

## N-nitrosomorpholine 투여로 백서간에 발생한 전암병소 및 간암의 형태변화에 관한 연구\*

이화여자대학교 의과대학 병리학교실  
김 옥 경

= Abstract =

### The Morphologic Study of Preneoplastic and Neoplastic Progression During Hepatocarcinogenesis in Rats with N-nitrosomorpholine

Okkyung Kim

*Department of Pathology, College of Medicine, Ewha Womans University*

The development of hepatocellular tumors was investigated with histology and electron microscope in 50 males Sprague-Dawley rats administered continuously N-nitrosomorpholine(NNM) in drinking water at low dose(5mg/10ml) and high dose(25mg/100ml).

Groups of control and NNM treated rats were investigated for 30 weeks, 2 week intervals beginning of 12 weeks after administration.

Two types of preneoplastic lesion composed of basophilic or glycogenotic hepatocytes were observed preceding the appearance of hepatocellular carcinoma. Hepatocellular carcinoma is increased in number and size according to NNM dosage and duration. Histological classification were trabecular type which is most common, hepatocellular type, adenocarcinoma, and mixed type.

On conclusion, the environmental contamination of chemical in drinking water might cause of hepatocellular carcinoma and increased the incidence with larger dosage and longer duration.

### 서 론

한국을 위시한 아세아 국가에서 간암의 발생빈도는 다른 나라에 비해 높으며 따라서 발암의 요인이나 그 기전에 대한 관심이 매우 높다. 그 동안에는 B형 바이러스 간염에 의한 간암발생의 빈도가 높다고 보고되어왔으나<sup>1)</sup> 백신에 의한 간염 예방으로 바이러스에 의한 원인은 크게 감소될

것으로 예상된다. 따라서 간암의 원인으로 화학제품 혹은 환경오염등에서 존재하는 발암요소를 확인하여 제거하는 것이 절실히 요구되어 지고있다.

간암발생의 가능성을 가진 화학물질로는 Aminoazo dyes에 의한 보고<sup>2)3)</sup>가 많이 있으며 N-2-fluorenylacamide도 간암의 원인이 될 수 있다고 하였다<sup>4)</sup>. 또한 곰팡이 일종인 Aflatoxin B 도 특히 곡물취급 직종인에서 암 발생을 유발할 수 있다고 하였다<sup>5)</sup>. 이러한 물질에 접촉하게 될때는 그 양에

\*본 논문은 1992년도 교수연구기금 연구비에 의함.

따라 발생 빈도는 비례된다고 하였으며<sup>6)7)</sup>, 또 이러한 물질의 양에 의하여 여러 종류의 암이 발생한다고 하였고<sup>8)9)</sup> 암발생 기간도 물질의 양에 따라 다양하게 나타난다고 하였다<sup>9)</sup>.

N-nitrosomorpholine(NNM)을 이루는데 기본이 되는 Morpholine은 아민냄새를 가진 액체이며 가열을 하면 휘발성이 된다. 이물질은 Resin, Wax, Casein, Dye등을 녹이는데 용해제로 사용하며 또한 다른 물질과의 복합제로 부식방지제, 산화방지제, 가소제(plasticizer), 점액증진제, 살충제, 곰팡이제거제, 제초제, 국소마취제, 살균제 등으로 널리 쓰이고 있으며 이 기본물질이 박테리아나 기타 작용에 의하여 N-nitrosomorpholine이 된다. 이 물질은 수용성임으로 쉽게 산업현장에서 흘러나와 인간의 식수에 오염된다.

따라서 저자는 NNM을 백서의 먹는 물에 저장(5mg/100ml)과 교량(20mg/100ml)의 농도로 풀어서 30주동안 먹게 한뒤 12주부터 매2주마다 2마리씩 희생하여 간조직을 얻은뒤 간실질의 변화과정을 관찰하고 정상대조군과 소량투여군, 대량투여군의 각각의 전암병소와 간암의 변화과정을 조직학적 전자현미경적으로 관찰하여 정상 간세포로부터의 변화를 형태학적으로 확인함으로써 간암의 기전을 규명하고자 본 실험을 시도하였다.

## 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

실험동물은 체중 160gr내외의 백서 50마리를 사용하여 실험전 일주일동안 삼양식품 고품압축사료로 사육하여 환경에 적응시킨 후 다음과 같이 세 군으로 분류하였다.

제1군 정상대조군 10마리

제2군 NNM 소량투여군(5mg/100ml) 20마리

제3군 NNM 대량투여군(20mg/100ml) 20마리

정상대조군(제1군)은 생리식염수를 동양으로 식수에 타서 먹였으며 12주까지 관찰한 뒤 매 2주마다 1마리씩 희생하였다.

NNM 투여군은 1gr(1000mg)이 들어있는 시약 용기에 100ml 증류수를 넣어 %용액을 만든뒤 이를 다시 희석하여 저농도는 5mg/100ml 농도를 만들었고 고농도는 20mg/100ml 농도를 만들어서 사

용하였다.

소량투여군(제11군)은 NNM 5mg/100ml농도의 식수를 만들어 섭취하게 했으며 실험 시작 12주까지 관찰한 뒤 매 2주마다 2마리씩 30주까지 희생하였다.

대량투여군(제111군)은 NNM 20mg/100ml농도의 식수를 만들어 섭취하게 하였으며 실험 12주까지 관찰한뒤 12에서 30주까지 매 2주마다 2마리씩 희생시켜 조직을 얻었다.

실험에 사용한 N-nitrosomorpholine(NNM)은 1gr(1000mg)의 고농도액을 담은 100ml크기의 용기에 들어있으며 이는 sigma chemical compounds, no 883 ISOPAC of N7382(pfc), U.S.A.에서 제조한 연구용 시약을 사용하였다.

### 2. 연구방법

#### 1) 간조직의 육안적 소견

NNM 투여후 백서간의 육안적 변화를 12주부터 시작하여 매 2주마다 채취한 간의 색깔 및 병소, 발생된 종양등을 위주로 관찰하였으며 그 종양의 수 및 크기를 정상대조군, 소량투여군, 대량투여군을 각각 비교하여 관찰하였다.

#### 2) 간조직의 광학현미경적 관찰

##### (1) Hematoxylin-eosin(H & E)

광학현미경적 검색을 위하여 도살즉시 간조직을 왼쪽 간엽의 중앙부나 혹은 병소가 생긴 부위에서 적출하여 10%중성 호르마린에 고정하고 또 일부는 알콜이 들어있는 Carnoy's 용액에 고정시켰다. 고정시킨 간실질의 중앙부위에서 1cm크기와 2mm 두께로 조직을 얻어 파라핀에 포매후 6 $\mu$ m 두께로 절편하여 조직표본을 만들고 H & E 염색을 시행하였다. H & E 염색으로 나타난 간조직의 병리소견을 정도에 따라 음성(-), 경도(+), 중등도(++), 고도(+++)의 등급으로 분류하여 관찰하였다.

##### (2) 특수염색소견

간조직을 Carnoy's 용액에 고정시킨 뒤 periodic acid-schiff(pas), D-Pas를 염색했으며 Massons Trichrome(MT)을 시행하여 섬유증식을 관찰했다.

#### 3) 전자현미경적 관찰.

미세구조의 변화를 보기 위하여는 12주부터 희

생된 백서 간실질을 왼쪽 간엽의 중앙부나 병소에서 1~3mm 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde 용액에 고정시켰다. 일차 고정한 조직을 4°C에서 1%  $O_4$  in phosphate buffer (PH7.4) 용액에 두시간 재고정한후 무수알콜로 탈수하고 Epon 812에 포매하여 glass knife로 400~500 Å 두께로 세편을 만들어 uranyl acetate 및 lead citrate로 염색한 후 Hitachi-600형 전자현미경으로 관찰하였다.

