

Vitamin A, BCG, 및 Butylated Hydroxytoluene(BHT)가 Urethane誘發 肺腺腫生成에 미치는 影響에 關한 實驗病理學的 研究*

An Experimental Study on Effects of Vitamin A, BCG and Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Development of Urethane induced Pulmonary Adenoma of Mice

서울大學校 醫科大學 病理學教室 및 附設 癌研究所
金永哲·咸毅根

緒 論

Urethane投與로 誘發된 肺腺腫은 1943年 Nettleship에 의해 처음 報告되었으며, 이 事實은 그 後 많은 研究者들(Orr, 1947; Larsen, 1949; Mirvish, 1968)에 의해 確認되었다. Urethane을 생쥐에 投與한 後 2~3個月이면 多發性 腫瘍이 肺에 發生하며, 組織學的으로 그 大部分은 第Ⅱ型 肺胞細胞에서 由來된 肺腺腫이라고 하고(Shimkin等, 1975), 肺腺腫 外에 肝癌, 淋巴腫, 白血病, 乳房癌 等도 일으킨다고 한다(WHO IARC monographs, 1974).

Vitamin A의 正確한 作用機轉은 分明하지 않으나, Vitamin A가 여러가지 上皮의 正常的 細胞分化를 調節하는데 必須的 物質이며(Sporn等, 1976), vitamin A가 缺乏되면 氣管 및 氣管支의 粘膜炎의 扁平上皮化生이 招來된다(Wong等, 1971; Harris等, 1972).

Vitamin A의 腫瘍抑制에 關하여는, Chu 및 Malmgren(1965)에 의한 hamster의 胃, 腔, 子宮頸部の 癌에 關한 研究와 Saffioti等(1967)에 의한 研究를 爲始해서 많은 報告들이 있으며(Polliack等, 1969; Shamberger, 1971; Bollag, 1972; Cone等, 1973; Rettura等, 1975; Sporn, 1976; Selfter等, 1981; 朴等, 1984), 그 機轉을 免疫學的(Dresser, 1968; Jurin等, 1972; Cohen等, 1973), 內分泌學的(Hill等, 1974; Sani等, 1977), 生理學的(Sporn, 1976; Grubbs等, 1977) 및 生化學的(Hauswirth等, 1976; Craven等, 1977)方法으로 說明하려는 試圖들이 있다.

BCG는 Calmette 및 Guérin에 의해 처음 分離된지

十 집수일자 : 1984년 7월 14일

* 本 研究論文은 1984年度 서울大學 病院臨床研究費(咸毅根)의 一部로 이루어진 것임.

約 40년이 經過한 後 腫瘍抑制에 使用하게 되었다. BCG는 異種抗原(heterologous antigen)에 對한 免疫反應을 促進시키며, 腫瘍成長에 抑制的으로 作用한다는 事實이 밝혀졌다(Bekierkunst等, 1971; Zbar等, 1971; Bast等, 1974). 即, 活性 結核菌에 이미 感染된 動物과(Old等, 1959) 非活性 結核菌 生成物로 前處置된 動物에서(Weiss等, 1961) BCG의 抗癌效果가 처음 記述 報告되었다. BCG를 皮下 또는 靜脈 投與하여 腫瘍의 成長에 抑制的으로 作用한다는 報告가 支配的이나(Bekierkunst等, 1971; Lavrin等, 1973; 文, 1978; Castes等, 1981) 드물게는 腫瘍成長에 오히려 促進的으로 作用한다는 報告도 있으며(Stjernswärd, 1968; Baldwin等, 1973), 또한 腫瘍成長에 抑制的으로도 促進的으로도 作用치 않는다는 報告도 있다(Eilber等, 1971; Finkelstein等, 1972). 그리고 成長된 腫瘍內로 BCG를 局所的으로 注射함으로써 腫瘍의 成長과 轉移가 抑制되었다는 報告도 있다(Zbar等, 1971, 1972; Hanna等, 1972, 1975). Meltzer等(1974)은 3-methylcholanthrene으로 誘發된 肉腫에서, Kurata等(1977)은 Lewis肺腫瘍에서 vitamin A 單獨 投與時는 腫瘍의 發生率의 減少 또는 成長抑制效果가 없었으나, vitamin A와 BCG를 同時에 投與하면, BCG의 腫瘍抑制效果가 vitamin A의 投與로 말미암아 增強되었다고 報告한 바 있다.

Butylated hydroxytoluene(以下 BHT로 略記)는 酸化防止劑이며, 생쥐의 腹腔內 投與 3~5日 後에 第Ⅱ型 肺胞細胞의 增殖이 일어나고, 肺胞細胞內 thymidine의 DNA含入量이 增加함에 따라 肺의 DNA量의 增加를 보며, 그 結果 肺重量의 增加를 일으킨다고 한다. 또한 생쥐의 urethane 誘發 肺腺腫 實驗에서 BHT를 反復 投與함으로써 腫瘍發生이 促進되었다는 報告도 있다(Witschi等, 1974, 1977). Vitamin A와 BCG의 腫瘍

抑制效果에 關해서 學者에 따라 異見이 있으며, BCG의 境遇 urethane誘發 肺腺腫에서 urethane의 發癌性變動에 關한 實驗은 있으나(Bekierkunst等, 1971; 文, 1978), 腫瘍發生 後 成長에 미치는 影響에 關한 分明한 研究 報告는 찾아볼 수 없었으며, vitamin A의 境遇 肺腫瘍抑制 實驗의 거의 大部分이 扁平上皮腫에 關한 研究이다. 또한 생쥐의 urethane誘發 肺腺腫에서 腫瘍誘發前부터 vitamin A와 BCG를 各各 또는 同時에 投與하여 腫瘍抑制效果를 系統的으로 觀察한 報告는 찾아보기 어려웠다. 따라서 本 研究에서는 이 點에 主眼하여 肺腺腫을 urethane으로 誘發시키기 前부터 vitamin A와 BCG를 投與하여 腫瘍 發生 및 成長에 對한 抑制效果를 檢討하고, urethane 投與 後부터 생쥐 肺의 病理組織學的 變化 및 BHT의 腫瘍促進效果를 經時的으로 比較 檢討하여, urethane 誘發 肺腺腫의 發生 및 成長 實態를 把握하는데 그 目的을 두었다.

實驗材料 및 方法

1) 實驗動物 및 實驗群

本 實驗에서 使用된 動物은 生後 3週된 體重 約 10gm의 ICR 생쥐 600마리이며, 對照實驗群(290마리), 腫瘍抑制劑 投與實驗群(240마리) 및 腫瘍促進劑 投與 實驗群(70마리)으로 크게 나누고, 第 1表와 같이 다시 總 10群으로 나누어 實驗하였다. A(NaCl), B(NaCl+vitamin A), C(NaCl+BCG), D(urethane), H(NaCl+corn oil), I(NaCl+BHT) 實驗群은 對照實驗群이고, E(urethane+vitamin A), F(urethane+BCG), G(urethane+vitamin A+BCG)實驗群은 腫瘍抑制劑 投與 實驗群이며, J(urethane+BHT)實驗群은 腫瘍促進劑 投與 實驗群이다. 中途에 죽은 생쥐를 除外하고 計劃된 時期에 屠殺하여, 肺炎所見이 없는 適切한 肺組織 標本을 얻은 例는 總 389마리로서 各 實驗群의 觀察例數는 第 1表와 같다. 每週 1回씩 各 實驗群의 1日 飼料 攝取量을 測定하였으며, 各 實驗群에서 無作爲로 3~5마리씩 體重을 測定하여 平均體重을 求하여 藥劑 投與量 算出에 使用하였다.

2) 藥劑 및 投與方法

BCG는 國立保健院에서 濃度 1.3×10^6 CFU*/ml인 製品을 供給받아, 0.1ml 即 1.3×10^7 CFU를 C, F, G 實驗群의 生後 3週된 생쥐 右側 背部 皮下에 實驗 첫 날 1回 注射하였다.

Vitamin A는 西獨 MUCOS Emulsions GmbH社에서 製造한 retinol palmitate로서, 濃度 300,000unit/gm인

*: colony forming unit

Table 1. Experimental groups

Group	Treatment	Numbers of animal examined
A	NaCl	34
B	NaCl+ Vit. A	30
C	NaCl+BCG	29
D	Urethane	43
E	Urethane+ Vit. A	53
F	Urethane+BCG	49
G	Urethane+ Vit. A+BCG	57
H	NaCl+Corn oil	30
I	NaCl+BHT	24
J	Urethane+BHT	40
Total		389

乳液劑이며, 4°C 乾冷暗所에 保管하였다가 每 投與時마다 옥수수 기름(斗山穀產株式會社 製品)에 녹여 使用하였다. Vitamin A는 B, E, G實驗群에 飼料 攝取量 1kg 當 150,000 unit에 準하이 實驗 첫 날부터 週 2회씩 屠殺時까지 胃腸內 經管 投與하였다.

