

실험적 대장암 모델에서 키토산의 발암 억제효과에 관한 연구

한범석 · 김대중¹ · 안병우 · 김기석 · 강진석 · 문지영 · 홍충만 · 장동덕
국립독성연구소 일반독성부, ¹충북대학교 수의과대학

Chemopreventive Effects of Chitosan on Rat Colon Carcinogenesis Induced by Azoxymethane

Beom Seok Han, Dae Joong Kim,¹ Byeongwoo Ahn, Ki Sok Kim, Jin Seok Kang, Ji Young Moon, Choong Man Hong and Dong Deuk Jang

General Toxicology Department, National Institute of Toxicological Research
¹College of Veterinary Medicine, Chungbuk University

Abstract: This study was conducted to assess the chemopreventive effects of chitosan in a rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane (AOM). Ninety, 5-week-old, male F344 rats were divided into three groups. The animals in group 1 received subcutaneous injections of 15mg/kg AOM three times for two weeks, then were placed on powdered basal diet containing 2% chitosan for 37 weeks from weeks 3 to 40. The animals in group 2 were given AOM alone. The animals in group 3 were given 2% chitosan without prior carcinogen treatment. All animals were sacrificed at week 12 for quantitative analysis of aberrant crypt foci (ACF) and at week 40 for analysis of tumor induction. Total numbers of ACF and AC per colon of group 1 were not significantly different from those of group 2. Tumor incidences and multiplicities of small intestine in the group 1 were significantly decreased compared with those of the group 2 ($P < 0.05$). According to pathological diagnoses, adenocarcinoma incidence and multiplicity in the small and large intestine in the group 1 were significantly decreased compared with those of the group 2 ($p < 0.05$). No toxic effects were observed in animals given chitosan in terms of body weights, and liver or kidney histology. These results indicate that chitosan may have a potential as chemopreventive agents of colon carcinogenesis during the post-initiation stage.

Key words: chitosan, chemoprevention, colon carcinogenesis, azoxymethane.

서 론

대장암은 미국과 캐나다를 포함한 성인 남녀의 암 발병률 및 사망률의 주요원인이며, 최근 국내에서도 식생활양식의 서구화로 인하여 발병률이 급격히 증가하고 있다. 많은 역학 조사에서 대장암을 일으키는 주원인은 식이습관이며 고지방과 고칼로리 음식을 섭취시 발병률이 증가하고, 식이성 섬유나 야채를 섭취시 발병률이 감소한다고 보고되었다.^{1,2} 식품첨가물의 일종인 키토산은 아세틸화된 키틴으로 게나 새우, 바다가재, 곤충 같은 절지동물의 껍질에 있는 주요 성분이며 비수용성 물질이다.³ 키토산의 효능은 고밀도지단백(HDL)과 콜레스테롤을 증가시키며 혈중의 총 콜레스테롤을 저하시킨다.⁴ 그 외에도 성장지연효과,⁴ 담즙산의 변배출의 증가,^{5,6} 창상치유효과,⁷ 장내 미생물의 항균작용,⁸ 면역증강작용,^{9,10} 중금속 제거효과¹¹ 등이 있다. 키틴과 키토산은 암 예방효과가 있다고 보고되었는데, 키틴유도체는 Sarcoma 180 고형종을 이식한 ddY 마우스에서 성

장을 억제하고,¹² MM46 고형종을 이식한 C3H/He 마우스에서도 성장지연 효과가 있었다.¹³ 키틴은 세포의 기질성분으로 B16-BL-6 흑색종의 종양전이를 억제하는 효과도 있다.¹⁴ 최근에 키토산이 대장암 초기병변인 대장의 이상선화소(ACF)의 수를 감소시켜 대장암에 예방효과가 있음을 보고하였다.¹⁵