## 연구성적

### 1. 육안적 소견

NNM 투여후 백서간의 육안적 변화를 12주부터 시작하여 매 2주마다 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30주 동안 관찰하였다.

처음(실험12주)은 대량투여군에서 간표면에 직경 1mm~3mm정도 크기의 회고 노란 변성된 결절들이 5~6개 관찰되었으며 이는 섬유증식을 동반한 간실질로 생각되었다.

실험기간이 지나면서 실험 14주에서는 소량투여군에서는 병변이 관찰되지 않았으나 대량투여군에서는 회색된 두마리 백서에서 각각 한개씩 두개의 부정형 회백색의 딱딱한 종양이 우엽의 가장자리에서 관찰되었으며 크기는 5~7mm 정도였다. 실험 16주에 제1군에서는 병변이 관찰되지 않았으며 제2군에서는 2마리 모두 큰 종괴가 발생했다. 한마리는 우엽에 6×5cm크기의 종괴가 출혈괴사를 동반하며 거의 전체 우엽을 점유하고 있었다. 다른 한마리는 비슷한 5~8mm크기의 회백색 종양이 전 간실질에 미만성으로 존재하고 있음이 관찰되었으며 또한 양쪽의 늑막표면에 유사한 크기의 전이병소를 관찰할 수 있었다.

실험기간이 30주까지 가면서 이 종괴들은 그 수와 크기가 증가되었으며 종괴발생은 대량투여군에서만 기간에 비례하여 관찰되었다.

NNM 투여후 발생한 종양의 빈도를 보면(표 1 참조) 전체투여군 40마리 백서중 18마리가 종양이 발생되어 45%의 발생율을 보였다. 이를 세분해서 보면 대조군과 제2군에서는 종양이 발생하지 않았으며 제3군에서는 20마리중 18마리가 발생하여 90%가 발생되었다. 종양의 수를 보면 기간이 길어질수록 수와 크기가 증가됨을 알 수 있었으며 따라서 24주부터는 종양이 전엽에 퍼져 있으며 간실질의 50% 이상을 점유하고 있음을 볼 수 있었다. 이 종양은 대량투여군의 14주부터 관찰되었으며 기간이 길어질수록 종양점유율은 증가되었다. 제3군에서 20마리중 5마리가(25%) 늑막표면에 전이된 종양결절들을 보였다.

### 2. 광학 현미경적 소견(표 2참조)

종양발생 이전의 간실질에는 간소엽의 형태를 어느정도 유지하면서 간세포의 변형을 초래한 바세 종류의 세포형태적 변화를 보였는데 첫째는 eosinophilic area이고 둘째는 clear cytoplasm을 가진 glycogenotic area며 또한 하나는 basophilic area이다. 이들 병소들은 국소적이며 다발적으로 발생하였고 시간이 경과함에 따라 수와 크기가 증가되는 추세를 보였다. 이들 변성부위는 서로 인접하고 있으나 서로 섞여서 존재하지는 않았다. Eosinophilic cell은 제11군에서 12주부터 다량으로 관찰되어지나 22주를 넘어서는 점차 감소됨을 보였고 제11군에서도 12주부터 고도로 관찰되다가 16주부터 경도로 감소, 26주에는 완전히 소실되었다. Glycogenetic cell도 역시 제11군에서 12주부터 다량으로 존재하다 24주이후에는 점차 소실되었으며 제11군에서도 12

Table 1. Tumor incidence of liver in NNM treated rats

Weeks Group	Weeks										Total	%
	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30		
I	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/10	0
II	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/20	0
III	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	18/20	90
III	0/2	0/2	1/2	1/2	1/2	1/2	0/2	0/2	1/2	0/2	5/20	25

With lung meta.

Meta. : metastasis.

주에 고도로 관찰되고 16주부터경도로 24주에는 음성으로 보여 이 두세포변형은 비슷한 양상을 보였다. 이에 반하여 basophilic cell은 제11군의 20주부터 경도로 보이기 시작하였으며 제11군은 18주부터 점차 증가하여 고도로 보였으며 이에 비례하여 carcinomatous area도 제11군에서는 관찰되지 않았으나 제11군에서 16주부터 관찰되어 20주에는 고도의 암 점유를 나타냈다. 폐의 전이병소는 제11군의 16주, 18주, 24주, 28주, 30주에 발생하여 제11군의 25%에서 전이를 나타냈다. Basophilic area는 흔히 lamellar appearance를 보여서 trabecular 형태를 정하였으며 이 세포는 정상 간세포보다 적었으며 간소엽의 정상형태는 찾기 어려웠다.

Glycogenotic area는 간세포내에 당분의 축적에 의하여 많은 공포를 함유한 clear cytoplasm으로 관찰되기도 했으며 때로는 ground glass 모양의 eo-

sinophilic cytoplasm으로 정상 간세포보다 훨씬 크게 관찰되었다.

Basophilic lesion은 주로 efferent vein을 따라 존재할 때가 많았으며 periportal area에는 드물게 관찰되었다. Portal triad에 존재하는 염증반응은 제11군에서는 가끔 경도로 관찰되던 것이 제11군에서 점차 염증세포의 양이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 섬유증식도 제11군에서 20주부터 경도로 유지되어 보이다가 제11군에서 점차 증가되어 20주에는 중등도로 증가를 보이다가 26주에는 고도의 섬유증식을 보였다.

담관의 증식상은 제11군에서 22, 24주에서부터 경도로 관찰되었으나 제11군에서 14주부터 시작하여 서서히 증가됨을 관찰하였고 때로는 cystic dilatation과 동반하여 보여지기도 하였다. 담관에서 기원한 cholangiocarcinoma는 제11군의 20주에서 보였으며 비교적 드물게 관찰되었다. Hepatocellular

Table 2. Light microscopic findings of liver in NNM treated liver(H & E)

Finding Groups(wks)	Hepatocyte alteration					Portal triad			
	Eosino- philic	Glyco- genotic	Baso- philic	Hepato- cell ca.	Meta- stasis	Inflam- mation	Fibro- sis	Cystic- prolif.	Cholan- gio. ca.
I 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	++	++	-	-	-	±	-	-	-
14	++	++	-	-	-	-	-	±	-
16	+	+	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	±	-	-	-	-	-	-
I 20	+	+	+	-	-	-	+	±	-
22	±	-	+	-	-	+	+	+	-
24	-	+	+	-	-	-	+	+	-
26	-	-	+	-	-	+	+	+	-
28	-	-	+	-	-	-	-	-	-
30	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12	+++	+++	+	-	-	+	-	-	-
14	+++	+++	+	-	-	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+	++	+	+	-
18	+	-	++	++	+	+	+	+	+
20	-	+	++	+++	-	++	++	+	-
22	+	+	+++	+++	-	+	++	++	-
24	+	-	+++	+++	+	+	++	++	-
26	-	-	-	+++	-	+	+++	++	-
28	-	-	++	+++	+	+	++	++	-
30	-	-	+++	+++	+	+	+++	++	-

- : negative ± : trace + : mild ++ : moderate +++ : severe.