Urethane(美國 Fisher Scientific Company 製品)은 10% 生理食鹽水 溶液으로 稀釋하여, D, E, F, G, J實驗群에 體重 gm當 1mg을 BCG와 vitamin A를 投與한 後 第 6日부터 週 2회씩 4週間(總 8回)腹腔內 注射하였으며, 生理食鹽水는 A, B, C, H, I 對照實驗群에 urethane 投與와 같은 同量을 腹腔內 注射하였다.

BHT(日本 武田製藥株式會社 製品)는 옥수수 기름에 녹여 I, J實驗群에 體重 gm當 0.25mg을 urethane 投與를 始作한 後 第 7日부터 屠殺時까지 週 1回씩 腹腔內 注射하였으며, 옥수수기름(斗山穀產株式會社 製品)은 對照實驗群(H)에 BHT 投與와 같은 時期에 同量을 腹腔內 注射하였다.

3) 實驗期間

Urethane投與後 第 2週, 4週, 8週, 12週 및 16週에 各各 中間屠殺을 하였으며, 第 24週에 最終屠殺을 施行하였다. Urethane投與 後 第 2週, 4週 및 8週에서는 肺腺腫의 發生與否를 觀察하기 爲하여 各群 5마리 以內를 試驗屠殺하였으며, 肉眼的으로 分明히 觀察되는 크기(直徑 0.5mm 以上)의 肺腺腫이 나타나기 始作한 第 12週부터는 肺腺腫의 成長狀態를 比較 觀察하기 爲하여 나머지 動物을 經時的으로 세면으로 나누어 屠殺하였다.

4) 組織學的 檢査方法

생쥐를 屠殺하기 直前에 體重을 計測하고, 屠殺하여

Table 2. Mean body weights of mice

Weeks	2		4		8		12		16		24	
Group	No. mice	BW** (gm)	No. mice	BW (gm)	No. mice	BW (gm)	No. mice	BW (gm)	No. mice	BW (gm)	No. mice	BW (gm)
A (NaCl)	6	12.2	7	14.5	7	22.9	9	29.7	10	33.0	13	36.3
B (NaCl+Vit. A)	6	11.0	7	13.5	7	22.3	8	27.5	6	31.3	15	30.6*
C (NaCl+BCG)	6	12.2	7	16.3	7	21.9	8	28.6	7	30.6	12	32.8
D (Urethane)	7	11.3	8	14.0	9	22.0	11	26.3	15	30.1	10	32.3
E (Urethane+Vit. A)	7	10.7	9	15.2	8	23.4	16	30.8	19	31.8	12	31.5*
F (Urethane+BCG)	7	11.9	7	14.4	9	22.9	14	28.8	16	33.1	13	33.3
G (Urethane+Vit. A +BCG)	7	11.7	8	14.1	9	23.4	14	30.7	20	30.4	14	31.2*
H (NaCl+Corn oil)	5	11.8	6	16.8	6	25.3	9	32.4	10	36.0	14	33.5
I (NaCl+BHT)	6	11.8	7	18.4	7	25.6	6	28.8	13	33.7	13	32.3
J (Urethane+BHT)	6	11.3	7	15.3	8	23.5	11	27.8	13	28.6	13	33.5

* Significantly decreased compared with group A ($p < 0.01$)

** BW: Mean body weights

Table 3. Mean lung weights of mice

Weeks	2		4		8		12		16		24	
Group	No. mice	LW** (gm)	No. mice	LW (gm)	No. mice	LW (gm)	No. mice	LW (gm)	No. mice	LW (gm)	No. mice	LW (gm)
A (NaCl)	2	0.20	3	0.32	3	0.28	4	0.39	8	0.41	14	0.39
B (NaCl+Vit. A)	2	0.14	3	0.35	2	0.31	4	0.36	4	0.43	15	0.37
C (NaCl+BCG)	3	0.24	3	0.27	3	0.29	3	0.34	5	0.42	11	0.38
D (Urethane)	3	0.22	5	0.32	5	0.29	6	0.32	14	0.45	10	0.42
E (Urethane+Vit. A)	3	0.26	5	0.24	4	0.28	12	0.42	17	0.42	12	0.44*
F (Urethane+BCG)	3	0.24	5	0.33	5	0.37	9	0.37	14	0.47	13	0.43
G (Urethane+Vit. A +BCG)	3	0.16	3	0.34	5	0.31	13	0.48	19	0.48	14	0.47*
H (NaCl+Corn oil)	1	0.20	1	0.18	2	0.34	4	0.47	8	0.45	14	0.42
I (NaCl+BHT)	2	0.23	2	0.34	3	0.43	3	0.38	2	0.46	12	0.45
J (Urethane+BHT)	2	0.20	3	0.30	4	0.33	7	0.44	11	0.47	13	0.49*

* Significantly increased compared with group A ($p < 0.05$)

** LW: Mean lung weights

肺重量을測定한 다음 10% 中性 포르말린 溶液으로 氣管内로 注入固定한 後, 右側 肺는 4個의 葉을 左側 肺는 1個의 葉을 肺門을 中心으로 縱斷하여 파라핀 包埋한 다음 5 μ 으로 薄切하여 hematoxylin-eosin 重複 染色을 施行하였다. H-E 染色된 組織標本을 光學顯微鏡으로 檢鏡하여 兩側 肺剖面에서의 肺腺腫의 數와 크기를 測定하였으며, 肺胞細胞가 過增殖되어 結節을 形成하여 肉眼的으로 分明히 觀察되면 大體로 直徑이 0.5mm가

되므로 이 크기를 基準으로 하여 腫瘍 크기가 直徑 0.5 mm 未滿인 것과 0.5mm 以上인 것으로 나누어 觀察 分析하였다.

實驗成績

1) 생쥐의 體重 計測

各 實驗群에서의 urethane 投與 後 時期別 體重 增加

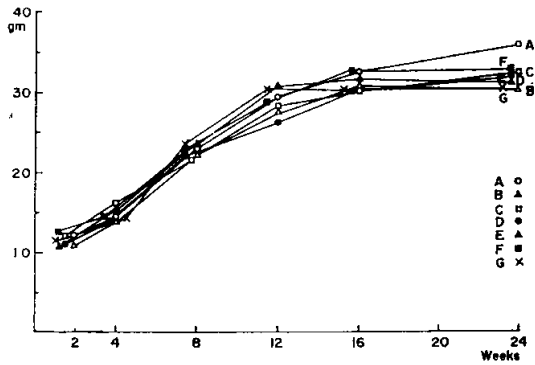


Fig. 1. Mean body weights in each group(A, B, C, D, E, F, G).

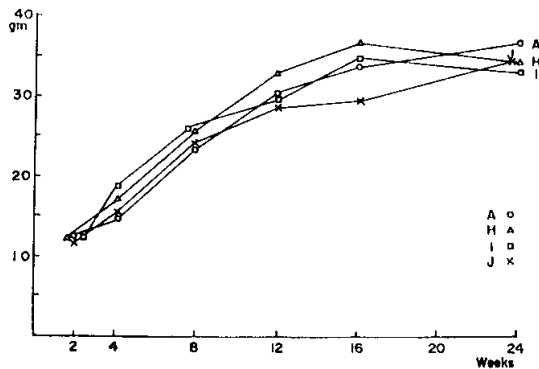


Fig. 2. Mean body weights in each group(A, H, I, J).

는 第16週까지는 大體로 비슷한 樣相을 보여 相互 有意한 差異가 없었으나, 第24週에서는 vitamin A 投與 實驗群(B, E, G)이 對照群(A)에 비해 有意한 體重 減少를 보였다($p < 0.01$) (Table 2) (Fig. 1, 2).

2) 肺重量 計測

各 實驗群에서 時期別 肺重量 增加는 第16週까지는 各 群間에 意味있는 差異를 보이지 않았으나, 第24週

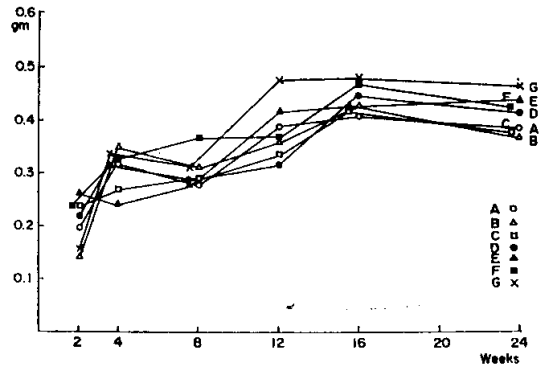


Fig. 3. Mean lung weights in each group (A, B, C, D, E, F, G).

