

# ハムスターにおける膵細胞増殖能を指標とした 膵発癌物質の検索

奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室

天 沼 利 宏

## DETECTION OF PANCREATIC DUCTAL CARCINOGENS BY MEASURING DUCTAL CELL PROLIFERATION AS AN INDICATOR IN HAMSTERS

TOSHIHIRO AMANUMA

*Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University*

Received February 4, 1999

*Abstract*: Since a high incidence of pancreatic ductal carcinomas can be obtained within only 10 weeks by repeated "augmentation pressure" treatment in a rapid production model for hamsters, chemically initiated cell populations are believed to have proliferative advantage. Based on this hypothesis, I studied the 5-bromo-deoxyuridine (BrdU) labeling index (LI), as an indicator of cell proliferation during "augmentation pressure". I also studied the effects of several non-pancreatic carcinogens on cell proliferation in this experimental system to screen their possible contribution to pancreatic carcinogenesis. The results were as follows:

- 1) In control groups without initiation, LI of pancreatic ductal cells increased slightly during augmentation pressure, with a peak being observed 16 days after the study commencement.
- 2) Among pancreatic ductal carcinogens in hamsters, carcinogenic doses of both N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine or N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)-amine clearly amplified the increase of LI in main pancreatic duct cells. However, N-methyl-N-nitrosourea, administered below a carcinogenic dose, had no effect.
- 3) Both azaserine and 4-hydroxyaminoquinoline, pancreatic acinar cell carcinogens, also amplified the increase of LI in main duct cells.
- 4) Among non-pancreatic carcinogens, diethylnitrosamine, dimethylnitrosamine, and 3-amino-1, 4-dimethyl-5 H-pyrido(4, 3-b)indole amplified the increase of LI in main duct cells, while N-methyl-N-nitroso-N'-nitrosoguanidine and benzo(a)pyrene had no effect.

These results suggest that initiated cell populations selectively proliferate during "augmentation pressure" and that quantification of cell proliferation under this experimental system is a useful marker to detect pancreatic ductal carcinogens within a short period. Also our data show possible risk of several carcinogens regarding pancreatic ductal neoplasia through increasing proliferation of target cell populations.

(*奈医誌*. J. Nara Med. Ass. **50**, 74~86, 1999)

---

**Key words** : hamster, pancreas, ductal carcinoma, carcinogens, cell proliferation

## 緒 言

ヒトの膵癌は近年の診断技術の進歩にも拘わらず、膵の位置する解剖学的特異性より早期発見は困難でその切除率は低く、代表的な予後不良の癌である。我が国における平成3年度の全癌における死亡順位をみると、男性では膵癌は胃、肺、肝と大腸の癌に次いで第5位となっている<sup>1)</sup>。膵癌に関する疫学的研究において、その危険因子としての職業性と地域性は否定的で、わずかに好発年齢が60才台、性差にて男性は女性よりその発生頻度が高く、喫煙と西洋風高脂肪食が指摘されているのみで<sup>2,3)</sup>、膵癌特異的危険因子の報告はない。一般に癌の発生要因としての環境化学物質の関与は強く指摘され<sup>4)</sup>、環境中の発癌物質の発見と除去は癌の発生予防に貢献する研究である。本研究の目的は上述の観点から、膵癌発生に関与する化学物質を短期間に検索しうる系を確立することにある。

ヒト膵癌で最も高頻度かつ悪性度の高い膵管癌の実験系としては、ニトロソアミン投与によるハムスター膵癌発生系がある<sup>5)</sup>。ハムスター膵管癌は組織学的にも<sup>6)</sup>、また遺伝子異常の点でも<sup>7-9)</sup>、ヒト膵管癌に類似しており、膵発癌要因の検索はハムスター膵癌発生系を用いてなされる必要がある。しかし従来の発癌実験系においては癌の発生に長期間を要する事より、短期間で膵癌を発生させ得る実験系の開発が望まれていた。Mizumoto<sup>9-11)</sup>らは、ラットの肝発癌系で明らかにされた化学物質でイニシエートされた細胞は化学物質に抵抗性を示す理論<sup>12-13)</sup>を膵癌発生系に応用し、短期に膵癌を発生させうる系を確立した。即ち、シリアンハムスターに体重kgあたり70mgのN-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)でイニシエーションした後、コリン欠乏食とDL-methionineの投与により急性膵腺房細胞障害を惹起し、L-methionine投与でこれを回復させ、体重kgあたり20mgのBOPを投与してイニシエートされていない細胞群の増殖を抑制し、イニシエートされた細胞群を選択的に増殖せしめる一連の操作(augmentation pressure)を行うことにより、約80%のハムスターにわずか10週間で膵管癌を発生させる事に成功した。本研究は、この実験系にてBOPによりイニシエートされた細胞群がaugmentation pressureにより選択的増殖へと導かれている事実に注目し、BOPの代りにイニシエーション操作として種々の被験物質を投与することにより、それら物質の膵管上皮細胞のイニシエーション活性を5-bromo-deoxyuridine(BrdU)の取り込みで判定して膵発癌物質の検出を試みた。

## 材料および方法

### 1. 化学物質

被験物質であるBOP, N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine(BHP), N-methyl-N-nitrosourea(MNU), diethylnitrosamine(DEN), dimethylnitrosamine(DMN), N-methyl-N-nitroso-N'-nitrosoguanidine(MNNG), およびbenzo(a)pyrene(B(a)P)はナカライテスク株式会社(京都)より入手し、4-hydroxyaminoquinoline-oxide(4-HAQO)は東京化成工業(東京), azaserineはSigma Chemical Company(St. Louis, U.S.A.)より購入した。3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-1)は国立がんセンター研究所若林敬二博士より供給頂いた。

他に試薬としてdimethylsulfoxide(DMSO), diaminobenzidine・4HCl(DAB), DL-ethionine, L-methionine, およびBrdUをナカライテスク株式会社(京都)より購入して用いた。

### 2. 実験プロトコール

動物は、6週齢の雌シリアンハムスター(日本SLC株式会社, 浜松)を用いた。動物はプラスチックケージに收容し、CE-2基礎飼料(日本クレア株式会社, 東京)および水道水を自由摂取させ飼育した。