Table 3. Light microscopic(special stains) findings of liver in NNM treated liver

Finding \ Groups(wks)	PAS			D-PAS			MT	
	Normal	Baso- philic	Hepato- cell. ca.	Normal	Baso- philic	Hepato- cell. ca.		
I	12	+++	0	0	+	0	0	-
	16	+++	0	0	+	0	0	-
	20	+++	0	0	+	0	0	-
	24	+++	0	0	±	0	0	-
	30	++	0	0	+	0	0	-
II	12	+++	0	0	+	0	0	-
	16	+++	0	0	±	0	0	±
	20	++	0	0	+	0	0	-
	24	++	+	0	+	-	0	+
	30	++	±	0	+	-	0	-
III	12	++	+	-	+	-	-	++
	16	++	+	-	+	-	-	+++
	20	+	±	-	+	-	-	++
	24	++	-	-	-	-	-	+++
	30	++	-	-	+	-	-	+++

0 : Findings are not occur.

adenoma & carcinoma를 발생한 부위를 보면 적은 adenoma의 형태는 basophilic하거나 clear eosinophilic으로 보였으며 전자는 lamellar형태의 작은 세포로 구성됨을 관찰할 수 있었다. 그러나 adenoma나 carcinoma를 조직병리학적으로 확실히 구분되지 않았으며 또한 같이 존재할 때가 많았다.

Adenoma는 실험 12주부터 발생하여 점차 수가 증가하였다. 이는 주위조직과 경계가 분명하며 거의 정상 간세포와 같이 관찰되었으며 주위조직이나 혈관 침입의 흔적을 찾을 수 없었다.

Carcinoma는 대부분이 trabecular형으로 주로 basophilic세포로 구성되었으며 또한 상당수의 glycogenotic 세포로도 구성되어 있는 형태 관찰되었다. 때로는 adenoid structure로 보여 adenocarcinoma type으로 관찰되었다.

때로는 담관증식상도 보였으며 실제 cholangiocarcinoma가 발생한 경우도 있다.

발생된 간암은 같은 동물에서도 여러 형태를 보이기도 했으나 또한 서로 다른 Hepatocellular & Adenocarcinoma가 같이 관찰되기도 하였다.

간암세포의 분류를 보면(표 4참고) hepatocellular type이 가장 많아 89%를 점하였으며 그중 large eosinophilic type 3(17%), trabecular type 10(55.5%),

Table 4. Classification of carcinoma in NNM treated rats

Histologic type	Number of tumor(%)
Hepatocellular	16(89)
Large cell type	3(17)
Trabecular type	10(55.5)
Adenocarcinomatous type	1(5.5)
Mixed type	2(11)
Cholangiocarcinoma	2(11)
Others	0
Total	18(100)

adenocarcinoma type 1(0.5%), mixed type 2(11%) 이었으며 담도에서 발생한 cholangiocarcinoma 2(11%)이어서 간세포암의 trabecular type이 가장 많았다.

### 3. 특수염색 소견(표 3참조)

Canoy's solution에 고정한 간조직을 Hematoxylin-Eosin을 실시하여 basophilic area를 관찰했으며 또한 PAS & D-PAS를 실시하여 정상조직과 변성을 보인 부위 및 간암부위에 당원의 함유를 비교하였다.

PAS는 정상조직에서는 전 실험기간동안 강한

양성반응을 보였으며 작은 Basophilic cell변성에서 제11군은 약한 양성을 보였으며, Hepatocarcinoma에서 음성을 나타냈다. D-PAS에서도 선종 및 간암에서 음성을 보였고 정상 간세포에서는 정도의 양성을 나타냈다.

섬유증식을 보는 MT 염색은 제11군보다 제111군에서 고도로 관찰되었다.

#### 4. 전자현미경 소견

정상 간세포에서는 비슷한 크기의 미토콘드리아가 다수 존재하였으며 그 사이로 Roush Endoplasmic reticulum과 적은양의 Smooth Endoplasmic Reticulum이 존재하였다. 가끔 지질변성과 당원과립이 존재하였다.

간세포의 변형된 형태에서는 eosinophilic, glycogenotic, basophilic 세포들이 크기의 차이는 다소 있으나 핵과 핵소체의 크기는 많이 커져있지 않았으며 형질내 organelle은 정상을 유사하였고 다만 형질내 축적된 물질의 양이 다름을 관찰하였다.

전암상태라고 볼 수 있는 neoplastic nodule에서는 좀더 핵이 정상보다 커지면서 핵소체도 부정형으로 변화되며 형질내 공포형성이 한층 심해져서 cystic degeneration과 necrotic debris들이 관찰되었다.

발생된 간암부위에서는 핵과 핵소체의 크기가 비정상이며 염색체의 배열도 clumping이 심하여 형질내 미토콘드리아의 수가 감소되고 RER도 적어지며 clear vacuole과 glycogen rossete가 가끔 관찰되었으며 lipofuscin granule(LF), autophasic vacuoles등도 관찰되었다.

NNM 투여로 인한 간세포의 형태적 변화의 전자현미경 소견을 종합하면 핵과 핵소체의 크기가 증가되며 미토콘드리아가 다양한 형태로 변화되며 그수도 감소되었다. 이들 변형된 세포들은 전암형태의 neoplastic nodule이 되면서 변화는 더욱 심해지며 간암상태가 되면 정상과는 아주 다른 anaplastic cell로 변화됨을 관찰할 수가 있었다.

## 고 찰

환경 및 식수오염으로 인체 유해한 화학 물질을 상당기간 동안 섭취함으로써 간실질에 발생하는 전암병소 및 간암발생의 위험이 있음은 간암의

빈도가 높은 아세아 지역에서는 심각한 현안문제로 생각되며 따라서 환경오염의 대처방안이 강구되어야 할 것이다.

본 연구에서 NNM 투여한 백서에서 간실질에 오는 광학현미경적 소견의 초기병소로 basophilic area와 eosinophilic glycogenetic area가 생겼으며 이들의 형태는 전자는 적은 간세포가 염기성 색상을 나타내고 trabecular pattern으로 나열되어 있으며 경계는 비교적 분명하였다. 후자는 간세포가 크고 세포질이 호산성으로 염색되었으며 이 두세포는 특수염색으로 확인할 수 있었다.

Basophilic area의 간세포병소에서 adenoma(선종)이나 간암으로 전환되는 것에 관한 보고들이 있다.

1991년 Cortinovis등<sup>10)</sup>은 N-nitrosodiethylamine(DEN)과 N-nitrosomorpholine(NNM)을 백서에게 낮은 농도로 물에 섞어 먹인후 2주간격으로 관찰한 결과 두 종류의 간세포 변화를 기술하였는바 basophilic 간세포와 glycogenotic 간세포를 보였으며 전자는 후자보다 적게 나타났고 실험기간이 길어지면서 basophilic area는 선종으로 전환되며 이는 또 trabecular type의 hepatocellular carcinoma로 된다고 보고하였다.

그는 이 보고에서 basophilic area는 trabecular 형태로 증식하여 lamella 형의 선종을 보이기도 하며 간세포의 크기가 커지면서 세포질이 diffuse hyperbasophilia를 이루는 경우도 있다고 강조하면서 이러한 병소는 efferent vein과 centra vein 주위에서 흔히 존재한다고 기술하였다. 때로는 이러한 basophilic hepatocyte는 정맥을 침윤하기도 하고 심한 anaplasia를 보이며 간암으로 이행한다고 하였다. 이러한 basophilic hepatocyte 내에 세포 효소의 변화를 보는 보고<sup>11)</sup>로는 diethyl-nitrosamine 2.5~4.0g/body wt를 한번 복강내 주입시킨뒤 생긴 국소적 간병변을 조직화학법으로 효소의 양을 연구한 결과 초기에는 glucose-6-phosphatase가 감소하는 반면 glucose-6-phosphate dehydrogenase가 증가했고 cytoplasmic ATPase는 실험 24주에 100% 감소했으며 acid phosphatase는 78%에서 감소되었다. 따라서 변형된 간세포들은 효소기능에 있어서도 정상과 현저히 다르며 주로는 심한 기능저하를 보였다.