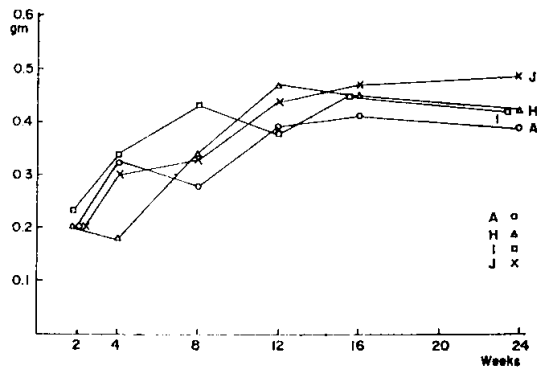


Fig. 4. Mean lung weights in each group(A, H, I, J).

에서는 urethane 投與 實驗群(E, G, J)이 對照群(A)에 비해 有意한 肺重量 增加를 보였다($p < 0.05$) (Table 3) (Fig. 3, 4).

2) 病理學的 觀察

對照實驗群

A. NaCl 投與 對照群

NaCl을 投與한 對照群에서는 第16週까지는 腫瘍發

Table 4. Effects of NaCl, vitamin A, BCG, corn oil and BHT on numbers and sizes of pulmonary adenomas in control groups

Group	No. mice	No. tumor bearing mice	(Weeks)	No. of tumor	
				<0.5mm(*)	≥0.5mm(*)
A (NaCl)	34	1/14**	(24W)	1 (0.1)	
B (NaCl+Vit. A)	30	1/3**	(4W)	1 (0.3)	
C (NaCl+BCG)	29	0		0	
H (NaCl+Corn oil)	30	1/2**	(8W)	1 (0.5)	
I (NaCl+BHT)	24	3/12**	(24W)	5 (0.4)	

* Average numbers of tumors per mouse

** Numbers of total mice examined at that week

Table 5. Effect of urethane on numbers and sizes of pulmonary adenomas in group D(Urethane)

Weeks after urethane Tx.	No. mice	No. tumor bearing mice	(%)	No. of tumors			
				<0.5mm	(*)	≥0.5mm	(*)
2	3	1	(33.3)	1	(0.3)		
4	5	0		0			
8	5	3	(60.0)	4	(0.8)		
12	6	5	(83.3)	19	(3.2)	9	(1.5)
16	14	12	(85.7)	59	(4.2)	45	(3.2)
24	10	10	(100)	32	(3.2)	49	(4.9)
Total	43						

% Tumor incidence

* Average numbers of tumors per mouse

生을 觀察할 수 없었고, 第24週에서 直徑 0.5mm 未滿의 작은 肺腺腫이 發生하였으나, 0.5mm 以上 크기의 肺腺腫은 觀察되지 않았다(Table 4)(寫眞附圖 Fig. 1).

B. NaCl과 vitamin A 投與 對照群

NaCl과 vitamin A를 同時に 投與한 對照群에서는

urethane 投與 後 第4週에서 局所的인 過增殖이 觀察되었으나, 肺腺腫은 第24週까지도 觀察되지 않았다 (Table 4).

C. NaCl과 BCG 投與 對照群

NaCl과 BCG를 同時に 投與한 對照群에서는 urethane 投與 後 第2週부터 24週까지 全 期間에서 肺細胞의 過增殖性 結節 及至 肺腺腫이 觀察되지 않았다.

D. Urethane 投與 對照群

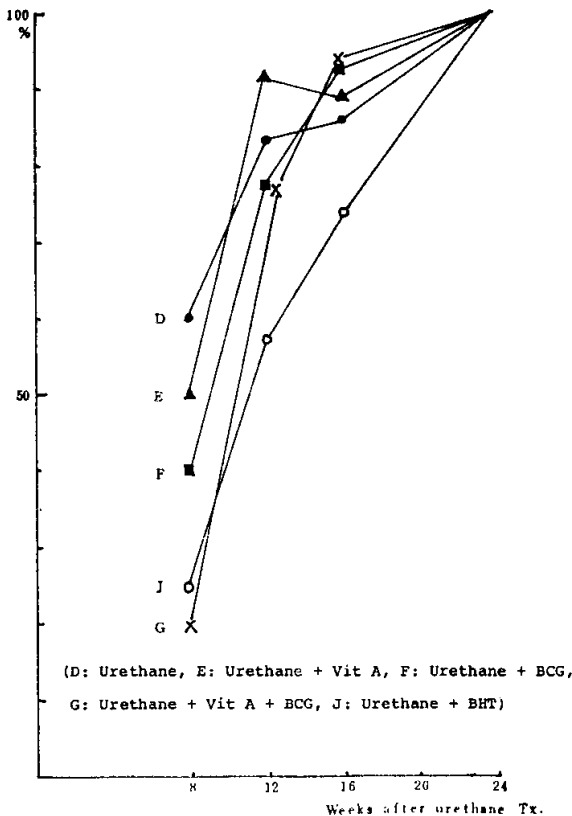


Fig. 5. Incidence of pulmonary adenomas in each group.

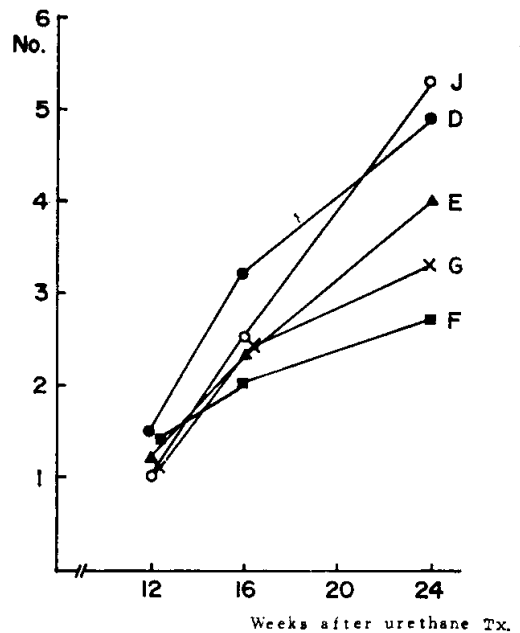


Fig. 6. Average numbers of more than 0.5mm sized pulmonary adenomas per mouse in each group. (D: Urethane, E: Urethane+Vit. A, F: Urethane+BCG, G: Urethane+Vit. A+BCG, J: Urethane+BHT)

Urethane을 投與하여 肺腺腫을 誘發시킨 對照群에서는 urethane 投與 後 第2週에서 3마리중 1마리에서 局所의 過增殖性을 發見할 수 있었으나, 第4週에서는 發見되지 않았다. 第8週에서는 5마리중 3마리(60%)에서 直徑 0.5mm 未滿의 肺腺腫이 觀察되었고, 第12週에서는 83.3%의 腫瘍發生率을 보였고, 0.5mm 以上の 肺腺腫도 觀察되었다. 時間이 經過함에 따라 腫瘍의 數와 크기가 增加하여 第24週에서는 100%의 腫瘍發生率을 보였다. 直徑 0.5mm 以上 크기의 肺腺腫의 마리當 平均個數는 第12週에서 1.5個, 第16週에서 3.2個, 第24週에서 4.9個였다(Table 5) (Fig. 5, 6) (寫眞附圖 Fig. 2, 7, 8).

H. NaCl과 corn oil投與 對照群

NaCl과 corn oil을 同時に 投與한 對照群에서는, 第8週에서 2마리중 1마리에서 直徑 0.5mm 未滿의 過增殖性 結節이 觀察되었으나, 第24週까지 0.5mm 以上 크기의 肺腺腫은 觀察되지 않았다(Table 4).

I. NaCl과 BHT 投與 對照群

NaCl과 BHT를 同時に 投與한 對照群에서는, 第24週에서 12마리중 3마리에서 直徑 0.5mm 未滿의 肺腺腫이 觀察되었으나, 0.5mm 以上 크기의 肺腺腫은 觀察되지 않았다(Table 4) (寫眞 附圖 Fig. 5).

腫瘍抑制劑 投與 實驗群

E. Urethane과 vitamin A 投與 實驗群

Urethane과 vitamin A를 同時に 投與한 實驗群에서는 urethane 投與 後 第4週에서 直徑 0.5mm 未滿의 過增殖性 結節이 5마리중 1마리에서 觀察되었고, 第8週에서는 4마리중 2마리에서 觀察되었다. 第12週에서 91.7%의 腫瘍發生率을 보였으며, 第24週에서의 腫瘍發生率은 100%이었다. 直徑 0.5mm 以上 크기의 肺

腺腫의 마리當 平均個數는 第12週에서 1.2個, 第16週에서 2.3個 第24週에서는 4.0個이었으며, urethane 投與 對照群(D)과 比較하면 第16週에서 腫瘍 成長이 抑制된 傾向을 보였다($0.05 < p < 0.1$) (Table 6) (Fig. 5, 6) (寫眞附圖 Fig. 9).