현재 설치류를 이용한 실험적 대장암 연구에서 대장암의 초기병변인 ACF와 종양발생률 및 마리당 종양발생수가 각종 시험물질의 예방효과를 검색하는 지표인자로 많이 사용되고 있다.¹⁶⁻¹⁹ ACF는 Bird가 처음으로 정량측정을 하였고,²⁰ 그 이후로 이를 이용한 많은 연구가 수행되고 있다. 또한 설치류의 ACF는 사람의 대장암 초기병변과 유사하여 인체의 대장암 예방에 중요한 지표인자로 주목되고 있다.²¹

이에 본 연구는 실험적 대장암 모델을 이용하여 대장암 전암단계 지표인자인 ACF와 종양발생률 및 마리당 종양발생수의 비교를 통하여 키토산의 대장 및 소장 에 대한 암 예방효과를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

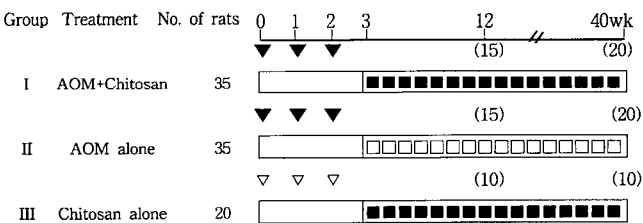
식품의약품 안전청 국립독성연구소 실험동물 자원실에서 생산한 F344계 수컷 랫드 90수를 사용하였다. 이들 랫드는 플라스틱 케이지에 5마리씩 넣어 사육하였고 실험기간 동안의 사육환경은 23±2°C, 상대습도 55±10%를 유지하고 인공조명(12시간점등, 12시간 소등) 하에서 사육하였으며 기초사료(CRF-1, Charles River Japan Inc. Co., Tokyo, Japan)와 정제수는 자유로이 급이하였다.

2. 실험 설계 및 시험 물질 투여

실험 동물은 fig. 1에서와 같이 3군으로 나누어 실험 1군과 2군을 35수씩, 실험 3군은 20수로 배치하였다. 실험 1군과 2군은 대장암 유발물질인 azoxymethane (AOM, Sigma Chemical Co. USA)을 체중 kg 당 15 mg으로 실험개시일로부터 2주간 3회 피하투여 하였다. 실험 1군과 실험 3군은 실험개시 3주부터 키토산폴리머(분자량: 250,000, Koyo Chemical Co, Japan)를 기초사료인 CRF-1 (Charles River Japan Inc. Co., Tokyo, Japan)에 2%의 농도로 섞어 9주 및 37주간 급이하였다. 실험 2군은 실험개시 3주부터 CRF-1 사료만 9주와 37주간 급이하였다. 부검은 실험개시 후 12주와 40주에 실시하였다. 모든 실험 동물은 부검 전 24시간 동안 절식시킨 다음 이산화탄소 마취 후 흉대동맥을 절단하여 방혈하고 부검을 실시하였다.

3. 병리조직학적 관찰

실험개시 후 12주와 40주에 각 군의 동물을 부검하여 전 장기를 육안적으로 검사하여 병변이 있는지의 여부를 관찰하였고, 대장을 적출하여 10%의 중성 완충 포르말린 용액으로 주입하여 고정한 다음 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하고 3-5 µm으로 박절하여 조직표본을 만든 후 H&E 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.



Animals : 6 week olds, male F344 rats
 Values in parenthesis are sacrificed animal number.
 AOM : Azoxymethane (15mg/kg bw, s.c., 3 times for 2 weeks)
 ▼ : AOM, ▽ : Saline
 ■■■ : 2% Chitosan in diet for 9 and 37 weeks in CRF-1 basal diet
 □□□ : CRF-1 basal diet.

Fig. 1. Protocol for rat colon carcinogenesis.