또한 2-acetylaminofluorene을 백서에 먹여서 발생시킨 48예의 간암에서 효소의 활성을 측정할 결과 r-glutamyl transpeptidase는 증가되었고 adenosine-5-triphosphatase는 소실되었으며 glucose-6-phosphatase도 완전 소실을 보였다고 보고<sup>12)</sup>하였고 이러한 효소는 전예의 85%에서 변화를 보였다. Basophilic area가 carcinogen을 계속 투여한 백서에서 transformation 한다고 보고한 예는 aminoazo dyes에 의한 실험과<sup>2)3)</sup> n-2-fluorenyl acetamide에 의한 실험<sup>4)</sup> 내지는 aflatoxin B1에 의한 실험에서<sup>5)</sup> basophilic area가 간종양으로 이행한다고 하였다.

Glycogen area에 대하여는 DEN<sup>15)16)</sup>과 NNM<sup>8)9)</sup>을 투여한 백서간에서도 관찰되었다고 보고하였고 N-2-fluorenylacetamide<sup>14)</sup>에 노출되어 생긴 acidophilic area가 일부는 간종양으로 전환한다고 보고하였다.

NNM과 유사한 hepatocarcinogen으로써 diethylnitrosamine을 마우스 복강내 주사한뒤 간조직의 변화를 관찰한 결과<sup>13)</sup> 정도의 지방변성이 실험 3일에 독작용으로 생겼다가 7일에 없어졌고 basophilic area가 실험 10주에 생겼다. 이 병소의 간세포는 특징적으로 풍부한 RNA, high nuclear to cytoplasmic ratio, glucose-6-phosphatase 저하를 나타냈고 실험기간동안 이 병소내 간세포의 이상형이 점차 심하여 지면서 결국은 실험 44주에 trabecular type의 간암을 발생시켰으며 조직학적으로 정맥의 침윤을 확인함으로써 최초의 basophilic area에서 간암이 발생함을 확인했다고 하였다.

이러한 간세포의 형태가 변화하는 이유는 확실히 판명되지는 않았으며 동물의 종류, carcinogen의 종류, 투여량에 따라 다양하게 나타난다고 하였다. Carcinogen의 투여량에 따라 간세포형이 증가된다고 보고한 논문은 Herranz & Coworker<sup>6)7)</sup>에 의한 것으로 DEN의 대량투여군에서는 많은 부위의 glycogenotic과 basophilic area가 생겼으며 소량투여군에서는 아주 적은 병소가 나타났다고 하였고 전자에서는 basophilic area에서 직접적으로 간암이 자주 발생하였다고 보고하였다. 또한 마우스복강내 DEN을 투여한 후 110주까지 관찰한 결과 50% 이상에서 간세포에 이상이 생겼다고 하였다<sup>17)</sup>. 그는 이 보고에서 DEN에 의하여 4종류의 형태변화를 볼 수 있었는데 basophilic area가 초기에 glucose-6-

phosphatase 결핍을 보이면서 hyperplastic nodule, adenoma, hepatocarcinoma등이 시간과 투여량에 비례하여 점차 증가하였다고 하였다.

Banash & Coworker<sup>8)9)</sup>는 NNM의 투여량을 달리한 결과 간세포가 변화되어 clear, acidophilic & basophilic한 세포로 되어 이들이 서로 혼합되어 존재하다가 결국 선종과 간암으로 전환한다고 보고하였다<sup>9)</sup>.

본 실험에서도 NNM 투여후 간세포가 변형되어 실험 12주에는 세포질내 맑은 공포를 함유한 glycogenotic area가 소엽의 중앙부에 피사와 동반되어 관찰되었으며 국소적으로 적은 basophilic area도 관찰되었다. 실험 15주에 소량투여군에서는 변화가 보이지 않으며 대량투여군에서는 국소적으로 회백색의 단단한 0.8cm정도의 크기를 가진 종양이 왼쪽 간엽에 2마리에 한개씩 두개가 관찰되었다. 이 종양들은 광학현미경적으로 모두 pleomorphic한 간암으로 판명되었다. 이들 간암의 세포들은 크기가 정상보다 증가되었고 호산성 내지는 공포를 형질 내에 갖고 있었으며 다핵의 거핵세포도 있는가 하면 크기가 작은 염기성 간세포도 존재하는 혼합형 세포형태를 보였다.

실험 17주에는 소량투여군에서 뚜렷한 소견이 없었으며 대량투여군에서는 두마리에서 모두 간암 발생을 관찰한 바 한마리는 한쪽간엽에 거의 모든 부분을 암으로 점유하였으며 다른 한마리는 암의 결절들이 전체 간실질에 고루 분포되어 있음을 관찰할 수 있었다. 폐의 늑막에도 전이된 병소가 한마리에서 보였다. 조직학적으로는 전자는 작은 크기의 염기성 세포형의 간암이었으며 후자는 선암형과 미분화형이 혼합되어 관찰되었다.

이상의 광학현미경적 소견으로 간세포의 변형이 basophilic 혹은 glycogenotic세포를 이루고 이들은 adenoma를 형성하기도 하며 또한 간암으로 발전하는 전암병소로 생각된다. 이 전암병소는 실험의 시간과 투여량에 비례하여 수와 크기가 증가되었으며 또한 간암의 발생율도 많아짐을 알 수 있었다. 따라서 환경오염에 화학물질의 양과 노출기간이 간암 발생빈도에 큰 영향을 주게 됨을 알 수 있었다.

정상대조군 백서의 간세포에 전자현미경소견을 보면 미토콘드리아가 다수 보이며 다량의 rough endoplasmic reticulum(RER)와 smooth endoplas-

mic reticulum(SER)이 존재하였다. 그의 lysosomes, lipid droplet, glycogen granule들이 관찰되며 간세포의 80%가 서로 유사한 형태를 보였다.

간세포의 변형된 형태에서는 eosinophilic, glyco-genotic, basophilic 세포들이 크기의 차이는 있으나 핵과 핵소체의 크기는 많이 커져있지 않으며 형질내 organelle은 정상에 유사하였으며 다만 형질내 축적된 물질의 양이 다름을 관찰할 수 있었다. 전암상태의 neoplastic nodule에는 핵이 정상보다 커지면서 핵소체도 부정형으로 변화되면 형질내 공포형성이 심해져서 cystic degeneration과 necrotic debris들이 관찰되었다.

발생된 간암부위에서는 핵과 핵소체의 크기가 비정상이며 염색체의 배열도 clumping이 심하였으며 형질내 미토콘드리아의 수가 감소되었으며 RER도 적어졌다.

간암세포의 clear cell type의 전자현미경 소견에 있어 풍부한 당원과립과 소량의 지질이 포함되었으며 desmosome과 세포내의 organelle이 적은 수로 나타났으며 RER, free ribosome & polyribosome이 풍부하게 있으며 또한 당원과 지질도 존재하였다. Intranuclear lipid inclusion이 보이기도 하고 미토콘드리아의 모양과 크기가 다양하며 crista의 소실과 cisternal dilatation등을 보였다.

