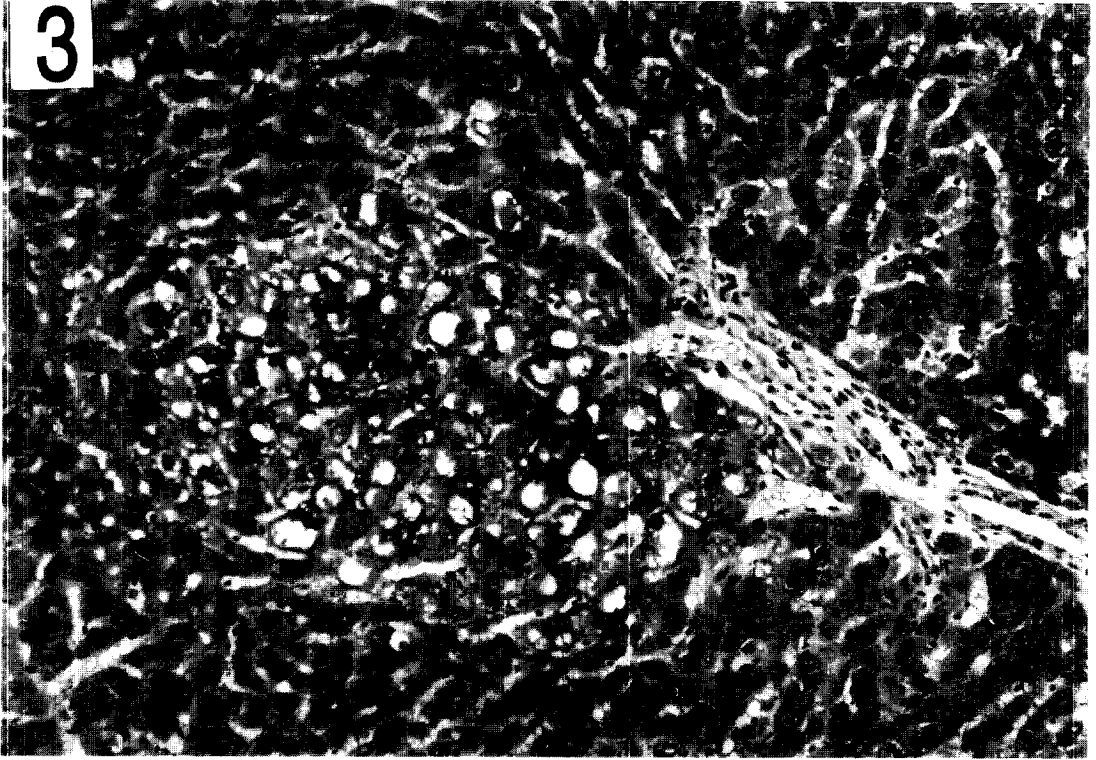
3. Giri DD, Nottingham JF, Lawry J, et al. Silver-binding nucleolar organizer regions(AgNORs) in benign and malignant breast lesions: Correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *J of pathol* 1989; 157: 307-313.
4. Rosa J, Mehta A, Filipe MI. Nucleolar organizer regions in gastric carcinoma and its precursor stages. *Histopathology* 1990; 16: 265-269.
5. Rowlands DC. Nucleolar organizer regions in cervi-

1



2





- cal intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1200-1202.
6. Underwood JCE, Giri DD. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol* 1980; 155: 95-96.
 7. Walker RA. The histopathological evaluation of nucleolar organizer proteins. *Histopathology* 1988; 12: 221-223.
 8. Kitahara A, Satoh K, Nishimura K, et al. Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione s-transferase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1980; 44: 2698-2703.
 9. Sato K. Glutathione s-transferase and hepatocarcinogenesis. *J Natl Can Inst* 1988; 79: 556-572.
 10. Sato K. Tumor markers with special reference to marker enzymes for chemical hepatocarcinogenesis. *Toxicol Forum* 1987; 10: 55-64.
 11. Schwarz M, Peres G, Buchmann A. 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* 1987; 8: 1355-1357.
 12. Sipes IG, gandolfi AJ. Biotransformation of toxicants. In: Casarett and Doull's Toxicology. 3rd ed. Klaassen CD, Amdur MO, Doull J(ed), New York, Macruillan 1986; pp 99-173.
 13. Ogiso T, Tatematsu M, Tamano S, et al. Comparative effects of glutathione s-transferase-positive liver nodules in a long-term assay. *Toxicol Pathol* 1985; 13: 257-265.
 14. Tanaka T, Takeuchi T, Nishikawa A. Nucleolar organizer regions in hepatocarcinogenesis induced by N-2-fluorenylacetamide in rats: Comparison with bromodeoxyuridine immunohistochemistry. *Jpn J Cancer Res* 1989; 80: 1047-1051.
 15. U S EPA. Toxicology branch peer review committee, office of pesticide programs, office of pesticides and toxic substances memorandum on folpet. July 14. 1986.
 16. Chevron Chemical Corporation. Chevron study: Lifetime oncogenicity feeding study of pholton technical(SX-946: folpet) in CD-1(ICR derived) mice. August 24. Social Study No 1331. 1992; (Cited in U S EPA, 1986).
 17. Makhteshim S. Makhteshim study: Folpet oncogenicity study in the mouse. Rubin Y and Nyska A, September. Study No MSK/015/FOL.1985: Cited in US EPA, 1986 Rubin Y and Nyska A, September. Study No MAK/015/FOL. 1985; Cited in US EPA, 1986.
 18. Innes JRM, Valerio MG. Bioassay of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice: A preliminary note. *J Natl Cancer Inst* 1969; 42(6): 1101-1114.