実験は図1に示すスケジュールに従い、2回に分けて行った。各被験物質の投与量、投与溶媒、投与経路は表1に示した。実験Iの群は、第1群は生理食塩水を投与した対照群、第2群は体重kgあたり20mgのBOP投与群、第3群は体重kgあたり70mgのBOP投与群、第4群は体重kgあたり50mgのDEN投与群、第5群は体重kgあたり120mgのazaserine投与群とした。実験IIでは、第1群はコーン油を投与した対照群、第2群は体重kgあたり70mgのBOP投与群、第3群は体重kgあたり500mgのBHP投与群、第4群は体重kgあたり20mgのMNU投与群、第5群は体重kgあたり5mgの4-HAQO投与群、第6群は体重kgあたり20mgのDMN投与群、第7群は体重kgあたり100mgのMNNG投与群とし、第8群は体重kgあたり200mgのB(a)P投与群、第9群は体重kgあたり100mgのTrp-P-1投与群とした。各発癌物質の投与量は表1に示す発癌性および毒性に関する文献<sup>5,14-28)</sup>を参考に、本実験条件下で死亡を生じず、イニシエーション活性の検討可能な用量として設定した。BOP, BHP, Azaserine, DENおよびDMNは生理食塩水に、B(a)PおよびTrp-P-1はコーン油に、MNNGはDMSOに、MNUはpH6.0

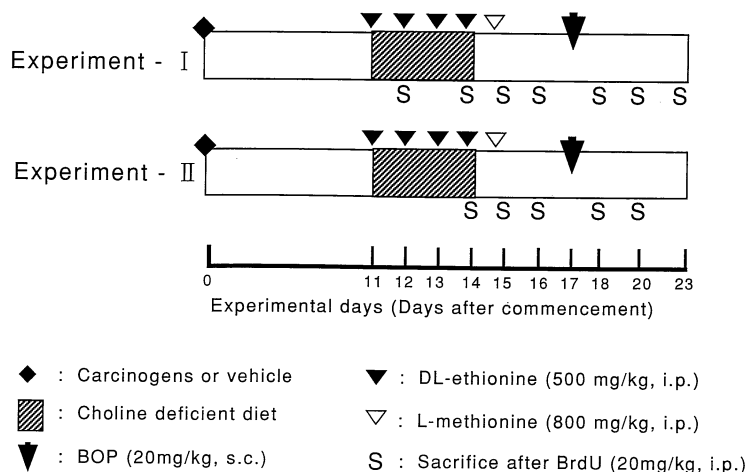


Fig. 1. Experimental protocol

Table 1. Information for carcinogenicity of compounds or vehicles used in this study

Experiment & group No.	Compounds or vehicles	Dose (mg/kg)	Route	Information about carcinogenicity	
I	1	Saline	5 ml/kg	Subcutaneously	No carcinogenicity
	2	BOP	20	Subcutaneously	Pancreatic ductal carcinogen in hamsters <sup>5,14-15)</sup>
	3	BOP	70	Subcutaneously	Pancreatic ductal carcinogen in hamsters <sup>5,14-15)</sup>
	4	DEN	50	Intra-peritoneally	Liver and upper-respiratory carcinogen in hamsters <sup>16)</sup> (2 mg/animal/week × 7 months, intra-peritoneally)
	5	Azaserine	120	Intra-peritoneally	Pancreatic acinar cell carcinogen in rats <sup>17)</sup> (25 mg/kg × twice/week × 6 weeks)
II	1	Corn oil	5 ml/kg	Intra-gastrically	No carcinogenicity
	2	BOP	70	Subcutaneously	Pancreatic ductal carcinogen in hamsters <sup>5,14-15)</sup>
	3	BHP	500	Subcutaneously	Pancreatic ductal carcinogen in hamsters <sup>18-19)</sup> (500 mg/kg/week × 5 weeks, subcutaneously)
	4	MNU	20	Intra-peritoneally	Pancreatic ductal carcinogen in hamsters <sup>20)</sup> (50 mg/kg × 1 or 10 mg/kg × 5, intra-peritoneally)
	5	4-HAQO	5	Intra-venously	Pancreatic acinar cell carcinogen in rats <sup>21-22)</sup> (7 mg/kg, intra-venously)
	6	DMN	20	Intra-gastrically	Liver carcinogen in hamsters <sup>23)</sup> (cholangiocarcinoma and hemaogiosarcoma were induced, 2 mg, intra-gastrically) Oral LD <sub>50</sub> in rats ≒ 40 mg/kg <sup>23)</sup>
	7	MNNG	100	Intra-gastrically	Gastric carcinogen in rats <sup>24)</sup> (150-250 mg/kg, intra-gastrically) Induction of sarcoma was reported in hamsters <sup>25)</sup> (150-200 mg/kg, intra-gastrically)
	8	B(a)P	200	Intra-gastrically	Respiratory carcinogen in hamsters <sup>26)</sup>
	9	Trp-P-1	100	Intra-gastrically	Liver carcinogen in rats and mice <sup>27)</sup> Oral LD <sub>50</sub> in hamsters ≒ 200-380 mg/kg <sup>28)</sup>

Table 2. BrdU labeling index of main pancreatic duct cells in female hamsters treated with test chemicals followed by augmentation pressure (experiment-I)

Carcinogens and dose (mg/kg)	Labeling index <sup>1)</sup> and animal number <sup>2)</sup> of each groups						
	12 days <sup>3)</sup>	14 days	15 days	16 days	18 days	20 days	23 days
Saline	0.04±0.03 (3)	0.51±0.65 (3)	0.11 (2)	3.00 (2)	0.39±0.20 (3)	0.51 (2)	0.41±0.25 (4)
BOP(20)	0.29±0.08* (3)	0.80 (2)	6.14 (2)	7.81 (2)	0.57±0.45 (3)	0.44 (1)	0.85±0.56 (3)
BOP(70)	0.50±0.10* (3)	1.76±0.94 (3)	9.42±1.63* (3)	12.62 (2)	0.54±0.42 (3)	0.29 (2)	0.92 (2)
DEN(50)	0.15±0.01* (3)	0.47±0.35 (3)	1.75 (2)	5.49±2.63 (3)	2.63±1.30* (3)	1.28 (2)	1.33±1.06 (4)
Azaserine(120)	0.87 (2)	0.78 (2)	12.82 (2)	10.94 (2)	1.11 (2)	0.15 (2)	0.90 (1)

1) Labeling index was expressed as % and mean±S. D. was given in the table.

When animal number in each group was less than 3 or all individual showed same value, S. D. was not given.

2) Animal number of each group was given in a parenthesis.

3) Days after commencement (Days after initiation)

\* : p<0.05 and \*\* : p<0.01 vs saline group.