NNM 투여로 인한 간세포의 형태적 변화의 전자현미경소견을 종합하면 간세포의 핵과 핵소체의 크기가 증가하며 미토콘드리아가 다양한 형태로 변화되며 그 수도 감소된다. 이들 변형된 세포들은 전암상태의 neoplastic nodule이 되면서 변화는 더욱 심해지고 간암상태가 되면 정상과는 아주 다른 anaplastic cell로 변환됨을 관찰할 수 있었다.

## 결 론

NNM 투여로 발생한 백서 간의 간세포변화 과정을 관찰하고 간암의 발생과정, 발생양상을 육안적, 광학현미경적 및 전자현미경적으로 관찰하여 그 발생기전을 알아보고자 본실험을 시도한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 백서 간암의 전암병소로 관찰되는 세 형태적 간세포 변화가 있었으며 즉, eosinophilic cell, glyco-genotic cell, basophilic cell로 전자의 두변화는 제11

군과 제111군에서 유사한 양상으로 12주에 다량 함유하다가 점차 감소되어 24주 이후에 소실되는데 이는 간암발생과는 반비례한데 반하여 후자는 제11군에서 20주 제111군에서 12주부터 점차 증가하여 22주부터 고도를 유지하였으며 이는 간암발생과 비례하여 나타내는 바 basophilic cell이 전암세포와 더욱 연관함을 보였다.

2) 백서에 발생한 종양으로는 Adenoma와 hepatocarcinoma는 제11군에서는 발생치않고 제111군의 16주에서 발생하였으며 전체 암발생 18마리(실험군의 45%) 중 간세포암이 16마리(89%)로 large eosinophilic type(17%), trabecular type(55.5%), adenocarcinomatous type(5.5%), mixed type(11%) 등이 포함되며 단관근원인 cholangiocarcinoma는 전체암발생의 2마리(11%)가 발생하였다. 이 종양들은 투여량과 투여기간에 비례하여 증가하였다.

3) 특수염색소견상으로는 carnoys액에 고정된 뒤 basophilic hepatocyte가 잘 구별되었으며 PAS염색상 neoplastic nodule과 hepatocarcinoma는 음성으로 관찰되어 정상과 변화된 간세포와 구별이 가능하였다. 섬유증식을 볼 수 있는 MT염색상으로 제3군에서 투여량과 투여기간에 비례하여 섬유증식을 관찰할 수 있다.

4) 전자현미경 소견에서 전암형태로 핵과 핵소체의 변화가 가장 심하게 부정형으로 커졌으며 미토콘드리아의 수가 감소되고 내부구조 즉 cisternae의 소실 및 cystic dilatation을 관찰할 수 있었다. 그의 공포형성과 지질변성, glycogen함유량은 발생한 암 종류에 따라 달랐다.

이상의 결론을 종합하여보면 NNM 투여로 백서간세포의 초기에는 호기성 및 glyco-genotic 세포로 변성을 하였고 점차 적은 염기성 세포로 변하면서 adenoma와 neoplastic nodule을 형성한 뒤 후기에는 간세포암으로 전환됨을 관찰하였다.

## 개 요

한국을 위시한 아세아에서 빈도가 높은 간암의 발생원인을 B형 바이러스가 아닌 화학물질이나 환경오염에서 찾아내고 이 물질들이 어떻게 간세포를 변형시키고 전암병소를 어떻게 유발시키며 결국 간암으로 이행되는 과정을 광학및 전자현미경



소견으로 형태학적 분석을 통하여 그 기전을 파악하고자 노력하였다.

간세포의 초기 변화로는 eosinophilic과 glycogenotic 변화였고 이는 형질내 다양한 양의 물질을 함유한 간세포의 변성과정이며 이는 초기에 다량 보이다 후기에는 점차 감소하였다. 이들은 점차 크기가 적은 basophilic cell로 전환하여 초기보다 후기에 다수 증가하면서 전암상태의 간세포로 변화하였다. 이 상태에서는 소엽의 정상상태를 벗어나 심한 증식상을 보였으며 특수염색상 당원도 점차 소실되었으나, basophilic cell은 기간이 길어지면서 수가 늘어났고 결국 혈관침윤이나 폐에 전이 병소까지 발생케 했다.

전자현미경소견으로 미토콘드리아, RER등이 현저히 감소되었고 핵과 핵소체가 비정상적으로 커지면서 이상형의 간세포로 되었다. 결론적으로 산업 현장에서 식수로 오염된 NNM은 초기 간세포 변형에서 점차 염기성 증식성의 전암병소로 이행되었고 이 세포는 전이와 혈관침윤을 초래하는 간암으로 이행됨을 광현미경과 전자현미경으로 확인되었다.

## References

- 1) Lee HK & Kim YI : *Ultrastructural observation on human primary hepatocellular carcinoma. K J Path* 1986 : 20(4) : 442-452
- 2) Daoust R & Calami R : *Hyperbasophilic foci as sites of neoplastic transformation in hepatic parenchyma. Cancer Res* 1971 : 31 : 1290-1296
- 3) Karasaki S : *The fine structure of proliferating cells in preneoplastic rat livers during azo-dye carcinogenesis. J Cell Biol* 1969 : 40 : 322-335
- 4) Williams GM, Klaiber M, Parker SE, Farber E : *Nature of early appearing, cacinogen-induced liver lesion-resistant to iron accumulation. J Natl Cancer Inst* 1976 : 57 : 157-165
- 5) Butler WH, Hemsail V Stewart MG : *Histochemical studies on the early proliferative lesion induced in the rat liver by aflatoxin. J Pathol* 1981 : 133 : 325-340
- 6) Herranz G & Ceballos L : *Cambios morfologicos en el higado de la ratadebidos a la dietilnitrosamina. Los patrones reacionales citotoxico y carcinogenetico. Rev Med Univ Navarra(Spain)* 1970 : 14 : 17-51
- 7) Herranz G, Reparaz B, Ceballos L : *Morphogenese der durch niedrige Dosen Von Diathylnitrosamin bei der Ratte hervorgerufenen Lebertumoren. Verh Dtsch Ges Path* 1976 : 60 : 418
- 8) Bannasch P : *The cytoplasm of hepatocytes during carcinogenesis. Rec Res Cancer Res* 1968 : 19 : 1-100
- 9) Moore MA, Mayer D, Bannasch P : *The dose dependence and sequential appearance of putative preneoplastic populations induced in the rat liver by stop experiments with N-nitrosomorpholine. Carcinogenesis* 1982 : 3 : 1429-1436
- 10) Cortinovis C, Klimek F & Nogueira E : *Rat hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosodiethylamine and n-nitrosomorpholine administered at low doses. Am J Path* 1991 : 139 : 1157-1171
- 11) Vesselinovitch SD, Hacker HJ, and Bannasch P : *Histochemical characterization of focal hepatic lesions induced by single diethylnitrosamine treatment in infant mice. Cancer Research* 1985 : 45 : 2774-2780
- 12) Goldfarb S & Pugh TD : *Enzyme histochemical phenotypes in primary hepatocellular carcinomas. Cancer Research* 1981 : 41 : 2092-2095
- 13) Goldfarb S, Pugh TD, Koen H, and He YZ : *Preneoplastic and neoplastic progression during hepatocarcinogenesis in mice injected with diethylnitrosamine in infancy. Environmental Health Perspectives* 1983 : 50 : 149-161
- 14) Reuber MD : *Development of preneoplastic and neoplastic lesions of the liver in male rats given 0.025 percent N-2-fluorenyldiacetamide. J Natl Cancer Inst* 1965 : 34 : 697-724
- 15) Schauer A & Kunze E : *Enzymhistochische und autoradiographische untersuchungen wahrend der Cancerisierung der Rattenleber mit diathylnitrosamin. Z Krebsforsch* 1968 : 70 : 252-266
- 16) Schmitz-Moormann P, Gedigk P, Dharamadhach A : *Histologische und histochemische fruhveranderungen bei der experimentellen erzeugung von lebercarcinomen durch diathylnitrosamin. Z Krebsforsch* 1972 : 77 : 9-16
- 17) Vesselinovitch SD and Mihailovich N : *Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. Cancer Research* 1983 : 43 : 4253-4259

