

N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine による
ハムスター膵管癌発生に対する
tranexamic acid 及び phenyl *N*-*tert*-butylnitronone の影響

奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室

堀 口 浩 資

EFFECTS OF TRANEXAMIC ACID AND PHENYL *N*-*TERT*-BUTYLNITRONE
ON PANCREATIC CARCINOGENESIS IN HAMSTERS

KOHSUKE HORIGUCHI

Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University

Received October 6, 2000

Abstract: Effects of tranexamic acid (TA), a plasminogen activator inhibitor, and phenyl *N*-*tert*-butylnitronone (PBN), an inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor, on pancreatic duct carcinogenesis were investigated using a rapid production model for pancreatic duct carcinoma in hamsters, and the following results were obtained.

1. No toxic signs including growth retardation or loss of pancreatic weights were observed in hamsters treated with BOP followed by TA or PBN.
2. As pancreatic duct lesions, duct epithelial hyperplasia, atypical hyperplasia and adenocarcinoma were histologically observed in all of the experimental groups.
3. The diet containing 0.1% TA reduced both the incidence and number of adenocarcinomas.
4. The drinking water containing 0.05% PBN did not affect any of the pancreatic lesions with statistically significant differences.
5. TA or PBN did not affect the PCNA labeling indices of pancreatic ductal lesions.
6. TA reduced inflammatory reactions in the surrounding tissue of pancreatic ductal lesions, but PBN did not have an effect.

These results indicate that TA possesses inhibitory effects on the development of pancreatic duct carcinomas, while PBN did not clearly show such effects.

(*奈医誌. J. Nara Med. Ass.* **51**, 436~445, 2000)

Key words: hamster, pancreas, phenyl *N*-*tert*-butylnitronone (PBN), tranexamic acid (TA), chemoprevention

結 言

膵管癌は、ヒト悪性腫瘍の中でも最も予後不良な難治性癌の一つであり、その要因としては膵の解剖学的位置に基づく早期発見の困難性、膵自体が非薄な臓器である

ことより癌が容易に膵周囲組織へ浸潤すること、さらに膵管癌細胞自体の悪性度の高さが挙げられる。このような難治性膵癌の制御のためには、従来より行われている拡大切除術、放射線照射、制癌剤投与による集学的治療のみでは限界があり、新たな膵癌治療戦略として、化学

予防法の開発が重要な研究課題の一つとされている。膀胱癌化学予防法の確立のためには、動物実験系を用いた検索が重要である。

膀胱癌は、外分泌腺由来の悪性腫瘍と定義され、腺房細胞由来と膀胱細胞由来に大別されるが、ヒト膀胱癌の大部分は後者由来である。動物実験系では、腺房細胞由来の腫瘍についてはラットを用いたものが知られており^{1,2)}、膀胱細胞由来の腫瘍についてはハムスターを用いた実験系が開発されている³⁻⁵⁾。この系として、ニトロサミン投与によるハムスター膀胱癌発生系⁶⁾を、Mizumoto らがさらに発展させ、短期間で膀胱癌を高頻度に誘発せしめるハムスター短期膀胱癌発生モデルの確立に成功した³⁻⁵⁾。このモデルにおける膀胱病変は、膀胱上皮の過形成に始まり、異型性過形成、膀胱内癌を経て浸潤癌へと進展するもので、その組織型のみならず K-ras 及び p53 遺伝子変異^{7,8)}の点においてもヒト浸潤性膀胱癌に極めて類似しており、膀胱癌の発生、増殖、進展過程を研究するための有用な実験モデルである。従って、今回、広義の化学予防物質を検索する目的でこの系を用いて実施した。