Table 3. BrdU labeling index of small pancreatic duct cells in female hamsters treated with test chemicals followed by augmentation pressure (experiment-I)

Carcinogens and dose (mg/kg)	Labeling index <sup>1)</sup> and animal number <sup>2)</sup> of each groups						
	12 days <sup>3)</sup>	14 days	15 days	16 days	18 days	20 days	23 days
Saline	0.10±0.10 (3)	0.00 (3)	0.00 (2)	3.89 (2)	0.31±0.37 (3)	0.28 (2)	0.15±0.21 (4)
BOP(20)	0.13±0.12 (3)	0.00 (2)	0.50 (2)	1.93 (2)	1.08±0.46 (3)	1.07 (1)	1.29±0.49* (3)
BOP(70)	0.80±0.37* (3)	0.00 (3)	0.04±0.07 (3)	7.55 (2)	0.41±0.21 (3)	0.62 (2)	1.20 (2)
DEN(50)	0.18±0.20 (3)	0.04±0.07 (3)	0.08 (2)	1.14±0.44 (3)	1.76±0.67* (3)	1.27 (2)	0.85±0.42* (4)
Azaserine(120)	1.36 (2)	0.47 (2)	2.18 (2)	3.40 (2)	1.38 (2)	0.18 (2)	1.14 (1)

1) Labeling index was expressed as % and mean±S. D. was given in the table.

When animal number in each group was less than 3 or all individual showed same value, S. D. was not given.

2) Animal number of each group was given in a parenthesis.

3) Days after commencement (Days after initiation)

\* : p<0.05 and \*\* : p<0.01 vs saline group.

Table 4. BrdU labeling index of acinar cells in female hamsters treated with test chemicals followed by augmentation pressure (experiment-I)

Carcinogens and dose (mg/kg)	Labeling index <sup>1)</sup> and animal number <sup>2)</sup> of each groups						
	12 days <sup>3)</sup>	14 days	15 days	16 days	18 days	20 days	23 days
Saline	0.08±0.07 (3)	0.23±0.12 (3)	0.39 (2)	1.71 (2)	4.19±0.97 (3)	4.09 (2)	0.37±0.18 (4)
BOP(20)	0.11±0.19 (3)	0.17 (2)	0.59 (2)	2.09 (2)	3.15±1.41 (3)	1.62 (1)	0.69±0.33 (3)
BOP(70)	0.15±0.17 (3)	0.15±0.17 (3)	0.18±0.13 (3)	2.02 (2)	4.68±1.38 (3)	2.40 (2)	2.08 (2)
DEN(50)	0.45±0.22* (3)	0.48±0.12 (3)	0.74 (2)	1.92±1.44 (3)	4.90±1.37 (3)	3.56 (2)	1.87±0.29* (4)
Azaserine(120)	0.58 (2)	1.02 (2)	1.94 (2)	2.74 (2)	4.23 (2)	2.71 (2)	1.31 (1)

1) Labeling index was expressed as % and mean±S. D. was given in the table.

When animal number in each group was less than 3 or all individual showed same value, S. D. was not given.

2) Animal number of each group was given in a parenthesis.

3) Days after commencement (Days after initiation)

\* : p<0.05 and \*\* : p<0.01 vs saline group.

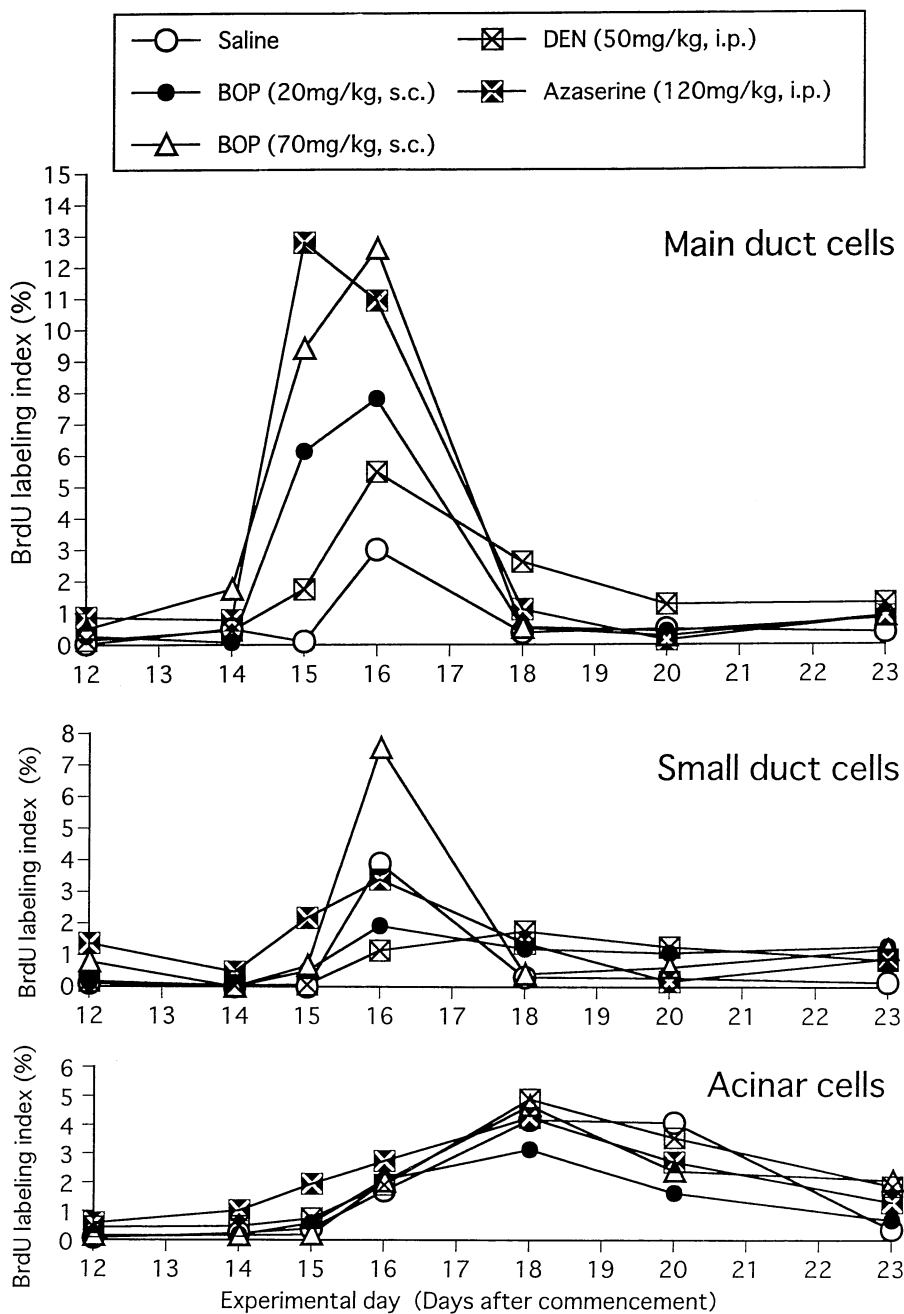


Fig. 2. BrdU labeling index of pancreatic ductal cells and acinar cells in female hamsters treated with test chemicals followed by augmentation pressure (Experiment-I)

のクエン酸緩衝液(0.05 M)にそれぞれ溶解し、4-HAQOは濃塩酸に溶解後希釈して0.005 NHCl 溶液とした。これらの投与液を体重 kg あたり 5 ml の割合で、表 1 に示した投与経路でハムスターに投与した。