F. Urethane과 BCG 投與 實驗群

Urethane과 BCG를 同時に 投與한 實驗群에서는 urethane投與 後 第2週에서 0.5mm 未滿의 過增殖性 結節이 3마리중 1마리에서 觀察되었으나, 第4週에서는 觀察되지 않았으며, 第8週에서는 5마리중 2마리에서 0.5mm未滿의 肺腺腫이 觀察되었다. 第12週에서 77.8%의 腫瘍 發生率을 보였으며, 時間이 經過함에 따라 腫瘍의 數와 크기가 增加하여, 第24週에서 모든 動物에서 肺腺腫이 發生하였다. 直徑 0.5mm 以上の 肺腺腫의 마리當 平均個數는 第12週에서 1.4個, 第16週에서 2.0個, 第24週에서 2.7個로 나타나, urethane 投與 對照群(D)과 比較하면 第16週와 第24週에서 腫瘍 成長이 統計學的으로 有意하게 抑制되었다($p < 0.05$, $p < 0.01$) (Table 7) (Fig. 5, 6) (寫眞附圖 Fig. 3, 10).

G. Urethane, vitamin A 및 BCG 投與 實驗群

Urethane, vitamin A 및 BCG를 同時に 投與한 實驗群에서는, urethane 投與 後 第2週와 第4週에서 過增殖性 結節이 觀察되지 않았으나, 第8週에서 直徑 0.5mm未滿 肺腺腫이 5마리중 1마리에서 觀察되었다. 第12週에서 0.5mm 以上の 肺腺腫이 나타났으며, 77%의 腫瘍 發生率을 보였고, 第24週에서는 모든 動物에서 肺腺腫이 發生하였다. 直徑 0.5mm 以上 肺腺腫의 마리當 平均個數는 第12週에서 1.1個, 第16週에서 2.4個 第24週에서 3.3個를 보여, urethane 投與 對照群(D)에 比해 第24週에서 統計學的으로 有意한 腫瘍成長 抑制를

Table 6. Effect of vitamin A on numbers and sizes of pulmonary adenomas in group E(Urethane+Vit. A)

Weeks after urethane Tx.	No. mice	No. tumor bearing mice	%	No. of tumors			
				<0.5mm	(*)	≥0.5mm	(*)
2	3	0	—	0	—	—	—
4	5	1	(20)	2	(0.4)	—	—
8	4	2	(50)	2	(0.5)	—	—
12	12	11	(91.7)	57	(4.8)	14	(1.2)
16	17	15	(88.2)	92	(5.4)	39	(2.3)**
24	12	12	(100)	42	(3.5)	48	(4.0)

Total 53

% Tumor incidence

* Average numbers of tumors per mouse

** Decreased tendency compared with group D($0.05 < p < 0.1$)

Table 7. Effect of BCG on numbers and sizes of pulmonary adenomas in group F(Urethane+BCG)

Weeks after urethane Tx.	No. mice	No. tumor bearing mice	(%)	No. of tumors			
				<0.5mm	(*)	≥0.5mm	(*)
2	3	1	(33.3)	2	(0.7)	—	—
4	5	0	—	—	—	—	—
8	5	2	(40.0)	2	(0.4)	—	—
12	9	7	(77.8)	44	(4.9)	13	(1.4)
16	14	13	(92.9)	75	(5.4)	28	(2.0)**
24	13	13	(100)	56	(4.3)	35	(2.7)**
Total	49						

% Tumor incidence

* Average numbers of tumors per mouse

** Significantly decreased compared with group D(p<0.05 at the 16th week, p<0.01 at the 24th week)

Table 8. Effects of vitamin A and BCG on numbers and sizes of pulmonary adenomas in group G(Urethane+Vit. A+BCG)

Weeks after urethane Tx.	No. mice	No. tumor bearing mice	(%)	No. of tumors			
				<0.5mm	(*)	≥0.5mm	(*)
2	3	—	—	—	—	—	—
4	3	—	—	—	—	—	—
8	5	1	(20)	3	(0.6)	—	—
12	13	10	(77)	31	(2.4)	14	(1.1)
16	19	18	(94.7)	77	(4.1)	45	(2.4)
24	14	14	(100)	49	(3.5)	46	(3.3)**
Total	57						

% Tumor incidence

* Average numbers of tumors per mouse

** Significantly decreased compared with group D(p<0.05)

Table 9. Effect of BHT on numbers and sizes of pulmonary adenomas in group J(Urethane+BHT)

Weeks after urethane Tx.	No. mice	No. tumor bearing mice	(%)	No. of tumors			
				<0.5mm	(*)	≥0.5mm	(*)
2	2	—	—	—	—	—	—
4	3	—	—	—	—	—	—
8	4	1	(25)	4	(1.0)	—	—
12	7	4	(57.1)	7	(1.0)	7	(1.0)
16	11	7	(63.6)	56	(5.1)	28	(2.5)
24	13	13	(100)	65	(5.0)	69	(5.3)
Total	40						

% Tumor incidence

* Average numbers of tumors per mouse

보였다($p < 0.05$) (Table 8) (Fig. 5, 6) (寫眞附圖 Fig. 4, 11).

腫瘍促進劑 投與 實驗群

J, Urethane와 BHT 投與 實驗群

Urethane와 BHT를 同時에 投與한 實驗群에서는 urethane 投與 後 第2週와 第4週까지는 過增殖性 結節이 觀察되지 않았으나, 第8週에서 0.5mm 未滿의 過增殖性 結節 乃至 肺腺腫이 4마리중 1마리에서 觀察되었다. 第12週에서 肺腺腫이 57.1%에서 發生하였으며, 時間이 經過함에 따라 腫瘍의 數와 크기가 增加하여 第24週에서는 모든 動物에서 肺腺腫이 觀察되었다. 直徑 0.5mm 以上 肺腺腫의 마리當 平均個數는 第12週에서 1.0個, 第16週에서 2.5個, 第24週에서 5.3個로 나타났으며, urethane 投與 對照群(D)과 比較해보면, 第12週와 第16週에서는 오히려 腫瘍 成長이 抑制된 듯하며, 第24週에서 腫瘍 成長이 輕微하게 促進되었으나 統計學的으로 有意하지 않았다 (Table 9) (Fig. 5, 6) (寫眞附圖 Fig. 6, 12).

總括 및 考按

생쥐의 體重은 urethane 投與 後 第16週까지는 大體로 비슷한 樣相으로 增加하였으나, 第24週에서 vitamin A 投與 實驗群(B, E, G)이 對照群(A)에 比較 有意한 體重 減少를 보였는데, 이는 vitamin A의 大量 投與로 인한 毒作用으로 成長 障礙가 온 結果로 보며, vitamin A 投與群에서 脫毛現象을 보인 생쥐가 相當數 觀察되었으므로 vitamin A가 充分한 用量으로 投與되었음을 認知할 수 있었다. 생쥐의 肺重量은 urethane 投與 後 第16週까지는 各 實驗群間에 意味있는 差異를 볼 수 없었으나, 第24週에서는 urethane 投與 實驗群(E, G, J)이 對照群(A)에 比較 有意한 肺重量의 增加를 보였는데, 이는 urethane에 依한 肺胞細胞의 過增殖과 肺腺腫의 發生이 主된 要因으로 생각되며, 腫瘍促進劑 投與 實驗群에서 觀察된 肺重量의 增加는 더욱 顯著하여 BHT의 腫瘍促進效果를 反映하는 傾向을 보였으나, 腫瘍抑制劑 投與 實驗群에서는 腫瘍抑制效果를 肺重量測定으로 가늠하기는 어려웠다.

Urethane을 投與하지 않은 對照群에서는 直徑 0.5mm 以上の 肺腺腫을 觀察할 수 없었으나 urethane을 投與한 實驗群에서는 urethane 投與 後 第12週에서 0.5mm 以上 크기의 肺腺腫이 나타나서, 時間이 經過함에 따라 腫瘍의 數와 크기가 增加하여, 第24週에서는 모든 urethane 投與 實驗群에서 100%의 肺腺腫 發生率을 보였다. Urethane 投與 對照實驗群(D)과 腫瘍抑制劑 投與

實驗群(E, F, G)을 直徑 0.5mm 以上の 肺腺腫의 마리當 平均個數를 基準으로 比較하면 第12週에서 D 實驗群이 1.5個인데 比較, E 實驗群 1.2個, F 實驗群 1.4個, G 實驗群 1.1個로, 第16週에서는 D 實驗群이 3.2個인데 比較, E 實驗群 2.3個, F 實驗群 2.0個, G 實驗群 2.4個로, 그리고 第24週에서는 D 實驗群이 4.9個인데 比較, E 實驗群 4.0個, F 實驗群 2.7個, G 實驗群 3.3個로 減少를 보였다. 第16週에서 urethane 投與 對照群(D)에 比較 BCG 投與 抑制實驗群(F)에서 統計學的으로 有意한 腫瘍成長抑制를 보였으며, vitamin A 投與 抑制實驗群(E)에서는 成長抑制의 傾向을 보였다. 第24週에서는 BCG 投與 抑制實驗群(F)과 BCG와 vitamin A 同時投與 抑制實驗群(G)은 統計學的으로 有意한 腫瘍成長抑制를 보였으며, vitamin A 投與 抑制實驗群(E)은 抑制된 傾向을 보였으나, 統計學的 有意성은 없었다. 그리고 vitamin A와 BCG 同時 投與 抑制實驗群(G)은 BCG 投與 抑制實驗群(F)보다 오히려 腫瘍成長抑制效果가 낮아서 BCG와 vitamin A의 相乘效果가 없었다.