近年、炎症は発癌促進機構の一つとして注目されており、胃の *Helicobacter pylori*⁹⁾、肝における C 型肝炎ウイルス¹⁰⁾ などによる慢性炎症の発癌に対する関与が報告されている。一方、ハムスター短期膀胱癌発生系においては膀胱病変の周囲に炎症細胞浸潤がよくみられ、また、ヒト膀胱癌においても随伴性膀胱炎を伴うことがしばしばみられる。さらに、膀胱石症や熱帯性石灰化膀胱症例における膀胱癌発生^{11,12)}は、膀胱炎が膀胱癌を促進することを示唆するものである。膀胱の発症機序としては、トリプシンの活性化が引き金となり、種々の蛋白分解酵素が活性化されることより、膀胱の自己消化とそれに伴った炎症性反応を起こすものとされている¹³⁾。近年、plasminogen

activator (PA)は、種々の炎症メディエーターの活性化に関与し、膀胱の発症や増殖に重要な役割を果たしていることが示されている^{14,15)}。また、PA は悪性黒色腫¹⁶⁾や膀胱癌¹⁷⁻¹⁹⁾由来の癌細胞において発現が亢進していること、及び PA の発現亢進が癌細胞の悪性増殖能増加に関与しているとの報告もされている。一方、一酸化窒素 (NO)ラジカルは炎症の重要なメディエーターとして注目されているのみならず、DNA 障害を惹起し、遺伝子変異をも誘発しうることより、発癌機構に関与するものと示唆されている²⁰⁾。

本研究は膀胱炎の制御による膀胱癌抑制の可能性について検索する目的で、PA 阻害剤として広く臨床的に用いられている tranexamic acid (TA)及び誘導型 NO (iNOS)阻害剤である phenyl *N*-*tert*-butylnitron (PBN)^{21,22)}を用いてハムスター短期膀胱癌発生系における膀胱癌に対する影響について検索した。

材料及び方法

1. 化学物質

TA (Fig. 1)は第一製薬株式会社より供与され、また PBN (Fig. 1)はオクラホマ医学研究財団の Floyd・古武両博士より供与された。N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine(BOP), DL-ethionine, L-methionine はナカライテスク株式会社(京都)より購入した。

2. 実験プロトコール及び検索方法

動物は8週齢、体重約 100 g の雌性シリアンゴールデンハムスター(日本エスエルシー株式会社、浜松)60 匹を使用した。ハムスターは 1 群 20 匹として 3 群に分け、プラスチックケージに 5 匹ずつ収容して、温度 24±1℃、湿度 60±5%、照明時間 12 時間/日に制御した動物室で飼