Augmentation pressure の操作は、被験物質投与 11 日後より 4 日間、基礎食からコリン欠乏食(Dyet Inc., Pennsylvania, U. S. A.)に変え、体重 kg あたり 500 mg の DL-ethionine を連日腹腔内に投与した。その後、基礎

食に復帰せしめるとともに、体重 kg あたり 800 mg の L-methionine を腹腔内に投与し、その 2 日後に体重 kg あたり 20 mg の BOP を皮下投与した。

実験 I では実験開始後 12, 14, 15, 16, 18, 20, 23 日、実験 II では実験開始後 14, 15, 16, 18, 20 日に各群の動物 1 ~ 4 匹に生理食塩水に溶解した BrdU を体重 kg あたり 20 mg の割合で腹腔内投与し、その 2 時間後にエーテル麻酔下に放血屠殺した。直ちに、膵および十

Table 5. BrdU labeling index of main pancreatic duct cells in female hamsters treated with test chemicals followed by augmentation pressure (experiment-II)

Carcinogens and dose (mg/kg)	Labeling index <sup>1)</sup> and animal number <sup>2)</sup> of each groups				
	14 days <sup>3)</sup>	15 days	16 days	18 days	20 days
Corn oil	0.06±0.11 (3)	0.30±0.38 (3)	2.87±0.42 (3)	1.45±0.82 (3)	1.63±1.25 (3)
BOP(70)	1.47±1.90 (3)	6.25±2.88* (3)	12.91±0.75**(3)	6.49±2.78* (3)	3.92 (2)
BHP(500)	0.03±0.04 (3)	0.16±0.21 (3)	9.06±3.69* (3)	1.48±0.60 (3)	0.99±0.78 (4)
MNU(20)	0.12±0.14 (3)	0.06±0.05 (3)	2.29±1.00 (3)	0.59±0.39 (3)	0.95±0.78 (4)
4-HAQO(5)	0.25±0.16 (3)	1.69±1.21 (3)	4.66±0.89* (3)	2.17±0.75 (3)	1.96±0.71 (3)
DMN(20)	0.45±0.42 (3)	1.77±0.83* (3)	10.36±2.02* (3)	1.61±0.37 (3)	1.24±0.74 (4)
MNNG(100)	0.04 (2)	0.40±0.23 (3)	3.81 (2)	1.12 (2)	3.00 (2)
B(a)P(200)	0.08±0.02 (3)	1.23±1.96 (3)	8.74±6.48 (3)	1.72±1.44 (3)	0.92±0.66 (4)
Trp-P-1(100)	0.17±0.30 (3)	ND <sup>4)</sup>	14.13±3.33* (3)	3.83±2.89 (3)	ND

1) Labeling index was expressed as % and mean±S. D. was given in the table.

When animal number in each group was less than 3, S. D. was not given.

2) Animal number of each group was given in a parenthesis.

3) Days after commencement (Days after initiation)

4) Not done

\* : p<0.05 and \*\* : p<0.01 vs corn oil group.

Table 6. BrdU labeling index of small pancreatic duct cells in female hamsters treated with test chemicals followed by augmentation pressure (experiment-II)

Carcinogens and dose (mg/kg)	Labeling index <sup>1)</sup> and animal number <sup>2)</sup> of each groups				
	14 days <sup>3)</sup>	15 days	16 days	18 days	20 days
Corn oil	0.25±0.30 (3)	0.17±0.30 (3)	0.33±0.12 (3)	0.46±0.31 (3)	0.49±0.16 (3)
BOP(70)	0.66±0.64 (3)	0.27±0.24 (3)	2.36±1.37 (3)	6.12±0.79**(3)	3.14 (2)
BHP(500)	0.13±0.23 (3)	0.31±0.02 (3)	1.19±0.86 (3)	0.33±0.30 (3)	1.00±0.24* (4)
MNU(20)	0.00 (3)	0.28±0.21 (3)	0.48±0.25 (3)	0.57±0.17 (3)	1.44±0.84 (4)
4-HAQO(5)	0.00 (3)	0.05±0.08 (3)	0.71±0.33 (3)	0.63±0.45 (3)	0.35±0.31 (3)
DMN(20)	0.00 (3)	0.06±0.10 (3)	1.30±0.14**(3)	1.08±0.63 (3)	0.69±0.64 (4)
MNNG(100)	0.20 (2)	0.10±0.09 (3)	0.82 (2)	1.03 (2)	1.77 (2)
B(a)P(200)	0.15±0.06 (3)	0.05±0.08 (3)	0.86±0.10**(3)	0.71±0.39 (3)	0.73±0.34 (4)
Trp-P-1(100)	0.37±0.20 (3)	ND <sup>4)</sup>	1.71±0.89 (3)	1.04±0.18**(3)	ND

1) Labeling index was expressed as % and mean±S. D. was given in the table.

When animal number in each group was less than 3 or individual data shows the same value, S. D. was not given.

2) Animal number of each group was given in a parenthesis.

3) Days after commencement (Days after initiation)

4) Not done

\* : p<0.05 and \*\* : p<0.01 vs corn oil group.

二指腸を摘出し、冷エタノールにて固定した。

### 3. 免疫組織化学的検索

固定後の膵および十二指腸は、常法に従って軟パラフィンに包埋後、3 μm 厚の薄切片とした。切片は常法に従って脱パラフィン後、2 N HCl 中で1時間の浸漬処理を経て、以下により免疫組織化学的染色を実施した。正常馬血清でブロッキング後、100倍に希釈した抗 BrdU マウスモノクローナル抗体(Becton Dickinson Immunocytology Systems, California, USA)に4℃にて over night 反応させ、ユニバーサル LSAB-2 キット(DAKO Corporation, California, USA)を用いて DAB にて発色させ、ヘマトキシリンを用いた対比核染色を行い封入した。

各切片を顕微鏡下で観察し、主膵管(main duct)、小膵管(small duct)の上皮細胞および膵腺房細胞をそれぞれ500個以上検索し、BrdU 標識率(labeling index, L. I.)を算出した。

### 4. 統計学的処理

各被験物質投与群と対照群間の有意差を、Student's t-test を用いて検定し、危険率5%未満を有意とした。

## 結 果

### 実験 I

主膵管と末梢膵管上皮細胞および腺房細胞における L. I. は表 2~4 および図 2 に示す。主膵管の L. I. は、対照群では実験開始後第 16 日にのみ軽度増加した。BOP 20 および 70 mg/kg 投与群では第 15~16 日にかけて用量依存的に増加が認められ、ピークとなった第 16 日は 20 mg/kg 投与群では対照群の約 2 倍、70 mg/kg 投与群では対照群の約 4 倍に増加した。DEN 投与群における主膵管の L. I. は、実験開始後第 15~18 日にかけて軽度の増加が認められ、ピークの第 16 日では対照群の約 2 倍の増加が認められた。Azaserine 投与群における主膵管の L. I. は、第 15~16 日にかけて増加が認められ、ピークとなった第 15 日は対照群の約 4 倍と、BOP の 70 mg/kg 投与群に匹敵する増加を示した。