4. 대장의 이상선화소(ACF)와 이상선화(AC)의 측정

랫드 대장점막의 ACF와 AC는 Bird 등의²⁰ 방법에 준해서 염색을 실시한 후 관찰하였다. 실험개시 후 12 주에 부검한 대장조직을 생리식염수로 내강을 부풀리고 세척한 후, 결장부터 항문까지 장간막을 따라 절개하여 여과지에 대장조직을 펼쳐 10% 중성완충 포르말린에 고정하였다. 고정한 조직은 4 등분으로 나누어 0.2% 농도의 메틸렌블루 용액으로 1-2분간 처리하였다. 처리된 조직을 광학 현미경 (X40, X100)으로 관찰하여 대장의 ACF와 AC의 수를 측정하였다.

5. 자료의 통계처리

체중의 변화, 사료 소모량, ACF 및 AC의 수에 대한 유의성을 검정하기 위하여 Duncan's multiple range test로 통계처리 하였고, 대장과 소장 of 종양발생률과 마리당 종양발생수에 대하여는 Wilcoxon rank sum test로 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 체중의 변화

각 군에 있어서 실험기간 동안 측정된 체중의 변화는 Text-fig. 2와 같다. 체중은 시험기간이 경과할수록 점차적으로 증가하는 경향을 보이나 각 군간의 체중변화는 유의성이 없었다.

2. 사료소모량의 변화

실험기간 중에 측정된 사료소모량의 변화는 각 군간에 유의성이 관찰되지 않았다

3. 육안소견

실험 12주에 부검한 대장의 육안적 소견은 이상소견이 없었다. 실험 40주에 부검한 대장의 육안적 소견은 실험 1군과 실험 2군에서 대장과 소장에 크기가 다양한 원형 또는 타원

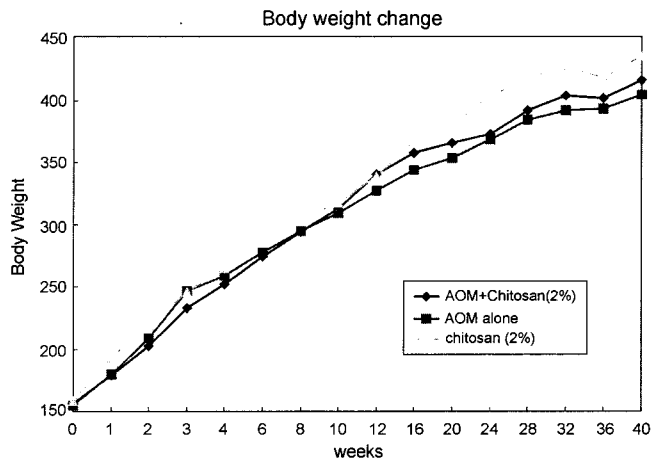


Fig. 2. Body weight curves of rats treated with AOM followed by chitosan.

Table 1. Data for body weight and food consumption

Treatments	No. of rats	Body weight (g)		Food consumption (g/100g b.w./day)
		Initial (0wk)	Final (40wk)	
AOM→Chitosan (2%)	35	156.5±6.3 ^a	416.3±41.1	4.35±0.94
AOM alone	35	154.5±10.9	404.1±52.6	4.12±0.93
Chitosan (2%)	20	158.1±7.9	434.8±26.7	4.63±1.00

a: mean±SD.

형의 황백색 또는 적색조의 종괴들이 근위결장부위와 원위결장부위의 장점막면이나 장막면으로 돌출되어 있고, 이러한 종괴로 인하여 장중첩의 소견이 관찰되었으며 십이지장 상부의 종괴는 총담관 개구부를 막아 총담관이 확장된 예도 관찰되었다.

4. 대장 이상선와소 (ACF) 및 이상선와 (AC)의 변화

실험 12주에 부검하여 관찰한 ACF와 AC의 수는 각 군간에 유의성은 없었다 (table 2).