Urethane 投與 對照實驗群(D)과 腫瘍促進劑 投與 實驗群(J)을 0.5mm 以上 크기의 肺腺腫의 마리當 平均個數를 基準으로 比較하면, 第12週에서 D 實驗群이 1.5個인데 比較, J 實驗群이 1.0個, 第16週에서 D 實驗群이 3.2個인데 比較 J 實驗群이 2.5個로 腫瘍成長이 오히려 抑制된 듯한 樣相을 보였으며, 第24週에서는 D 實驗群이 4.9個인데 比較, J 實驗群이 5.3個로 腫瘍成長이 促進된 傾向을 보였으나, 統計學的으로는 有意성이 없었다. 그리고 直徑 1mm 以上 크기의 肺腺腫의 마리當 平均個數는 D 實驗群이 0.3個인데 比較, J 實驗群이 0.6個로 增加된 傾向을 보였다.

Kauffman(1974)은, urethane 投與 後 2週間은 第 I 및 第 II 型 肺胞細胞 數가 若干 減少하나, 2週後부터 增加하여 5週後에는 2배가 되며, 第5週부터 10週 사이에 第 II 型 肺胞細胞의 肺腺腫이 나타나며, 大喰細胞도 3週後부터 增加하여 6週後에는 2배 以上 增加한다고 報告하였으며, Dyson等(1975)은, urethane 投與 後 第2週에 肺胞細胞 增加速度가 最高水準에 到達하며, 2個月後에는 元來 水準까지 減少한다고 하였다.

Cole과 Foley(1969)를 비롯한 많은 研究者들(Lappe等, 1970; Trainin等, 1970; Colnaghi等, 1971)이 urethane에 依한 肺腺腫 發生에서 細胞性 免疫의 重要性을 示唆하였으며, 最近 Gorellk等(1981)은, urethane 投與 다음날부터 natural killer(NK) 細胞 活性도가 減少하여, 4日後에 正常化되었다가 7~8日後 다시 顯著히 減少하여 14~18日間 持續된다고 하였으며, 生後 5~

17日된 A/J mice에 urethane을 投與하면, NK活性度の 低下가 더욱 顯著하고 持續적이었으며, 肺腺腫의 發生率이 더욱 增加하고 發生時期도 빨라져서, 이러한 所見은 urethane에 依한 NK活性度の 低下가 肺腺腫 發癌過程에서 重要な 要因이라는 假說과 一致한다고 하였다.

本 實驗에서도 urethane投與 後 第2週부터 肺胞細胞의 過增殖이 觀察되었고, 第8週에는 直徑 0.5mm 未滿의 肺腺腫이 나타났으며, 第12週에는 0.5mm以上の 肺腺腫이 觀察되어 다른 研究者들(Kauffman, 1974; Dyson等, 1975; 박 등, 1982)報告와 一致하는 所見이었다.

Vitamin A는 網膜色素 形成에 關與하고, 大部分의 細胞의 正常的인 成長에 必要하며, 特히 여러 型의 上皮 即 角膜, 皮膚, 氣管, 泌尿生殖器 및 胃腸管 上皮 등의 正常的인 成長과 增殖에 必要하다(Bern等, 1955; Shierman, 1961; Guyton, 1981).

實驗動物에서 vitamin A 缺乏症은 呼吸器 및 泌尿器 粘膜의 扁平上皮化生을 일으키며(Clamon, 1974), 正常的인 分泌性 上皮가 乾燥한 角化性 上皮로 代置되어 細菌의 侵入을 쉽게 받게 될 뿐아니라(Zile, 1977), 發癌物質에 對한 感受性도 甚甚 增加한다고 한다(Newberne等, 1973; Cohen等, 1974).

여러 種類의 實驗腫瘍에서 vitamin A의 大量 投與가 腫瘍의 發生 및 成長을 抑制함이 밝혀지고 있으나, 그 正確한 作用機轉에 關해서는 確實히 究明되지 않았다. 免疫學的으로 vitamin A가 體液 및 細胞性 免疫促進劑로서 作用한다고 생각되고 있으며(Dresser, 1968; Jurin等, 1972; Cohen等, 1973), 內分泌學的으로는 實驗動物의 여러 上皮組織 및 腫瘍組織 그리고 人體 腫瘍의 相當數에서 retinoids에 對한 特異한 細胞結合蛋白 即 CRBP(cellular retinoic acid binding protein)나 RABP(retinoic acid binding protein)가 證明되고 있으며, 이러한 結合蛋白의 存在는 vitamin A가 홀몬과 같은 作用을 한다는 間接的 證據가 되며, 이로서 DNA 合成 및 有絲分裂指數를 抑制하여 腫瘍成長을 抑制한다는 것이다(Hill等, 1974; Sani等, 1977; Trown等, 1980). 生理學的으로는 發癌物質에 露出된 上皮內에서는 相反되는 두가지 機轉 即 正常的 細胞機轉과 腫瘍發生機轉이 同時에 作用하게 되는데, 이때 vitamin A는 이러한 正常的 細胞機轉을 增強시킴으로서 上皮癌의 發生을 抑制한다고 說明하고 있다(Sporn, 1976; Grubbs等, 1977).

生化學的 側面으로는 vitamin A가 化學的 發癌物質의 代謝過程에 關與하거나, 抗酸化劑로서 作用한다고

說明하고 있다(Hauswirth等, 1976; Craven等, 1977).

Vitamin A의 大量 投與로서 腫瘍發生을 오히려 促進시켰다는 報告들도 있다(Polliack等, 1967, 1969, 1971; Smith等, 1975).

高濃度の vitamin A는 表面活性化 性質에 依하여 細胞膜, 赤血球外膜, 絲粒體膜 등에 損傷을 주고, lysosomal membrane을 不安定化시켜 組織의 破壞를 招來하여, 細胞 및 細胞內 構造物에 對한 發癌物質의 透過를 容易하게 하여 發癌現象을 促進한다고 說明하고 있다(Bassett等, 1965; Dingle等, 1966; Polliack等, 1969).

本 實驗에서 urethane投與 對照群을 urethane과 vitamin A同時 投與 抑制實驗群과 比較해 보면, 腫瘍의 發生率은 相互差異가 없었고, 오직 直徑 0.5mm以上の 肺腺腫의 마리當 平均個數가 減少한 傾向을 보였으나, 統計學的 有意성이 없어, 腺腫에서는 vitamin A의 腫瘍抑制效果가 輕微함을 示唆한다고 생각된다. 이러한 結果는, 腺癌에서 vitamin A가 腫瘍發生率에는 影響을 주지 못하나 腫瘍成長은 抑制하였다는 Rettura等(1965)의 報告와 大體로 一致한다.

天然 vitamin A는 上皮癌 등의 發生을 抑制할 수 있으나, 組織分布가 不充分하고, 毒性이 甚하므로 實驗動物이나 人體에서 抗癌劑로서 使用하는데 制限이 있다. 本 實驗에서도 vitamin A 投與群에서 脫毛現象 및 成長障礙와 같은 毒性이 나타났다. 反面에 合成 retinoids는 天然 vitamin A에 비해 毒性이 적고 癌의 豫防의 效果도 더 強力하다고 한다(Bollag, 1974; Sporn等, 1976). 그러므로 抗癌效果가 보다 強力하고 毒性이 輕微한 合成 retinoids를 開發하는 것이 未來의 課題라고 생각한다.

BCG는 非特異性 免疫促進劑로서, 細網內皮系를 促進하여 腫瘍의 成長을 抑制하는데(Bekierkunst等, 1971; Zbar等, 1971; Bast等, 1974), 이러한 抗癌作用에 關與하는 效果細胞로서 一般的으로 大喰細胞가 關與하는 것으로 알려져 왔으나(Evans等, 1968), 最近에는 NK(natural killer)細胞나 macrophage like suppressor cell도 重要な 役割을 한다고 報告되었다(Wolfe等, 1976; Castes等, 1981). Wolfe等(1976)은 生後 6~8週된 C57 BL/6 mice에 10^7 BCG菌을 腹腔內 注射한 後 2~15日 사이에 腹腔內 遊離細胞의 細胞溶解能이 觀察되었으며, 4~8日 사이에 細胞溶解能이 最高潮에 達하여 徐徐히 減少하는데 3週後까지 持續된다고 하며, 그 效果細胞는 NK細胞라고 하였으며, Gorellk等(1981)은, urethane이 NK活性度を 減少시켜 肺腺腫의 發生을 增加시킨다고 報告한바 있는데, BCG에 의해서 urethane誘發 肺腺腫의 發生이 抑制되는 機轉에 NK細胞가 關與하는

것으로 推定할 수 있다.