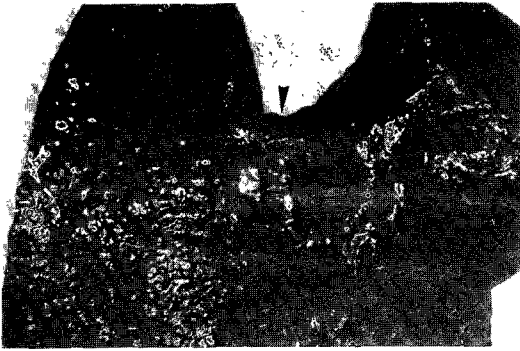


Fig. 1. Few small neoplastic nodules, GIII 16<sup>th</sup>wks.

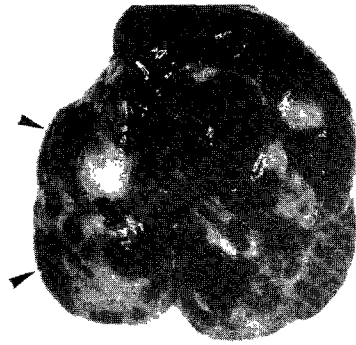


Fig. 2. Massive hepatocellular carcinoma, GIII 24<sup>th</sup>wks.

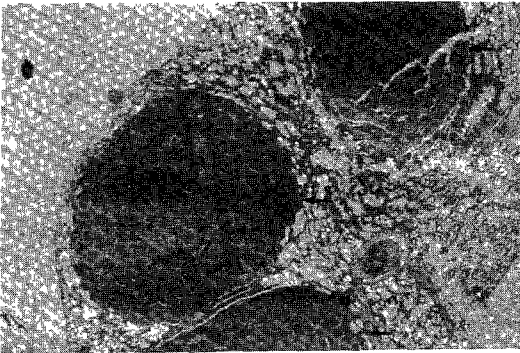


Fig. 3. Normal hepatocyte, GI 12<sup>th</sup>wks, H&E.

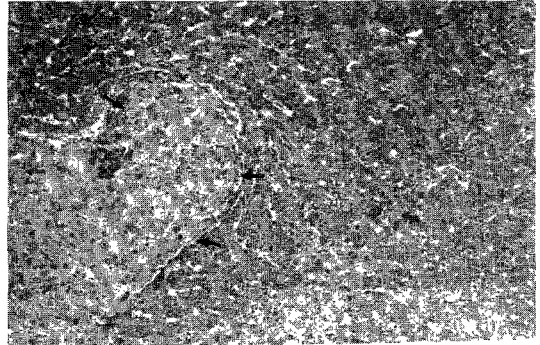


Fig. 4. Altered hepatocyte, eosinophilic cell, GII 14<sup>th</sup>wks, H&E.

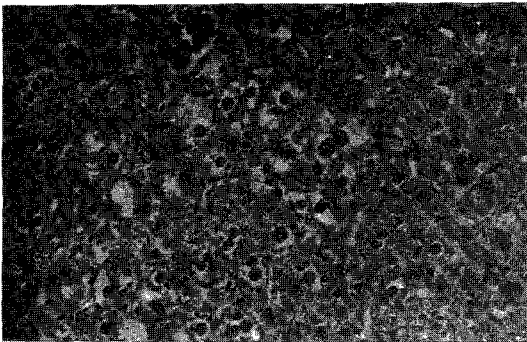


Fig. 5. Altered hepatocyte, glycogenotic cell, GII 12<sup>th</sup>wks, H&E.

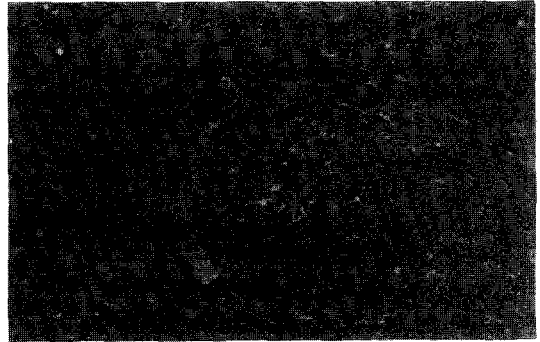


Fig. 6. Altered hepatocyte, basophilic cell, GIII 18<sup>th</sup>wks, H&E.

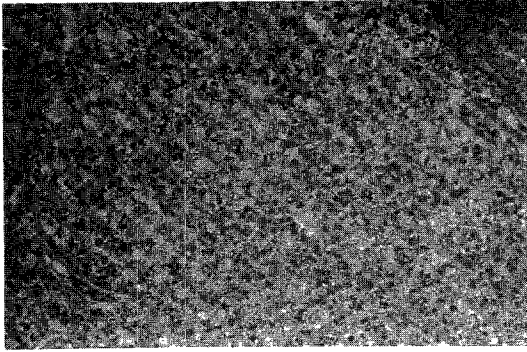


Fig. 7. Hepatocellular carcinoma, large cell type, GIII 20<sup>th</sup>wks, H&E.

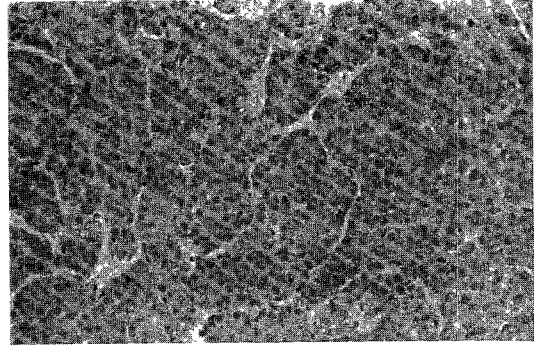


Fig. 8. Hepatocellular carcinoma, Trabecular type, GIII 26<sup>th</sup>wks, H&E.

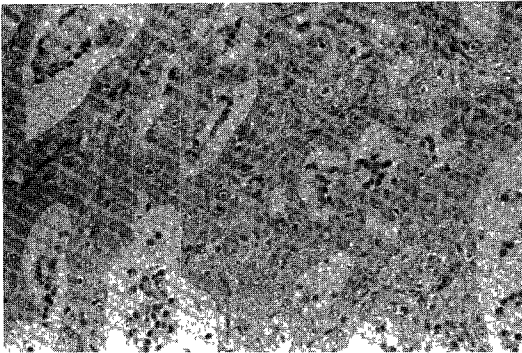


Fig. 9. Hepatocellular carcinoma, adenocarcinomatous type, GIII 28<sup>th</sup>wks, H&E.

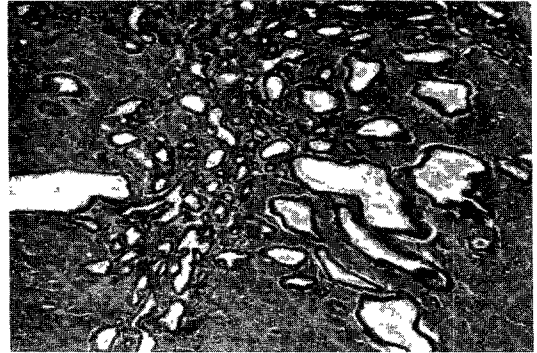


Fig. 10. Cholangiocarcinoma, GIII 28<sup>th</sup>wks, H&E.