5. 종양발생률 및 종양발생 수

실험 40주에 부검한 소장과 대장의 종양발생률(tumor incidence) 및 마리당 종양발생수(tumor multiplicity)는 table 3과 같다. 대장의 종양발생률은 AOM과 키토산 투여군에서 95%, AOM 단독투여군에서 100%가 발생하였다. 소장의 종양발생률과 마리당 종양발생수는 AOM과 키토산을 투여한 군이 AOM 단독투여군에 비하여 유의성있게 감소하였다 (P<0.01). 종양분류에 따른 소장과 대장의 선종과 선암종의 종양발생률 및 마리당 종양 발생수는 Table 4와 같다. 대장과 소장 선암종의 종양 발생률과 마리당 종양 발생수는 AOM과 키토산을 투여한 군이 AOM 단독투여군에 비하여 유의성있게 감소하였다 (P<0.05).

Table 2. Effects of chitosan on induction of ACF and AC

Treatments	No. of rats	Aberrant crypts(AC)		Total ACF/colon	Total AC/colon
		∑≤3AC	∑≥4AC		
AOM→Chitosan(2%)	15	191.7±49.0	78.7±25.0	269.7±66.3	769.5±196.9
AOM alone	15	229.6±63.0	67.6±17.7	297.3±74.1	783.9±201.4
Chitosan (2%)	10	0	0	0	0

Data are mean±SD.

ACF: Aberrant crypt foci of colonic mucosa. AC : Aberrant crypt per ACF.

Table 3. Effects of chitosan on tumor incidence and multiplicity in the small and large intestine induced by azoxymethane

Treatments	No. of rats	Tumor incidence		Tumor multiplicity		
		small	large	small	large	total
AOM→Chitosan (2%)	20	02(10)**	19(95)	0.10±0.07 ^{a,**}	2.70±0.31	2.80±0.30
AOM alone	20	10(50)	20(100)	0.70±0.19	2.15±0.29	2.85±0.34
Chitosan (2%)	10	0	0	0	0	0

Values in parenthesis are percentages.

^a: Mean±SE.

** : Significantly different from the values of the AOM alone group at P<0.01.

Table 4. Effects of chitosan on incidence and multiplicity of adenoma and adenocarcinoma induced by azoxymethane

Treatments/organ	No. of rats	Incidences		Multiplicity	
		AD	ADC	AD	ADC
Small intestine					
AOM+2% chitosan	20	0(0)	2(10)*	0	0.10±0.07 ^{a,*}
AOM+basal diet	20	2(10)	8(40)	0.10±0.07	0.45±0.11
Large intestine					
AOM+2% chitosan	20	18(90)	2(10)*	2.15±0.33	0.10±0.07*
AOM+basal diet	20	12(60)	8(40)	1.40±0.22	0.45±0.14

AD: adenoma, ADC: adenocarcinoma.

Values in parentheses are percentages.

^a: Mean±SE.

*: Significantly different from the value of the AOM alone group at p<0.05.

6. 병리조직학적 소견

실험개시 12주에 관찰한 대장이상선화소는 1개부터 10개 이상의 대장이상선화가 집단으로 모여 상행결장 하단부와 하행결장 상단부에 많이 분포되어 있었다. 이들은 정상선화보다 크기가 크고 내강이 타원형 또는 고양이 눈처럼 가늘고 길게 보이며, 선화주위부(pericryptal zone)가 정상보다 넓다. 실험개시 40주에 관찰한 대장종양의 조직학적 소견은 다음과 같다. 대장의 상행결장부위에 림프조직이 과형성되어 정상점막근층을 뚫고 선화조직으로 침입한 소견이 관찰되었다. 육안적으로 작은 폴립으로 관찰되는 선종의 경우는 정상선화에 비하여 비교적 형태가 불규칙한 편이고 선화상피세포는 증첩되어 있으며 경(stalk)이 관찰되었고, 경에는 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 선암종의 선화들은 선종보다 내강이 더 불규칙하며 핵 유사분열이 많이 관찰되었다. 종양세포들은 점막근층을 뚫고 침입하며 심한 경우는 장막층으로 돌출되는 소견도 관찰되었다. 일부 선암종의 경우 점액을 다량 함유하고 있는 소견도 관찰되며 반지고리 모양의 세포(signet-ring cell)들이 국소적으로 밀집된 소견도 관찰되었다. 소장외의 경우는 대장의 선종 및 선암종과 조직학적 소견이 유사하나 일부 선암종의 경우 외장성으로 돌출한 종양조직의 경부위에 호산성세포가 다량 침윤되어 있으며 유골(osteoid)조직이 결합조직 주위에 관찰되기도 하였다.