末梢膵管における L. I. は、対照群では主膵管と同様に実験開始後第 16 日にのみ軽度の増加を示し、各被験物質投与群でも第 16~18 日をピークとする軽度の増加傾向が見られたが、主膵管での増加と比較して低いものであった。対照群に対して明らかな差が認められたのは BOP の 70 mg/kg 投与群のみであり、第 16 日には対照群の約 2 倍の L. I. の増加が見られたが、他の被験物質投与群では対照群との間に顕著な差は認められなかった。

Table 7. BrdU labeling index of acinar cells in female hamsters treated with test chemicals followed by augmentation pressure (experiment-II)

Carcinogens and dose (mg/kg)	Labeling index <sup>1)</sup> and animal number <sup>2)</sup> of each groups				
	14 days <sup>3)</sup>	15 days	16 days	18 days	20 days
Corn oil	0.80±0.14 (3)	0.19±0.20 (3)	0.66±0.36 (3)	3.89±0.70 (3)	1.36±0.30 (3)
BOP(70)	0.25±0.43 (3)	0.12±0.20 (3)	0.85±0.86 (3)	4.58±1.52 (3)	0.60 (2)
BHP(500)	0.45±0.23 (3)	0.17±0.16 (3)	2.45±2.10 (3)	5.22±0.90 (3)	1.40±0.71 (4)
MNU(20)	0.26±0.30* (3)	0.50±0.33 (3)	1.40±0.82 (3)	4.45±1.44 (3)	2.11±1.07 (4)
4-HAQO(5)	0.15±0.16** (3)	0.06±0.10 (3)	1.07±0.25 (3)	5.96±2.01 (3)	3.56±0.99* (3)
DMN(20)	0.00 (3)	0.11±0.09 (3)	0.49±0.19 (3)	3.25±1.70 (3)	0.74±0.41 (4)
MNNG(100)	1.73 (2)	0.05±0.09 (3)	1.13 (2)	3.53 (2)	3.09 (2)
B(a)P(200)	1.04±0.62 (3)	0.28±0.13 (3)	0.69±0.68 (3)	3.45±1.48 (3)	1.18±1.53 (4)
Trp-P-1(100)	0.58±0.34 (3)	ND <sup>4)</sup>	0.97±0.37 (3)	5.80±0.92* (3)	ND

1) Labeling index was expressed as % and mean±S. D. was given in the table.

When animal number in each group was less than 3 or individual data shows the same value, S. D. was not given.

2) Animal number of each group was given in a parenthesis.

3) Days after commencement (Days after initiation)

4) Not done

\* : p<0.05 and \*\* : p<0.01 vs corn oil group.

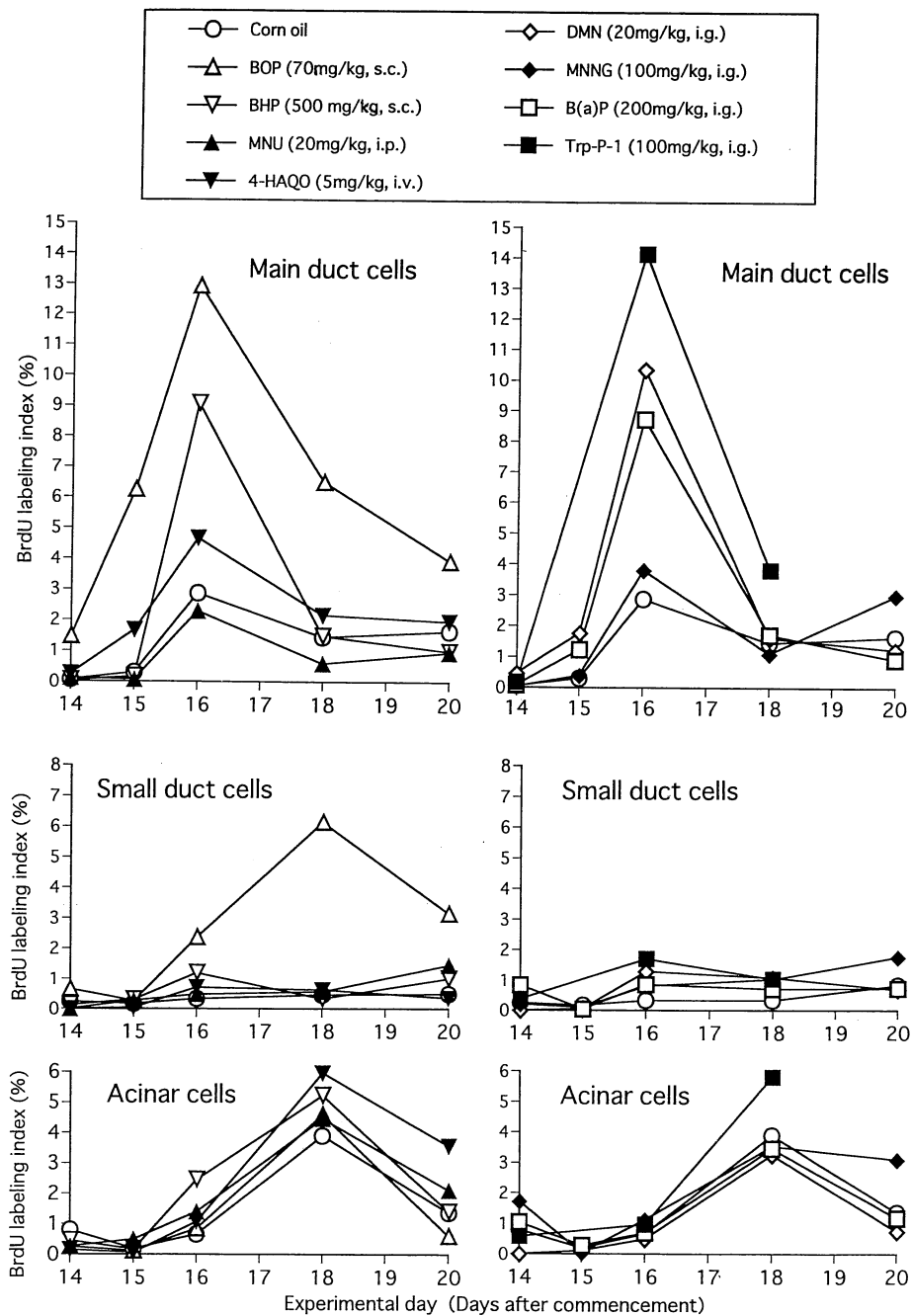


Fig. 3. BrdU labeling index of pancreatic ductal cells and acinar cells in female hamsters treated with test chemicals followed by augmentation pressure (Experiment-II)