BCG는 化學物質, virus 또는 放射線에 依해서 誘發된 腫瘍의 出現을 遲延시키고, 發生率을 減少시킬 수 있으며, 또한 BCG는 mice, rats, hamster에서의 腺腫, 肉腫, 上皮癌, 白血病의 發生을 抑制한다고 報告되어 있다(Bast等, 1974). BCG의 抗癌效果는 投與時期에 따라 影響을 받는데, 大部分의 研究者들은 發癌物質에 露出되어도 腫瘍이 생기기 前에 BCG를 投與하면 豫防效果를 觀察할 수 있었다고 하였다(Nilsson等, 1965; Sjögren等, 1969; Ankerst等, 1972). BCG를 virus나 化學 發生物質과 混合해서 投與時 더욱 效果의인 腫瘍 抑制效果가 있다고 하며(Schwartz等, 1971), BCG를 全身적으로 投與時 여러번 反復해서 投與하는 것이 一回 投與하는 것보다 반드시 效果가 낫다고는 볼수 없다고 한다(Ankerst等, 1972).

本 實驗에서 urethane投與 對照群과 urethane과 BCG를 同時 投與한 抑制實驗群을 比較하면, 腫瘍의 發生率에서는 抑制效果가 뚜렷하지 못하였으나, 直徑 0.5 mm 以上の 肺腺腫의 마리當 平均個數를 比較하면, 腫瘍成長抑制效果가 顯著하였다. Meltzer等(1974)과 Kurata等(1977)은 vitamin A와 BCG를 同時에 投與하여 腫瘍抑制效果가 더욱 增強되었다고 報告한 바 있으며, 이러한 抑制效果의 相乘作用은 vitamin A에 依해서 lysosomal membrane의 不安定性이 增加되고 BCG에 依해서 더욱 加速화된다는 點, vitamin A와 BCG 同時投與에 의해서 suppressor cell이 活性化된다는 點(Kurata等, 1977), BCG에 依한 宿主反應에 依해서 損傷받은 腫瘍細胞數가 vitamin A 投與群에서 增加한다는 點(Meltzer等, 1974)等에 依해서 說明되고 있다. 그러나 本 實驗에서는 vitamin A와 BCG 同時 投與 抑制實驗群에서 BCG의 腫瘍抑制效果를 增強시키지 못하였다.

BHT에 依한 腫瘍促進效果는 urethane에 依해서 發癌現象이 一旦 始作된 後, BHT의 反復的인 投與에 依해서 標的 細胞인 第Ⅱ型 肺胞細胞의 反復된 增殖에 依해서 惹起된다고 한다(Witschi等, 1977).

그런데 本 實驗에서는 BHT의 腫瘍促進效果를 滿足하게 觀察할 수 없었는데, 本 實驗에서 採擇된 urethane投與量이 다른 研究者들에 比較 比較의 많은 點을 理由로 들 수 있다.

以上 記述한 바와 같이, urethane에 依해서 誘發된 肺腺腫에서 vitamin A의 腫瘍抑制效果는 輕微하였으며, 反面에 BCG의 腫瘍抑制效果는 比較的 顯著하였다. Vitamin A와 BCG의 腫瘍抑制의 相乘效果는 없었으며, BHT의 腫瘍促進效果가 뚜렷하지 않아 이에 대

한 研究가 追後 더 進行되어야 할 것으로 思料된다.

結 論

Vitamin A, BCG 및 butylated hydroxytoluene(BHT)의 投與가 urethane 誘發 肺腺腫의 發生 및 成長에 미치는 影響을 病理學的으로 究明하고자 389마리의 생쥐(ICR mice)를 使用하여 肉眼觀察와 病理組織學的方法으로 研究하였다. 實驗群은 urethane投與 對照實驗群(體重 gm當 urethane 1mg을 週 2회씩 4週間 腹腔內注射), 腫瘍抑制劑 投與 實驗群(vitamin A: 飼料 kg當 150,000單位에 準하여 週 2회씩 胃腸內 經管 投與, BCG: 1.3×10^7 CFU를 右側 背部 皮下 1回注射), 腫瘍促進劑 投與 實驗群(BHT: 體重 gm當 0.25mg을 週 1회씩 腹腔內注射)等 10群으로 나누어 實驗하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 各 實驗群의 動物 體重 및 肺重量은 urethane投與後 第24週에서 有意한 差異를 보였는데, 생쥐의 體重은 對照群에 比較 vitamin A 投與 實驗群에서 有意한 減少를 보였고, 肺重量은 urethane 投與 實驗群에서 有意한 增加를 보였으며, urethane 投與群中에서도 urethane과 BHT의 同時 投與 促進實驗群에서 보다 顯著한 肺重量의 增加를 보였다.

2) 肉眼的으로 分明히 觀察되는 크기(直徑 0.5mm 以上)의 urethane 誘發 肺腺腫은 urethane 投與後 第12週에서 나타났으며, 時間 經過에 따라 크기의 增大 및 數의 增加를 보며, 第24週에서는 全 urethane 投與 實驗群에서 同一하게 100%의 腫瘍發生率을 보였다. Urethane 誘發 肺腺腫의 發生에 vitamin A, BCG 및 BHT가 미치는 影響은 없었다.

3) Urethane 誘發 肺腺腫의 腫瘍抑制劑 投與實驗에서 BCG는 腫瘍의 成長抑制效果가 比較的 顯著하였고, vitamin A는 腫瘍成長抑制가 輕微하였으며, vitamin A와 BCG 同時 投與에 依한 腫瘍成長抑制의 相乘效果는 볼 수 없었다.

4) Urethane誘發 肺腺腫의 腫瘍促進劑 投與 實驗에서 BHT의 腫瘍促進效果는 有意하지 않았다.

以上の 結果, vitamin A, BCG 및 BHT는 urethane 誘發肺腺腫의 發生率에서는 影響을 미치지 않았으나, 腫瘍成長抑制效果는 BCG 投與 實驗群에서 顯著하였고 vitamin A 投與實驗群에서는 輕微하였다. Vitamin A와 BCG 同時 投與에 依한 腫瘍成長抑制의 相乘效果는 觀察되지 않았고, BHT의 腫瘍成長促進效果는 有意하지 않았다.

—ABSTRACT—

An Experimental Study on Effects of Vitamin A, BCG and Butylated Hydroxytoluene(BHT) in Development of Urethane induced Pulmonary Adenoma of Mice

Yeong Cheol Kim, M.D. and Eui Keun Ham, M.D.

*Department of Pathology, College of Medicine
Seoul National University*

An experimental study on urethane induced pulmonary adenoma was carried out to observe the inhibitory or enhancing effects of vitamin A, BCG and butylated hydroxytoluene(BHT) in its development. Experimental animal(389 ICR mice, average 10gm) were divided into 10 groups including control, tumor inhibition and enhancement groups: control group (urethane: 1mg/gm body weight, 2 times/week, for 4 weeks, intraperitoneal), tumor inhibition groups (vitamin A: 150,000unit/kg diet, 2 times/weeks, by gastric tube, BCG: 1.3×10^7 CFU, one time, subcutaneous) and tumor enhancement group(BHT: 0.25mg/gm body weight, weekly, intraperitoneal).

The results were as follows:

- 1) Measuring body weights and organ weights of lung, significant differences were seen between control and experimental groups at the 24th week after urethane treatment. Compared as control, in vitamin A treated groups the body weights were significantly decreased, while the organ weights of lung were markedly increased in urethane groups, and were notably more increased in BHT and urethane combined treatment group.
- 2) Pulmonary adenoma with visible size on naked eye (≥ 0.5 mm in diameter) was not observed until the 12th week by urethane treatment. The sizes and numbers of tumors were increased in relation to duration of time.

In the 24th week by urethane treatment the incidence of pulmonary adenoma was 100% in all experimental groups(single and combined treatment).

No significant effects of Vitamin A, BCG and BHT were encountered on the incidence of pulmonary adenoma.

- 3) The inhibitory effect of BCG on the growth of pulmonary adenoma was remarkably demonstrated, while the effect of vitamin A was rather weak in degree. The additive effects of vitamin A and BCG in tumor inhibition were not clearly demonstrated.
- 4) The enhancing effect of BHT on the growth of pulmonary adenoma was not demonstrated.