고 찰

본 연구에서 키토산은 랫드의 실험적 대장암 모델에서, 소장에서는 종양 발생률과 마리당 종양발생수 및 소장 선암종의 종양 발생률과 마리당 종양 발생수를 유의성 있게 감소시켜 소장암 억제 효과가 있었다. 또한 대장에서는 키토산이 대장의 선암종의 종양발생률과 마리당 종양 발생수를 유의하게 감소시켜 양성종양이 악성종양으로 진행하는 것을 감소시키는 효과가 있었다.

많은 역학조사에서 고섬유질 식품이 암 발생을 감소시키며 식물성 섬유가 실험적 대장암 모델에서 예방효과가 있다고 보고하였다.²²⁻²⁴ 동물성 섬유의 일종인 식이성 키토산은 AOM으로 유발한 대장암에서 대장점막을 보호하는 효과가 있다. 키토산은 대장암의 초기단계병변인 ACF 및 세포증식능을 감소시키는데,¹⁵ 이에 대한 기전은 아직 확실하지 않다. 아마도 키토산은 식물성 섬유와 유사한 기전으로 작용하리라고 생각된다. 즉 유전독성물질이나 유사분열물질의 희석, 유해한 담즙산의 흡착, 미생물 효소활성의 변화가 그 원인으로 생각된다. 식이성 섬유는 수분의 저류와 대변용량을 증가시켜 대장내강에 유전독성물질이나 유사분열 물질들의 농도를 희석시켜 대장점막과 접촉기간을 단축시킨다.²⁴ 사람에서 식이성 섬유의 섭취가 대장암에 예방효과가 있는 것은 이러한 이유에서이다. 분자량이 20,000 이나 50,000 정도 되는 키토산은 대

변량을 증가시켜 장점막의 종양성변화를 촉진시키는 물질들을 희석화 시킨다고 생각한다.¹⁵

키토산의 대장암 예방기전으로 생각할 수 있는 다른 사실은 담즙산과의 결합능력이다. 담즙산은 중요한 발암촉진인자로 ornithine decarboxylase를 활성화시키고 세포증식능을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.^{25,26} 인체의 대장암에 대한 연구로 대장암환자는 건강한 사람에 비하여 이차 담즙산을 많이 배출하며 7 α -dehydroxylase를 갖고 있는 미생물들을 보호한다.²⁷ 이 미생물들에 있는 7 α -dehydroxylase는 cholic acid나 chenodeoxycholic acid와 같은 일차담즙산을 deoxycholic acid나 lithocholic acid와 같은 이차담즙산으로 전환시킨다.^{28,29} 생체내 실험에서 이차담즙산은 점막상피의 polyamine을 합성함으로 세포증식능을 촉진시킨다.^{30,31} 또한 이차담즙산은 대장점막에서 phosphatidylinositol-phospholipase C(PI-PLC)와 diacylglycerol 및 protein kinase C(PKC)를 활성화시켜 세포증식능을 촉진시키고, 악성종양으로의 진행을 가속화시킨다.^{32,33} 키토산은 미생물에서 배출되는 7 α -dehydroxylase의 양을 조절하거나, 담즙산을 흡착함으로 담즙산의 농도를 효과적으로 감소시켜 유해한 물질과 대장점막간의 접촉을 제한함으로 대장암의 발생을 감소시키는 것으로 추정된다.