腺房細胞における L. I. のピークは主膵管および末梢膵管より遅延して見られ、対照群および被験物質投与各群とも第 18~20 日に認められたが、主膵管のピークに比較して低値であった。また、ピークとなる第 18~20 日ではいずれの群でも対照群との間に明らかな差は認められ

なかった。

#### 実験 II

各細胞における L. I. を表 5~7 および図 3 に示す。実験 I と同様に主膵管における L. I. は、対照群および各被

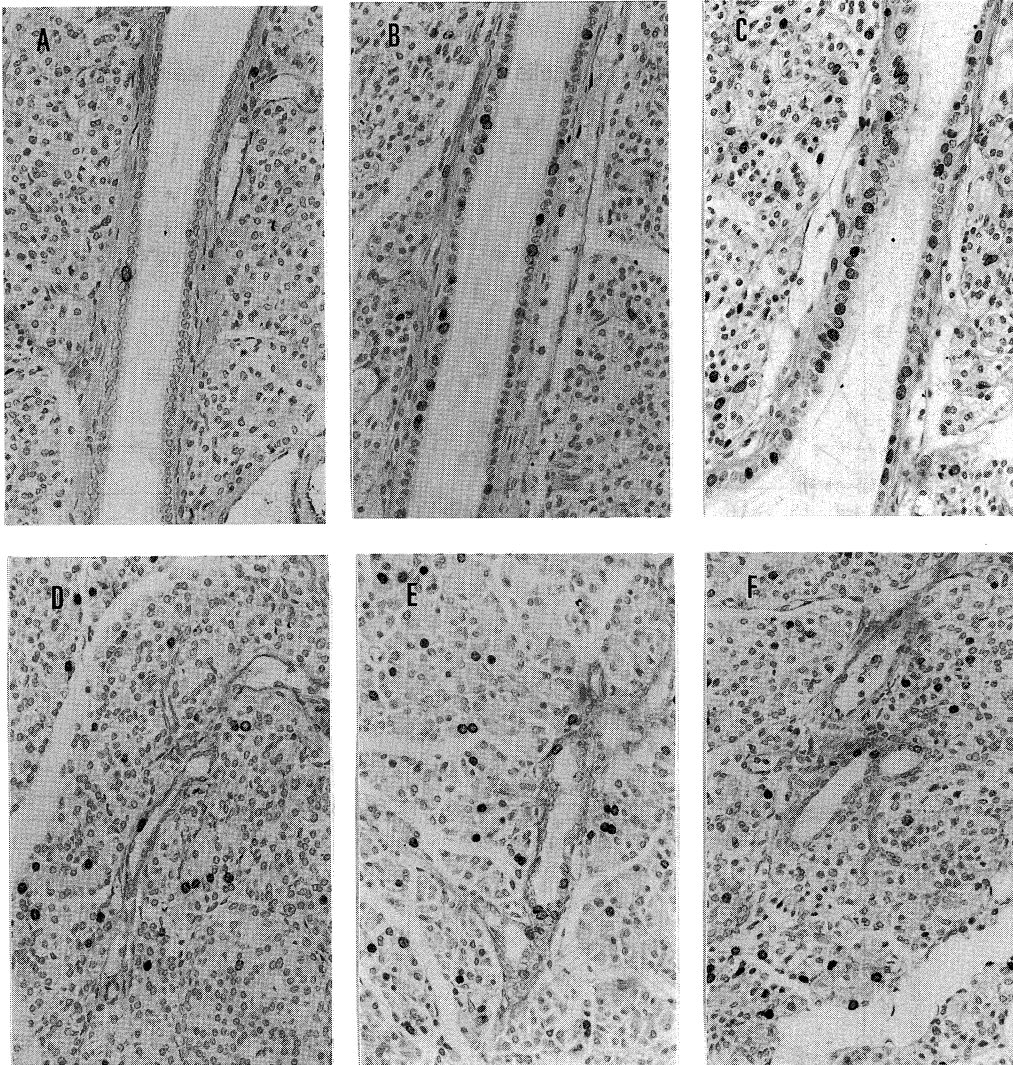


Fig. 4. Histological figures ( $\times 50$ ) of the pancreas immunohistochemically-stained with anti-BrdU antibody. All hamsters were received test chemicals followed by augmentation pressure.

A-C : BrdU labeling in main pancreatic duct cells 16 days after beginning of the experiment. D-F : BrdU labeling in small pancreatic duct cells 17 days after beginning of the experiment. A and D : Corn oil treated control group. B and E : BOP (70 mg/kg, s. c.) treated group. C and F : Trip-P-1 (100 mg/kg, i. g.) treated group

験物質投与群ともに実験開始後第16日をピークとする増加を示し、この時点においてBOP, BHP, DMN, 4-HAQO, Trp-P-1投与群では対照群に比較して有意な増加を示したが、MNU, B(a)P, およびMNNG投与群では有意差は認められなかった。B(a)P投与群では個体差が大きいため有意差は認められなかったが、対照群と比較して増加傾向が認められた。

末梢膵管におけるL. I.も実験Iと同様に、主膵管に比較して低値であり、BOP投与群のみで第18日に顕著な増加が認められた以外、他の被験物質投与群では著明な増加は認められなかった。

腺房細胞におけるL. I.のピークは各群とも第18日に認められたが、主膵管に比較して増加は軽く、各群間の差も明らかではなかった。

## 考 察

本研究は膵発癌に関与する物質の検索を目的として、augmentation pressureにより選択され増殖へと導かれる膵管上皮細胞のDNA合成を指標とし、既知の膵発癌物質を陽性対照として膵を非標的とする発癌物質を被験物質とし、これらの物質の膵発癌への関与に関する可能性について検索した。実験Iにおいてaugmentation pressureの操作期間中である実験開始後12日、14日、15日、16日及びaugmentation pressureの操作終了後の18日、20日と23日について主膵管と末梢膵管の上皮細胞および腺房細胞のL. I.について検索した。その結果、陽性対照群のBOP投与群において主膵管のL. I.は16日目にピークに達することが判明し、BrdUによるL. I.を指標とする被験物質の膵管上皮細胞に対するイニシエーション活性の判定にはこの時期が適切と考えられた。

実験IIでは、実験Iの結果を基に実験開始後、14日、15日、16日、18日と20日にて主膵管と末梢膵管の上皮細胞及び腺房細胞についてL. I.を検索した。この結果は、実験Iの結果と同様に主膵管上皮細胞の増殖を指標とするイニシエーション活性の検索は実験開始後16日目が適切な時期であることが確認された。これらの結果は、被験物質によりイニシエートされた上皮細胞群は、augmentation pressureの最終操作である体重kgあたり20mgのBOPを投与する以前にすでに選択的増殖活性を獲得していることを示し、この短期膵癌発生系の機序を論ずる観点より興味深い知見と考える。