In conclusion, the effects of vitamin A, BCG and BHT seem to be notably significant on the growth and less significant on the incidence in the development of urethane induced pulmonary adenoma. The inhibitory effect on the growth seems to be more significant in BCG than in vitamin A. No additive inhibitory effects of vitamin A and BCG and enhancing effect of BHT are encountered on the growth of pulmonary adenoma.

REFERENCES

- Ankerst, J. and Jonsson, N.: *Inhibitory effects of BCG on adenovirus tumorigenesis dependence on administration schedule. Int. J. Cancer*, 10:351-356, 1972.
- Baldwin, R.W. and Pimm, M.V.: *BCG immunotherapy of pulmonary growths from intravenously transferred rat tumor cells. Brit. J. Cancer*, 27:48-54, 1973.
- Bassett, B.B. and Packer, L.: *Response of isolated lysosomes to vitamin A. J. cell Biol.*, 27:418-450, 1965.
- Bast, R.C.J., Zbar, B., Borsos, T. and Rapp, H.J.: *BCG and Cancer. N. Engl. J. Med.*, 290:1413-1420, 1974.
- Bekierkunst, A., Levij, I.S. and yarkoni, E.: *Suppression of urethane induced lung adenomas in mice treated with Trehalose, 6,6-Dimycolate(Cord factor) and living bacillus Calmette Guérin. Science*, 174: 1240-1242, 1971.
- Bern, H.A., Elias, J.J., Pickett, P.B., Powers, T.R. and Harkness, M.N.: *The influence of vitamin A on the epidermis. Am. J. Anat.*, 46:419-448, 1955.
- Bollag, W.: *Prophylaxis of chemically induced benign*

- and malignant epithelial tumors by vitamin A acid (retinoid acid). *Eur. J. Cancer*, 8:689-693, 1972.
- Bollag, W.: Therapeutic effects of an aromatic retinoid acid analog on chemically induced skin papillomas and carcinomas of mice. *Eur. J. Cancer*, 10:731-737, 1974.
- Castes, M. Lynch, N.R., Lespinats, G. and Orbach-Arbouys, S.: Possible role of macrophage like suppressor cells in the antitumor activity of BCG. *Brit. J. Cancer*, 44:828-837, 1981.
- Chu, E.W. and Malmgren R.A.: An inhibitory effect of vitamin A on the induction of fore-stomach and cervix in syrian hamster by carcinogenic polycyclic hydrocarbons. *Cancer Res.*, 25:884-895, 1965.
- Clamon, G.H., Sporn, M.B., Smith, J.M. and Saffiotti, U.: Alpha and beta-retinyl acetate reverse metaplasias of vitamin A deficiency in hamster trachea in organ culture. *Nature (London)*, 250:64-66, 1974.
- Cohen, B.E. and Cohen, I.K.: Vitamin A: Adjuvant and steroid; antagonist in the immune response. *J. Immunology*, 111:1376-1380, 1973.
- Cohen S.M. Wittenberg, J.F. and Bryan, G.T.: Effect of hyper and avitaminosis A on urinary bladder carcinogenicity of N-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl)-formamide(FANFT). *Federation Proc.*, 33:602, 1974.
- Cole, L.J. and Foley, W.A.: Modification of urethane lung tumor incidence by low X-radiation doses, cortisone and transfusion of isogenic lymphocytes. *Radiat. Res.*, 39:391-399, 1969.
- Colnaghi, M.I., Menard, S. and Della Porta, G.: Demonstration of cellular immunity against urethane induced lung adenoma of mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 47:1325-1331, 1971.
- Cone, M.V. and Nettesheim, P.: Effects of vitamin A on 3-methylcholanthrene induced squamous metaplasia and early tumors in the respiratory tracts of rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50:1599-1606, 1973.
- Craven, P.A. and DeRubertis, F.R.: Inhibition by retinol and butylated hydroxy anisole of carcinogen-mediated increases in guanylate cyclase activity and guanosine 3'5' monophosphate accumulation. *Cancer Res.*, 37:3088-4097, 1977.
- Dingle, J.T., Sharman, I.M. and Moore, T.: Nutrition and lysosomal activity: The influence of the vitamin A status on the proteolytic activity of extracts from the livers and kidneys of rats. *Biochem. J.*, 98:476-484, 1966.
- Dresser, D.W.: Adjuvant activity of Vitamin A. *Nature*, 217:527-529, 1968.
- Dyson, P. and Heppleston, A.G.: Cell kinetics of urethane induced murine pulmonary adenomata. I. The growth rate. *Brit. J. Cancer*, 31:405-416, 1975.
- Eilber, F.R., Holmes, E.C. and Morton D.L.: Immunotherapy; experiments with a methylcholanthrene induced guinea pig liposarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 46:803-808, 1971.
- Evans, S. and Alexander, P.: Mechanism of immunologically specific killings of tumors cells by macrophages. *Nature(Lond)*, 236:168-170, 1968.
- Finkelstein, J.Z., Tittle, K.L., and Imagawa D.T.: Immunoprophylaxis and immunotherapy of leukemia with BCG. *Lancet*, 2:875-876, 1972.
- Gorellk, E. and Herberman, R.B.: Inhibition of the activity of mouse natural killer cells by urethane. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66:543-548, 1981.
- Gorellk, E. and Herberman, R.B.: Susceptibility of various strains of mice to urethane induced lung tumors and depressed natural killer cell activity. *J. Natl. Cancer Inst.*, 63:1317-1322, 1981.
- Grubbs, C.J. Moon, R.C., Sporn M.B. and Newthon, D.L.: Inhibition of mammary cancer by retinyl ether. *Cancer Res.*, 37:599-602, 1977.
- Guyton, A.C.: Textbook of medical physiology. 6th ed. W.B. Saunders Company(Philadelphia), 1981.
- Hanna, M.G. Jr., Zbar B. and Rapp, H.J.: Histopathology of tumor regression after intralesional injection of mycobacterium bovis I. Tumor growth and metastasis, *J. Natl. Cancer Inst.*, 48:1441-1455, 1972.
- Hanna, M.G. Jr. and Peters, L.C.: Efficacy of intralesional BCG therapy in guinea pigs with disseminated tumor. *Cancer*, 36:1298-1304, 1975.
- Harris, C.C., Sporn, M.B., Kufman, D.G., Smith, J.M., Jackson, F.E. and Saffiotti, U.: Histogenesis of squamous metaplasia in the hamster tracheal epithelium caused by vitamin A deficiency or Benzopyrene ferric oxide. *J. Natl. Cancer Inst.*, 48:743-761, 1972.
- Hauswirth, J.W. and Brizuela, B.S.: The differential

- effects of chemical carcinogens on vitamin A status and on microsomal drug metabolism in normal and vitamin A deficient rats. Cancer Res.*, 36:1941-1946, 1976.
- Hill, D.L. and Shih, T.W.: *Vitamin A compounds and analogs as inhibitors of mixed function oxidases that metabolize carcinogenic polycyclic hydrocarbons and other compounds. Cancer Res.*, 34:564-570, 1974.
- Jurin, M. and Tannock, I.F.: *Influence of vitamin A on immunological response. Immunology*, 23:283-287, 1972.
- Kauffman, S.L.: *Kinetics of alveolar epithelial hyperplasia in lungs of mice exposed to urethane. I. Quantitative analysis of cell populations. Lab. Invest.*, 30:170-175, 1974.
- Keller, R. and Hess, M.W.: *Tumor growth and non-specific immunity in rats: the mechanisms involved in inhibition of tumor growth. Brit. J. Exp. Pathol.*, 53:599-577, 1972.
- Kurata, T. and Micksche, M.: *Suppressed tumor growth and metastasis by vitamin A+BCG in Lewis lung tumor bearing mice. Oncology*, 34:212-215, 1977.
- Lappe, M.S. and Steinmuller, D.S.: *Depression of weak allograft immunity in the mouse by neonatal or adult exposure to urethane. Cancer Res.*, 30:574-678, 1970.
- Larsen, C.D.: *Pulmonary tumor induction with alkylating urethanes. J. Natl. Cancer Inst.*, 9:35-37, 1949.
- Lavrín, D.H., Rosenberg, S.A., Connor, R.J. and Terry, W.D.: *Immunoprophylaxis of methylcholanthrene induced tumors in mice with Bacillus Calmette Guérin and Methanol-extracted residue. Cancer Res.* 33:472-477, 1973.
- Meltzer, M.S. and Cohen, B.E.: *Tumor suppression by mycobacterium bovis (strain BCG) enhanced by vitamin A. J. Natl. Cancer Inst.*, 53:585-587, 1974.
- Nettleship, A., Hanshaw, P.S. and Meyer, H.I.: *Induction of pulmonary tumors in mice with ethyl carbamate (urethane). J. Natl. Cancer Inst.*, 4:309-319, 1948.
- Mirvish, S.S.: *The carcinogenic action and metabolism of urethane and N-hydroxyurethane. Adv. Cancer Res.*, 11:1-42, 1968.
- Newberne, P.M. and Regers, A.E.: *Rat colon carcinomas associated with aflatoxin and marginal vitamin A. J. Natl. Cancer Inst.*, 50:439-448, 1973.
- Nilsson, A., Revesz, L. and Stjernswärd, J.: *Suppression of strontium 90 induced development of bone tumors by infection with bacillus Calmette Guérin (BCG). Radiat. Res.*, 26:378-382, 1965.
- Old, L.J., Clarke, D.A. and Benacerraf, B.: *Effects of bacillus Calmette-Guérin infection on transplanted tumors in the mouse. Nature (Lond)*, 184:291-292, 1959.
- Orr, J.W.: *The induction of pulmonary adenomata in mice by urethane. Brit. J. Cancer*, 1:311-336, 1947.
- Polliack, A. and Levij, I.S.: *Increased incidence of carcinoma induced by DMBA in the hamster cheek pouch in response to vitamin A. Nature*, 216:187-188, 1967.
- Polliack, A. and Levy, I.S.: *The effect of topical vitamin A on papilloma and intraepithelial carcinomas induced in hamster cheek pouches with 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene. Cancer Res.*, 29:327-332, 1969.
- Polliack, A. and BenSasson, Z.: *Increased incidence of Rous sarcomas in response to excess vitamin A. Nature*, 234:547-548, 1971.
- Rettura, G., Schitteck, A., Hardy, M., Levenson, S.M., Demetriou, A. and Selfter, E.: *Antitumor action of vitamin A in mice inoculated with adenocarcinoma cells. J. Natl. Cancer Inst.*, 54:1489-1491, 1975.
- Saffiotti, U., Montesano, R., Sellakumar, R. and Born, S.A.: *Experimental cancer of the lung: Inhibition by vitamin A of the induction of tracheobronchial squamous metaplasia and squamous cell tumors. Cancer*, 20:857-864, 1967.
- Sani, B.P. and Corbett, T.H.: *Retinoic acid binding protein in normal tissues and experimental tumors. Cancer Res.*, 37:209-213, 1977.
- Schwartz, D.B., Zbar, B., and Gibson, W.T.: *Inhibition of murine sarcoma virus oncogenesis with living BCG. Int. J. Cancer*, 8:320-325, 1971.
- Selfter, E., Rettura, G. and Levenson, S.M.: *Decreased resistance of C₃H/HeHa mice to C₃HBA tumor transplants: Increased resistance due to supplemental*