대장암 예방기전의 또 다른 하나는 장내세균총의 변화이다. 고지방이나 고단백 음식을 섭취시 이것이 소화액성분과 섞여 소화관내 대사과정에서 장내세균에 의하여 각종발암물질로 변화되어 암을 촉진하거나, 반대로 생성된 발암물질을 무독화시키거나 숙주의 면역기능을 증강함으로써 암을 억제시킨다.³⁴ 지금까지 장내세균과 관련된 중요한 발암효소들은 azoreductase, β -reductase, nitroreductase로서 주로 장내부패균들에 의해 생산되고 있다. 이들은 결장암 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며 암 발생과 관련이 있는 식품을 탐색하는 지표로 많이 이용되고 있다.^{35,36} Goldin은 살아있는 *L. acidophilus*의 투여로 1,2-dimethylhydrazine(DMH)에 의한 랫드의 결장암 유발기간이 연장된다고 보고하였다.³⁷ Schkelford는 결장암을 유발시킨 랫드에 발효유를 급이하였을 때 생존수명이 대조군에 비하여 현저히 연장된다고 하였다.³⁸ 이러한 결과들은 결장암의 발생이 대장균과 같은 유해균들에 의해 촉진되거나 *Lactobacillus*나 *Bifidobacterium*과 같은 유산균들에 의해서는 억제될 수 있음을 시사한다. 키토산은 이러한 유해한 장내세균총을 감소시킴으로 대장암 예방효과가 있을 것으로 추정한다. 그러나 고농도의 키토산을 장기복용하면 오히려 대장암 예방효과가 있는 *Lactobacillus*나 *Bifidobacterium*과 같은 유산균들의 수를 감소시켜 대장암의 촉진효과를 일으킬 수도 있다.³⁹

키토산의 중요한 효능중의 하나는 면역기능의 증가이다. 70% 탈아세틸화된 키토산은 순환항체의 생산을 촉진시키고, 지연된 과민반응을 유도하고, helper T 세포의 기능을 증가시키며 cytotoxic T 세포와 자연살해세포(NK cell)의 생성을 촉진시

킨다.^{40,41} 그리고 cytotoxic 대식세포를 유도하고 대장균 감염에 대한 숙주의 저항능력을 증가시킨다.⁴² 본 실험에서 관찰된 키토산이 대장암에서 양성종양의 악성종양으로의 진행과정을 억제한 사실은 아마도 지속적인 키토산 투여에 의한 면역기능의 증가가 그 원인의 일부일 것으로 추정한다.

본 실험에서는 키토산이 ACF와 AC의 수에 영향을 미치지 않은 반면에 대장암에서는 억제효과가 있었다. 이는 ACF와 종양발생간의 상관관계가 반드시 일치하지는 않는다는 사실을 말해준다. 대장암종양발생과정에서 일부 ACF와 종양간의 상관성이 일치하지 않는 보고가 있다.⁴³ 또한 ACF의 발생부위와 종양의 발생부위의 상관성은 없다는 보고도 있다.⁴⁴ 게다가 마우스의 경우 종간의 종양발생의 감수성의 차이는 ACF의 수와 일치하지 않는다는 보고도 있다.⁴⁵ 따라서 ACF와 종양발생간의 상관성의 여부는 좀더 연구해야할 과제이다.

본 연구에서 AOM 투여에 의한 실험적 대장암모델에서 효과적인 종양발생의 관찰시점은 실험기간을 40주로 설정함이 좋은 것으로 나타났다. 키토산의 소장발암억제효과와 대장 악성종양의 감소효과는 그 기전이 확실하지 않으므로 추후에 더 연구해야 할 것이다. 본 연구에서 키토산을 올리고당이 아닌 분자량이 높은(M.W: 250,000) 키토산 중합체를 사용하였는데 그 이유는 키토산의 주 기전이 담즙산과의 결합능력일 것으로 추정되어 체내로 많이 흡수되는 올리고당을 사용하지 않았다. 그러나 현재 국내에서 시판되는 키토산은 주로 올리고당이므로 이에 대한 추가실험을 계속 수행하여야 한다고 생각한다.