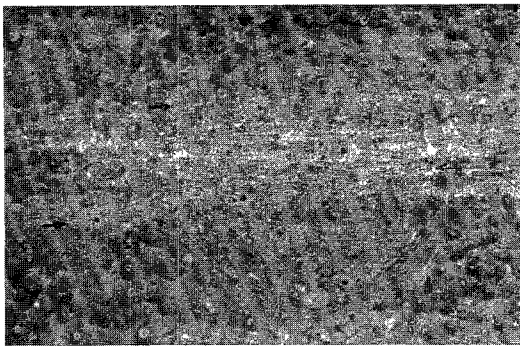


Fig. 11. Basophilic neoplastic nodule, GII 26<sup>th</sup>wks, PAS.

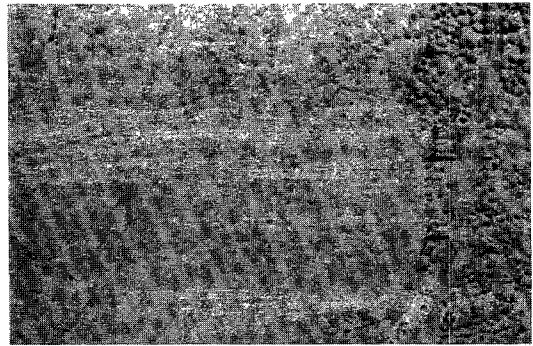


Fig. 12. Carcinomatous area, GIII 22<sup>th</sup>wks, PAS.

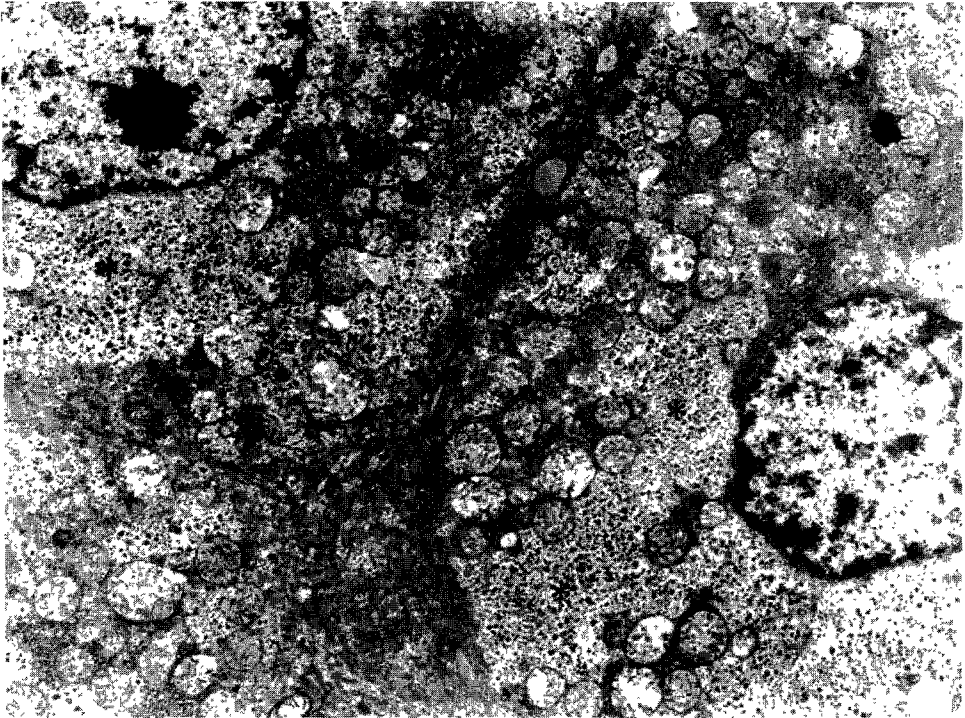


Fig. 13. Early glycogen accumulation, GII 14<sup>th</sup>wks, EM×5,950.

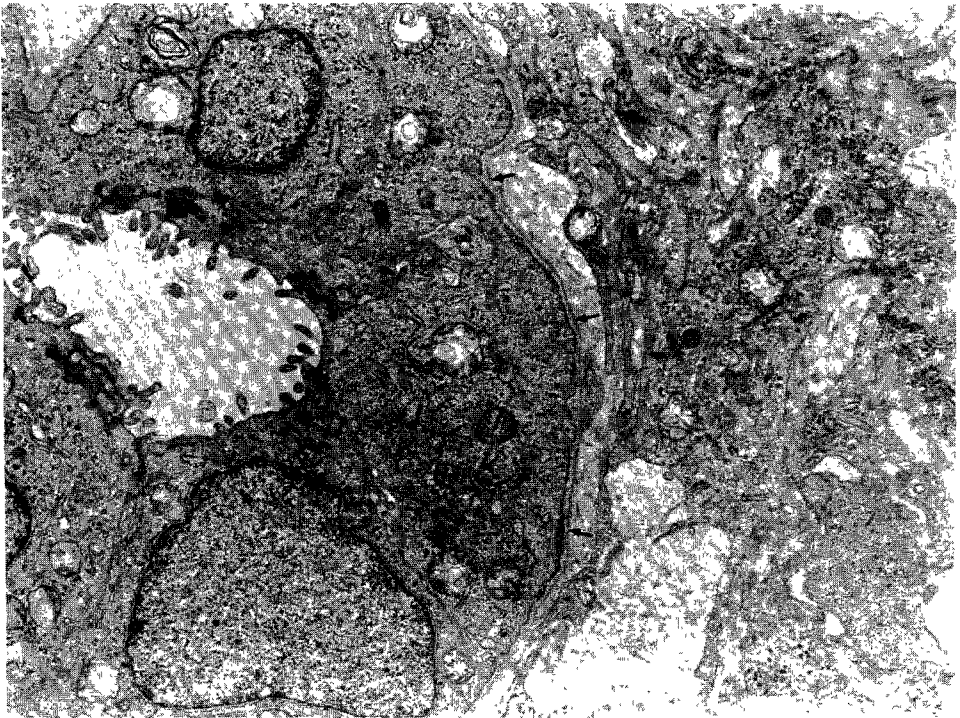


Fig. 14. Bile duct proliferation with atypicity, GIII 18<sup>th</sup>wks, EM×10,200.

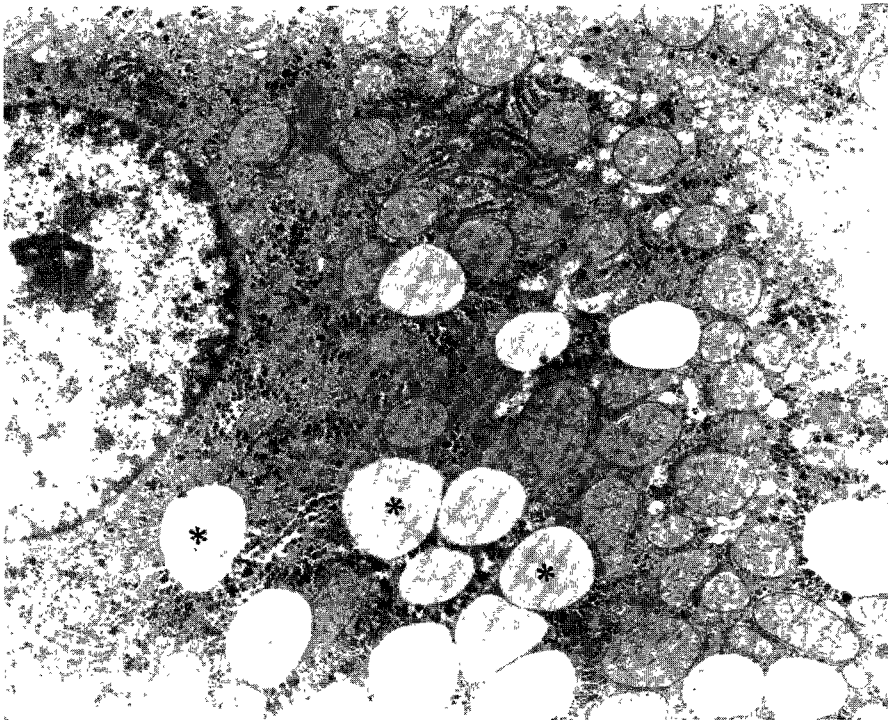


Fig. 15. Eosinophilic cells with numerous vacuoles. GII 20<sup>th</sup>wks, EM×10,200.