実験Iで用いた被験物質について、BOPはKrügerら<sup>29)</sup>により合成され、膵管上皮細胞を標的とする古典的なハムスターに対する膵発癌物質で<sup>14-15)</sup>、DENはラット肝を標的とする古典的な発癌物質である<sup>16)</sup>。Azaser-

ineはラットの腹腔内へ頻回投与することにより腺房細胞癌を高率に発生せしめることは知られている<sup>17)</sup>。実験IIで用いた被験物質について、BHPはBOPの代謝関連化合物でハムスター皮下に投与すると膵管上皮細胞を標的とし<sup>18-19)</sup>、MNUは広範な臓器を標的とする発癌物質で<sup>30)</sup>、マウス<sup>31)</sup>、モルモット<sup>32)</sup>、ハムスター<sup>20)</sup>に投与すると膵腫瘍を発生せしめる報告がある。4-HAQOは膵部分切除後のラットの静脈内へ投与することにより腺房細胞癌を高率に発生せしめることが知られている<sup>21)</sup>。さらにDMNはラット肝を標的とする古典的発癌物質であり<sup>23)</sup>、ハムスター肝ではcholangiocarcinomaおよびhemangiosarcomaを誘発することが知られている<sup>33)</sup>。MNNGはラットの胃に腺癌を発生せしめ<sup>24)</sup>、B(a)Pはタールによる皮膚癌誘発の研究過程で分離された発癌性成分であり、ハムスターでは気管内投与により肺に発癌性を示すことも報告されている<sup>26)</sup>。Trp-P-1は食品に含まれるトリプトファン等のアミノ酸の加熱分解産物であり、マウスおよびラットにおける肝発癌性が報告されている<sup>27)</sup>。しかしながらDEN, azaserine, 4-HAQO, DMN, MNNG, B(a)PとTrp-P-1の膵管発癌に対する関与についての明らかな報告はみられない。本実験において、DEN, azaserine, 4-HAQO, DMNとTrp-P-1は膵管上皮細胞のL. I.を増加せしめ、一定の条件下では膵管発癌に関与する可能性が示された。これら物質のうち、Trp-P-1は食品中のトリプトファンの加熱分解産物で、ヒトに対する曝露を考慮すると大変に興味深い知見である。これら膵管発癌に対する関与については、その多段階発癌過程における関与についての詳細な研究が必要と考えられる。MNUはマウス<sup>31)</sup>、モルモット<sup>32)</sup>、ハムスター<sup>20)</sup>に膵腫瘍を発生せしめる報告がなされているが、本実験においては膵管上皮細胞のL. I.の増加は認められず、MNUの投与量を詳細に設定した実験が必要と考えられる。MNNGとB(a)Pの膵発癌に対する関与は否定された。

本実験におけるL. I.の算出には、主膵管上皮細胞が末梢膵管のそれより強く反応した。この事実は、ヒトの膵管癌においても主膵管より発生する癌が存在する事実と考え合わせ、ヒトにおいても主膵管上皮細胞は膵発癌物質の標的となっていることが示唆される。

Moriら<sup>34-35)</sup>は、膵液の膵管癌発生に対する関与について膵液自体が膵を標的とするBOPとその関連物質の突然変異原性を増強せしめ、又、これらニトロソ化合物を膵液中で検出している。本実験で陽性と判断された物質についての膵管上皮細胞への血行を介した到達機序については今後研究されねばならぬ問題を提起しているが、

少なくとも本実験系は短期に *in vivo* で膵管癌発生に関与する環境化学物質の検出に有用な系であると考えられる。

## 結 語

ハムスターにおける短期膵管癌発生系において、発癌物質によりイニシエートされた細胞群が選択的増殖へと導かれる事実に着目し、BrdUのDNAへの取り込みを指標として、膵を標的とする発癌物質を陽性対照とし、膵を標的としない発癌物質を被験物質として、それら物質の膵発癌に対する関与について検索し、以下の結果を得た。

1. 被験物質投与後、膵管上皮細胞と腺房細胞におけるBrdUの標識率の算出は、augmentation pressureにより可能であり、投与後16日が至適時期であった。
2. 膵管癌を発生せしめるBOPとBHPは膵管上皮細胞のBrdU標識率を明らかに上昇せしめた。
3. 膵管上皮細胞を標的としない発癌物質のうち、DEN, 4-HAQO, azaserine, DMNとTrp-P-1は膵管上皮細胞のBrdU標識率を上昇せしめた。
4. MNU, MNNGとB(a)Pは、膵管上皮細胞のBrdU標識率を上昇せしめなかった。

以上の結果より、ハムスターにおけるaugmentation pressure操作を用い、膵管上皮細胞のBrdU標識率を指標とする実験系は、短期に膵発癌物質を検出し得る優れた方法で、DEN, 4-HAQO, azaserine, DMNとTrp-P-1は膵管発癌に関与する可能性のある物質であることが示唆された。

本研究は、文部省科学研究補助金がん重点研究1.および厚生省がん研究助成金による補助を受けたものであることをここに付記する。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました奈良県立医科大学付属がんセンター腫瘍病理学教室小西陽一教授に深謝を捧げるとともに、本研究に直接ご指導を賜った同腫瘍病理学教室梶原弘講師に深く感謝の意を表します。また研究に御協力いただきました腫瘍病理学教室の辻内俊文助手、北田裕陸、伊木勝道、赤井弘幸先生をはじめとする諸兄に感謝いたします。さらに、標本作製他のテクニカルアシスタントとして山口恵、増田寛子、中井佐地子、田中伸子の諸氏に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 宮崎直之, 斉藤洋一: 本邦臨床統計集(下巻), 日本臨床社, 東京, p 746-751, 1992.
- 2) Lyon, J. L., Slattery, M. L., Mahoney, A. W. and Robinson, L. M.: Dietary intake as a risk factor for cancer of the exocrine pancreas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* 2: 513-518, 1993.
- 3) Esteve F., Carlo L. V. and Adriano D.: Attributable risks for pancreatic cancer in northern Italy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* 5: 23-27, 1996.
- 4) 傳田阿由美, 小西陽一: 薬局, 41: p 59-69, 1990.
- 5) Pour, M. and Wilson, R. B.: Tumors of the pancreas. Williams & Wilkins, Baltimore, p 37-158, 1980.
- 6) Konishi, Y., Mizumoto, K., Kitazawa, S., Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M. and Kamano, T.: Early ductal lesions of pancreatic carcinogenesis in animals and humans. *Int. J. Pancreatol.* 7: 83-89, 1990.
- 7) Okita, S., Tsutsumi M., Onji, M. and Konishi, Y.: P 53 mutation without allelic loss and absence of mdm-2 amplification in a transplantable hamster pancreatic ductal adenocarcinoma and derived cell lines but not primary ductal adenocarcinoma in hamsters. *Molecular Carcinog.* 13: 266-271, 1995.
- 8) Tsutsumi, M., Kondoh, S., Noguchi, O., Horiguchi, K., Kobayashi, E., Okita, S., Ohashi, K., Honoki, K., Tsujiuchi, T. and Konishi, Y.: K-ras gene mutation in early ductal lesions induced in a rapid production model for pancreatic carcinomas in Syrian hamsters. *Jpn. J. Cancer Res.* 84: 1101-1105, 1993.
- 9) Mizumoto, K., Tsutsumi, M., Denda, A. and Konishi, Y.: Rapid production of pancreatic carcinoma by initiation with N-nitroso-bis(2-oxopropyl)amine and repeated augmentation pressure in hamsters. *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1564-1567, 1988.
- 10) Mizumoto, K., Kitazawa, S., Ito, S., Takashima, Y., Tsutsumi, M., Denda, A. and Konishi, Y.: Cycles of repeated augmentation pressure in