References

1. Armstrong B and Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special references to dietary practices. *Int. J. Cancer* **15**: 617-631, 1975.
2. Bigham SA, Willams DRR, et al. Dietary fiber consumption in Britain: new estimates and their relation to large bowel cancer mortality. *Br. J. Cancer* **52**: 399-402, 1985.
3. Furda I. Aminopolysaccharide-their potential as dietary fiber: unconventional sources of dietary fiber. *Am. Chem. Soc. Symp.* **214**: 105-122, 1983.
4. Sugano M, Fujikawa T, et al. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**: 787-793, 1980.
5. Ikeda I, Sugano M, et al. Effects of chitosan hydrosylates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentrations in rats. *J. Agri. Food Chem.* **41**: 431-435, 1993.
6. Maezaki Y, Tsuji K, et al. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci. Biochem.* **57**: 1439-1444, 1993.
7. Okamoto Y, Shibazaki K, et al. Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **57**: 851-854, 1995.
8. Muzarelli R, Tarsi R, et al. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicro. Agricul. Chemotherapy* **34**: 2019-2023, 1990.

9. Maeda M, Murakami H, et al. Stimulation of IgM production in human-human hybridoma HB4C5 cells by chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 427-431, 1992.
10. Matsumoto T, Ohno Y, et al. Effect of longterm oral administration of chitin partially degraded chitin and N-acetyl chitooligosaccharide on immunological and blood enzyme levels in aged mice. *Chitin Chitosan Research, Proceedings of the 10th Symposium, Japanese Society for Chitin and Chitosan(abstract A3)*, **2**: 94-95, 1996.
11. Ishii H, Minegishi M, et al. Synthesis of chitosan-amino acid conjugates and their use in heavy metal uptake. *Int. J. Biol. Macromol.* **17**: 21-23, 1995.
12. Suzuki K, Mikami T, et al. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohehexose and chitohehexose. *Carbohydr. Res.* **51**: 403-408, 1986.
13. Nishimura K, Nishimura S, et al. Adjuvant activity of chitin derivatives in mice and guinea pigs. *Vaccine* **3**: 379-384, 1985.
14. Saiki I, Murata J., et al. Inhibition by sulfated chitin derivativs of invasion through extracellular matrix and enzymatic degradation by metastatic melanoma cells. *Cancer Res.* **50**: 3631-3637, 1990.
15. Torzsas TL., Kendall CWC, et al. The influence of high and low molecular weight chitosan on colonic cell proliferation and aberrant crypt foci development in CF1 mice. *Food Chem. Toxicol.* **34**: 73-77, 1996.
16. Kawamori T, Tanaka T, et al. Inhibitory effects of d-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis* **17**: 369-372, 1996.
17. Pereira MA, Barnes LH, et al. Piroxicam-induced regression of azoxymethane -induced aberrant crypt foci and prevention of colon cancer in rats. *Carcinogenesis* **17**: 373-376, 1996.
18. Sekine, K, Watanabe, E, et al. Inhibition of azoxymethane-initiated colon tumor by bovine lactoferrin administration in F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.* **88**: 523-526, 1997.
19. Kim DJ, Kang JS, et al. Chemopreventive effects of 2-(allylthio)pyrazine on rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane. *Cancer Lett.* **166**(2): 125-33, 2001.
20. Bird PR. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary finding. *Cancer Lett.* **37**: 147-151, 1987.
21. Pretlow, TP, Barrow, BJ, et al. Aberrant crypts: putative pre-neoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.* **51**: 1564-1567, 1991.
22. Slatar TF and Block G. Antioxidant vitamins and β -carotene in disease prevention. *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**: 389s-396s, 1991.
23. Burkitt D. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* **28**: 3-13, 1971.
24. Klurfeld DM. Dietary fiber mediated mechanisms in carcinogenesis. *Cancer Res.* **52**: 2055s-2059s, 1992.
25. Reddy BS, Sharma C, et al. Metabolic epidemiology of colon cancer: effect of dietary fiber on fecal mutagens and bile acids in healthy subjects. *Cancer Res.* **47**: 644-648, 1987.
26. Tempero M. Bile acids, ornithine decarboxylase, and cell proliferation in colon cancer: a review. *Digest. Dis.*, **4**: 49-56, 1986.
27. Hill MJ, Drasar BS, et al. Fecal bile acids and clostridia in