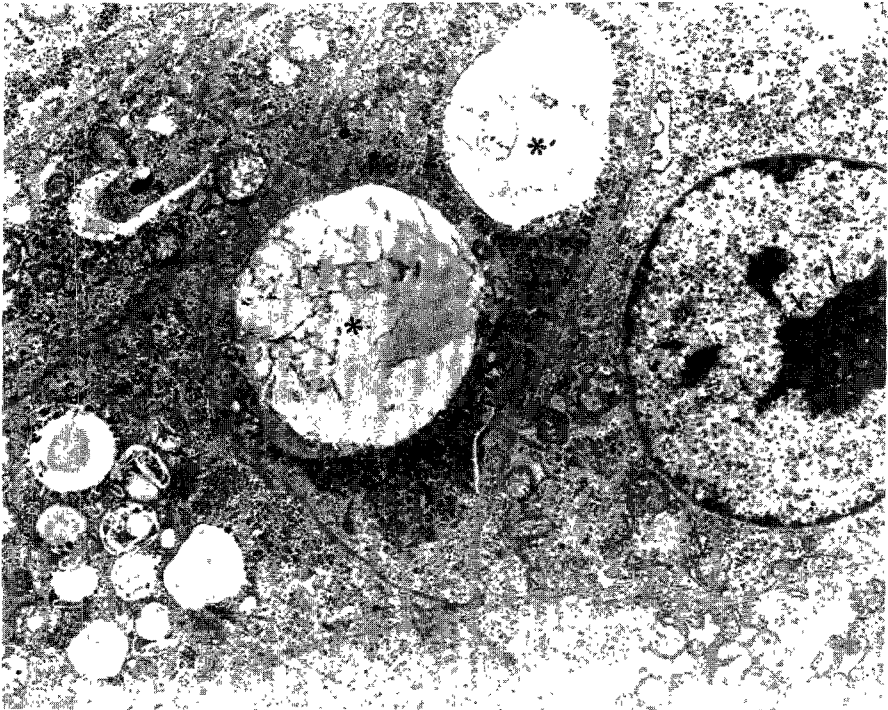


Fig. 16. Hepatocellular carcinoma cell abnormal nucleus and nucleolus, sparse mitochondria, vacuoles necrotic debris GIII 26<sup>th</sup>wks. EM×5,950.

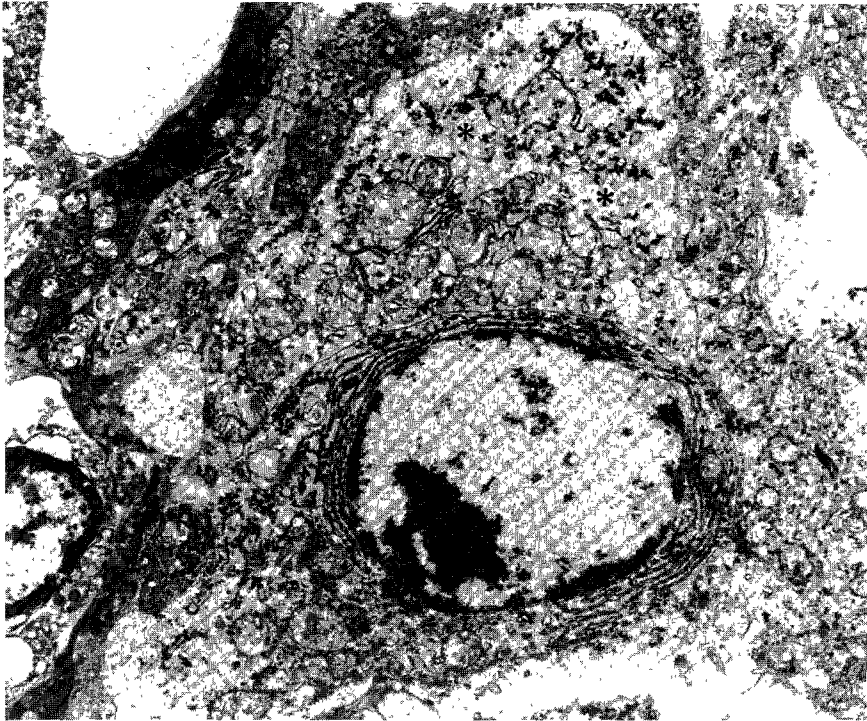


Fig. 17. Hepatocellular carcinoma cell, clear cell type, GIII 26<sup>th</sup>wks, EMX6,800.

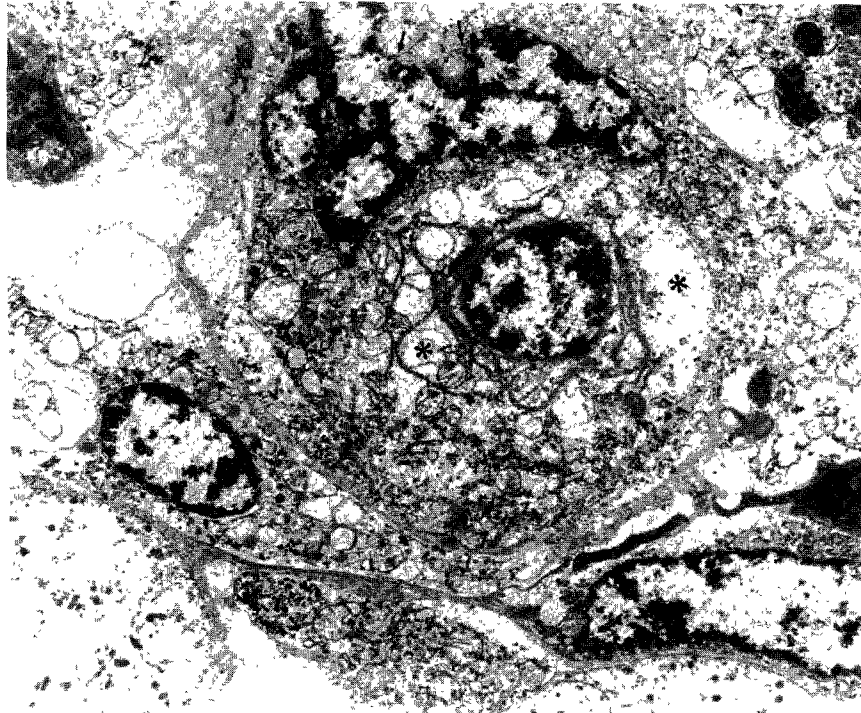


Fig. 18. Hepatocellular carcinoma cell, anaplastic clear cell type, GIII 28<sup>th</sup>wks, EMX5,950