- rapid production of pancreatic and cholangiocellular carcinomas in hamsters initiated with N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine. *Carcinogenesis* **10** : 1457-1459, 1989.
- 11) **Mizumoto, K., Tsutsumi, M., Kitazawa, S., Denda, A. and Konishi, Y.** : Usefulness of rapid production model for pancreatic carcinoma in male hamsters. *Cancer Letters* **49** : 211-215, 1990.
  - 12) **Solt, D and Farber, E.** : New principle for analysis of chemical carcinogens. *Nature* **263** : 701-703, 1976.
  - 13) **Cayama, E., Tsuda, H., Sarma, D. S. R. and Farber, E.** : Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation. *Nature* **275** : 60-62, 1978.
  - 14) **Pour, P., Althoff, J. and Krüger, F. W.** : Induction of pancreatic neoplasms by 2, 2'-dioxopropyl-N-nitrosamine. *Cancer Lett.* **1** : 3-6, 1975.
  - 15) **Pour, P., Althoff, J., Krüger, F. W. and Mohr, U.** : A potent pancreatic carcinogen in Syrian hamsters: N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine. *J. Natl. Cancer Inst.* **58** : 1449-1453, 1977.
  - 16) **IARC** : Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Vol. 17. IARC, Lyon, p 83-124, 1978.
  - 17) **Lomgnecker, D. S. and Crawford, B. G.** : Hyperplastic nodules and adenomas of exocrine pancreas in azaserine treated rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **53** : 573-577, 1974.
  - 18) **Pour, P., Krüger, F. W., Althoff, J., Cardesa, A. and Mohr, U.** : Cancer of the pancreas induced in the syrian golden hamster. *Am. J. Pathol.* **76** : 349-354, 1974.
  - 19) **Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., Denda, A., Amanuma, T., Kondoh, S., Kamino, K. and Konishi, Y.** : Effects of 3-aminobenzamide on induction of multiorgan carcinogenesis by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine in hamsters. *Jpn. J. Cancer Res.* **82** : 793-799, 1991.
  - 20) **Furukawa F., Sato, H., Imaida, K., Toyoda K., Imazawa, T., Takahashi, M. and Hayashi, Y.** : Induction of pancreatic tumors in male syrian golden hamsters by intraperitoneal N-methyl-N-nitrosourea injection. *Pancreas* **7** : 153-158, 1992.
  - 21) **Konishi, Y., Denda, A., Inui, S., Takahashi, S. and Kondo, H.** : Pancreatic carcinoma induced by 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide after partial pancreatectomy and splenectomy in rats. *Gann* **67** : 919-920, 1976.
  - 22) **Hayashi, Y. and Hasegawa, T.** : Experimental pancreatic tumor in rats after intravenous injection of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Gann* **62** : 329-330, 1971.
  - 23) **IARC** : Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Vol. 17. IARC, Lyon, p 125-175, 1978.
  - 24) **Sugimura, T. and Fujimura, S.** : Tumor production in Glandular stomach of rat by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature* **216** : 943-944, 1967.
  - 25) **Mori, H., Bunai, Y., Takahashi, M. and Domellof, L.** : Nitrosamine induced sarcomas in the gastric pylorus of hamsters—A histological and ultrastructural survey on the histogenesis. *Acta Pathol. Jpn.* **35** : 557-590, 1985.
  - 26) **Beems, R. B.** : Modyfying effect of vitamin A on benzo [a] pyrene-induced respiratory tract tumors in hamsters. *Carcinogenesis* **5** : 1057-1060, 1984.
  - 27) **Sugimura, T.** : Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutation Research* **376** : 211-219, 1997.
  - 28) **IARC** : in Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Vol. 31. IARC, Lyon, p 247-254, 1983.
  - 29) **Krüger, F. W., Pore, P. and Althoff, J.** : Induction of pancreas tumors by diisopropanol-nitrosamine. *Naturwissenschaften* **61** : 328-332, 1974.
  - 30) **IARC** : in Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Vol. 1. IARC, Lyon, p 125-135, 1972.
  - 31) **Zimmermann, J. A., Trombetta, L. D., Carter, T. H. and Weisbroth, S. H.** : Pancreatic carcinoma induced by N-methyl-N'-nitrosourea in aged mice. *Gerontology* **28** : 114-120, 1982.
  - 32) **Druckey, H., Ivankovic, S., Bucheler, J., Preussmann, R. and Thomas, C.** : Erzeugung von Mage- und Pankreas-Krebs beim Meerschweinchen durch Methylnitroso-harnstoff und -ureth-

- an. *Z. Krebsforsch.* **72** : 167-182, 1968.
- 33) **Tomatis, L. and Cefis, F.** : The effects of multiple and single administration of dimethylnitrosamine to hamsters. *Tumori* **53** : 447-451, 1967.
- 34) **Mori, Y., Takahashi, M., Kamano, T., Tsutsumi, M. and Konishi, Y.** : Mutagenic activation of pancreatic carcinogenic N-nitrosamines by pancreatic juice of human and animals. In: *Recent Advances in Gastroenterological carcinogenesis—I*, p 589-592, Litosei-Rastignano, Bologna, 1996.
- 35) **Kamano, T., Mori, Y., Suda, K., Takahashi, M., Uchida, T., Takada, T., Tsutsumi, M. and Konishi Y.** : Mutagenic activation of N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine by pancreatic juice and assessment of its ductal tumorigenicity following intraductal administration in dogs. *Int. J. Pancreatol.* **20** : 51-57, 1996.