- patients with cancer of the large bowel. *Lancet* **1**: 535-538, 1975.
28. Reddy BS, Watanabe K, et al. Promoting effect of bile acids in colon carcinogenesis in germ-free and conventional F344 rats. *Cancer Res.*, **37**: 3238-3242, 1977.
 29. Bresalier RS and Kim YS. Diet and colon cancer. *N. Eng. J. Med.*, **313**: 1413-1414, 1985.
 30. Craven RA, Pfanstiel J, et al. Role of activation of protein kinase C in the stimulation of colonic epithelial proliferation and reactive oxygen formation by bile acids. *J. Clin. Invest.* **79**: 532-541, 1987.
 31. Wargovich MJ, Eng VWS, et al. Calcium ameliorates the toxic effect of deoxycholic acid on colonic epithelium. *Carcinogenesis* **4**: 1205-1207, 1983.
 32. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**: 639-698, 1984.
 33. Weinstein BI. Cancer prevention: recent progress and future opportunities. *Cancer Res.* **21**: 5080s-5085s, 1991.
 34. Laquer GL, Matsumoto H, et al. Comparison of the carcinogenicity of methylazoxymethanol- β -D-glucosidation aid in conventional and germ-free Sprague-Dawley rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **67**: 1053-1055, 1981.
 35. Goldin BR, and Gorbach SL. The relationship between diet and rat fecal bacterial enzyme implicated in colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **57**: 371-375, 1976.
 36. Goldin BR and Gorbach SL. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, lactobacillus supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer* **40**: 2421-2426, 1977.
 37. Goldin BR, and Gorbach SL. Effect of Lactobacillus acidophilus dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **64**: 263-265, 1980.
 38. Shackelford LA, Rao CR, et al. Effect of feeding fermented milk on the incidence of chemically induced colon tumors in rats. *Nutr. Cancer* **5**: 159-164, 1983.
 39. Tanaka Y, Tanioka S, et al. Effect of chitin and chitosan particles on BALB/c mice by oral and parenteral administration. *Biomaterials* **18**: 591-595, 1977.
 40. Nishimura K, Nishimura S, et al. Immunologic activity of chitin derivatives in mice and guinea pigs. *Vaccine* **3**: 379-384, 1985.
 41. Nishimura K, Nishimura S, et al. Immunologic activity of chitin and its derivatives, *Vaccine* **2**: 93-99, 1984.
 42. Koide SS. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutr. Res.* **18**: 1091-1101, 1998.
 43. Takahashi T, Ogawa K, et al. Induction of aberrant crypt foci in the large intestine of F344 rats by oral administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol-pyridine. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**: 135-137, 1991.
 44. Cameron IL, Garza J, et al. Distribution of lymphoid nodules, aberrant crypt foci and tumors in the colon of carcinogen-treated rats. *Br. J. Cancer* **73**: 893-898, 1996.
 45. Moen CJA, Van der Valk MA, et al. Different genetic susceptibility to aberrant crypt and colon adenomas in mice. *Cancer Res.* **56**: 2382-2386, 1996.