- vitamin A. *J. Natl. Cancer Inst.*, 67:467-472, 1981.
- Shamberger, R.: *Inhibitory effect of vitamin A on carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst.*, 47:667-673, 1971.
- Shierman, B.S.: *The effect of vitamin A on epithelial mitosis in vitro and in vivo. J. Invest. Dermatol.*, 37:469-480, 1961.
- Shimkin, M.B. and Stoner, G.D.: *Lung tumors in mice: Application to carcinogenesis bioassay. Adv. Cancer Res.*, 21:1-58, 1975.
- Sjögren, H.O. and Ankerst, J.: *Effect of BCG and allogeneic tumor cells on adenovirus type 12 tumorigenesis in mice. Nature(Lond)*, 221:863-864, 1969.
- Smith, D.M., Rogers, A.E., Herndon, B.J. and Newberne, P.M.: *Vitamin A(Retinyl acetate) and benzo(a) pyrene induced respiratory tract carcinogenesis in hamsters fed a commercial diet. Cancer Res.*, 35:11-16, 1975.
- Sporn, M.B., Dunlop, N.M., Newton, D.L. and Smith, J.M.: *Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs(retinoids). Federation Proc.*, 35:1332-1338, 1976.
- Sporn, M.B.: *Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic cancer. Cancer Res.*, 36:2699-2702, 1976.
- Stjernswärd J.: *Immune status of the primary host toward its own methyl cholanthrene induced sarcomas. J. Natl. Cancer Inst.*, 40:13-22, 1968.
- Trainin, N. and Linker-Israeli, M.: *Influence of immunosuppression and immunorestitution on the formation of urethane induced lung adenomas. J. Natl. Cancer Inst.*, 44:893-900, 1970.
- Trown, P.W., Palleroni, A.V., Bohoslawec, O., Richelo, B.N., Halpern, J.M., Gizzi, N., Geiger, R., Lewinski, C., Machlin, L.J., Jetten, A. and Jetten, M.E.R.: *Relationship between binding protein affinities to cellular retinoic acid binding protein and in vivo and vitro properties for 18 retinoid retinoids. Cancer Res.*, 40:212-220, 1980.
- Weiss, D.W., Bonhay, R.S. and DeOme, K.B.: *Protective activity of fractions of tubercle bacilli against isologous tumors in mice. Nature (Lond)*, 190:889-891, 1961.
- WHO: *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Vol. 7, pp.110-140, International Agency for Research on Cancer, Lyons, 1971.*
- Witschi H.P. and Sahel, W.: *Stimulation of DNA synthesis in mouse lung following intraperitoneal injection of butylated hydroxytoluene. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 147:690-693, 1974.
- Witschi, H.P., Williamson, D. and Lock, S.: *Enhancement of urethane tumorigenesis in mouse lung by butylated hydroxytoluene. J. Natl. Cancer Inst.*, 58:301-305, 1977.
- Wolfe, A.A., Tracet, D.E. and Christopher, S.H.: *Induction of natural killer cells by BCG. Nature*, 262:584-586, 1976.
- Wong, Y. and Buck, R.: *An electron microscopic study of metaplasia of the rat tracheal epithelium in vitamin A deficiency. Lab. Invest.*, 24:55-66, 1971.
- Zbar, B. and Taraka T.: *Immunotherapy of cancer: regressions of tumors after intralesional injection of living mycobacterium bovis. Science*, 172:271-273, 1971.
- Zbar, B., Berustein, I.D., Bartlett G.L., Hanna, M.G. Jr. and Rapp, H.J.: *Immunotherapy of cancer: Regression of intradermal tumors and prevention of growth of lymph node metastases after intralesional injection of living mycobacterium bovis. J. Natl. Cancer Inst.*, 49:119-130, 1972.
- Zile, M., Bunge, E.C. and DeLuca, H.F.: *Effect of vitamin A deficiency on intestinal cell proliferation in the rat. J. Nutr.*, 107:552-560, 1977.
- 文駕模 : 宿主의 免疫狀態가 Ethyl urethane의 發癌性에 미치는 影響. 大韓外科學會誌, 20:471-482, 1978.
- 朴舜郁 · 金鎮福 : Retinyl palmitate의 投與가 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine에 의한 Wistar 쥐의 上部 胃腸管腫瘍發生에 미치는 影響에 관한 實驗의 研究. 大韓醫學協會誌, 27:65-78, 1984.
- 박용욱, 유재형, 송계용 : Urethane으로 유발된 생쥐肺腺腫의 발생기원에 관한 병리조직학적 연구. 中央醫大誌, 7:238-238, 1982.

LEGENDS FOR FIGURES

- Fig. 1.** The lung of mice in control group A (NaCl, the 24th week), showing no visible pulmonary mass.
- Fig. 2.** The lung of mice in group D (urethane, the 24th week), showing multiple pulmonary adenomas.
- Fig. 3.** The lung of mice in group F(urethane and BCG, the 24th week), showing irregular sized and multiple pulmonary adenomas.
- Fig. 4.** The lung of mice in group G(urethane, vitamin A and BCG, the 24th week), showing irregular sized and multiple pulmonary adenomas.
- Fig. 5.** The lung of mice in control group I(NaCl and BHT, the 24th week), showing no grossly visible mass.
- Fig. 6.** The lung of mice in group J (urethane and BHT, the 24th week), showing multiple and large pulmonary adenomas. ($> 2\text{mm}$ in diameter).
- Fig. 7.** Histologic finding of the lung of mice in group D(urethane, the 24th week), showing two nodules of pulmonary adenomas ($\geq 0.5\text{mm}$ in diameter) (H & E, $\times 40$).
- Fig. 8.** High power of Fig. 7, showing a hyperplastic adenomatous nodule of alveolar cells(H & E, $\times 100$).
- Fig. 9.** Histologic finding of the lung of mice in group E(urethane and vitamin A, the 24th week), showing three nodules of pulmonary adenoma(H & E, $\times 40$).
- Fig. 10.** Histologic finding of the lung of mice in group F(urethane and BCG, the 24th week), showing two nodules of pulmonary adenoma(H & E, $\times 40$).
- Fig. 11.** Histologic finding of the lung of mice in group G(urethane, vitamin A and BCG, the 24th week), showing three nodules of pulmonary adenoma(H & E, $\times 40$).
- Fig. 12.** Histologic finding of a large nodule of pulmonary adenoma ($> 2\text{mm}$ in diameter) in mice of group J (urethane and BHT, the 24th week)(H & E, $\times 40$).