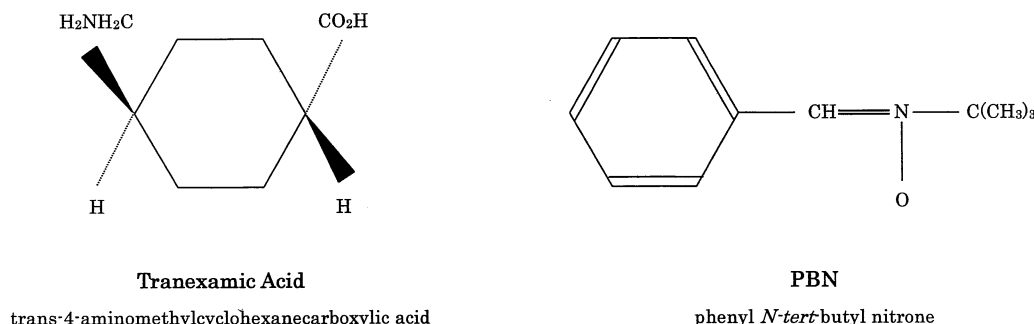


Fig. 1. Chemical structures of tranexamic acid and PBN

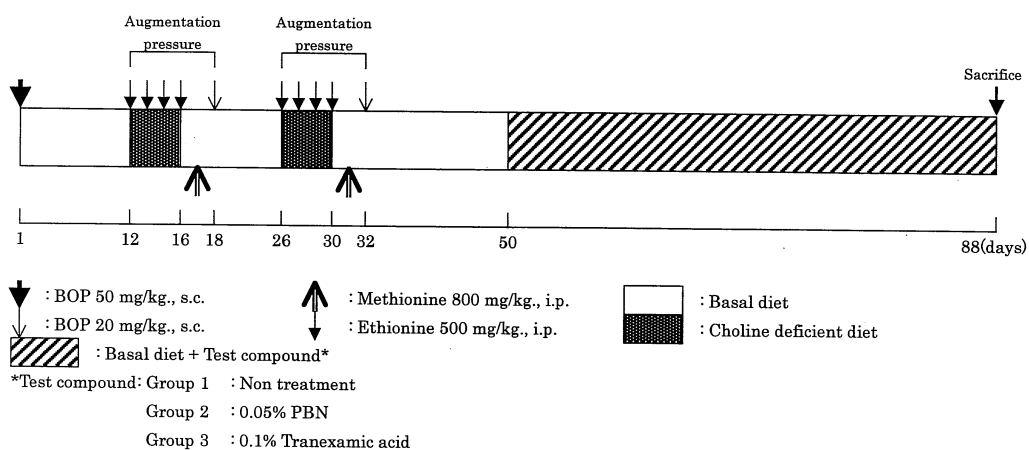


Fig. 2. Experimental protocol

育した。飼料と飲水は自由摂取とし、基礎食はオリエンタルMF(オリエンタル酵母株式会社, 東京), コリン欠乏食(Dyets Inc., Bethlehem, PA)を使用した。

実験プロトコルはFig. 2に示す。ハムスター短期膀胱発癌モデルに基づき、全動物にイニシエーションとして体重kgあたり50mgのBOPを皮下投与し、BOP投与の11日後より4日間、コリン欠乏食を投与し、この間体重kgあたり500mgのDL-ethionineを連日腹腔内投与した。その後、基礎食に戻すとともに体重kgあたり800mgのL-methionineを1回腹腔内投与し、その2日後に体重kgあたり20mgのBOPを皮下投与した。このコリン欠乏食、DL-ethionine、L-methionine及びBOP投与からなる一連の操作をaugmentation pressure(促進圧力)と称し、本操作を実験開始後11日目と26日目より2回行った。実験開始後50日目より、第1群は基礎食のみ投与した群、第2群はPBNを0.05%の濃度で飲水に溶解して投与した群、第3群はTAを0.1%の濃度で基礎食に混じて投与した群とした。

全動物は、実験開始後88日目にエーテル麻酔下で腹部大動脈からの放血により安楽死させた。膀胱は、摘出・秤量した後、濾紙上に伸展し10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、脾葉、胃葉、十二指腸葉の各葉に分けて標本を作製した。組織は、パラフィン包埋後薄切し、組織学的検索のためヘマトキシリン・エオジン染色、細胞増殖活性検索のためproliferating cell nuclear antigen(PCNA)染色を行った。PCNA染色は、切片を脱パラフィンした後、内因性ペルオキシターゼを3% H₂O₂・メタノール溶液中にて不活化し、一次抗体としてEPOS抗

PCNAモノクローナル抗体(DAKO JAPAN 京都)を用いて、室温で1時間反応させた後、3-3' diaminobenzidine(DAB)溶液を用いて発色し、マイヤー・ヘマトキシリンによる対比核染色を行った。膀胱病変は、過形成、異型過形成及び癌に分類し、それぞれの病変の個数を計測し、それぞれの膀胱病変中のPCNA標識率(病変が300細胞以下で構成されている場合は全細胞、それ以上の場合には病変の辺縁から中心領域にかけて任意の2又は3部位を選択し、それぞれ100個の細胞を対象)を算出した。

3. 統計学的手法

統計はSASシステム(Version 6.04, SAS Institute, Japan)を用い、体重及び膀胱重量並びに膀胱病変数はDunnettのT-test、病変の発生頻度及びPCNA陽性細胞率は χ^2 法で解析し、危険率5%未満を有意とした。

結 果

1. 実験の詳細

実験開始時と終了時の動物数、体重及び臓器重量はTable 1に示す。実験期間中の体重の推移はFig. 3に示す。実験期間中、第1群で20匹中3匹、第2群で20匹中8匹、第3群で20匹中2匹が死亡した。体重はいずれの群においてもaugmentation pressureの期間中は減少したが、その後は増加し、最終体重は第1群の167±13gに比して第2群で161±15g、第3群で164±12gと有意な差はなかった。膀胱の絶対及び相対重量は、第2及び3群共に第1群に比較して有意な差はなかった。摂餌

Table 1. Numbers of animals, body and organ weights of hamsters given BOP followed by PBN or tranexamic acid

Group	Treatment	Effective No. of animals*	Body weight(g)		Absolute organ weight		Relative organ weight	
			Initial	Final	Pancreas(g)	Liver(g)	Pancreas(%)	Liver(%)
1	Non treatment	17	95±12	167±13	1.17±0.37	8.98±1.72	0.69±0.22	5.34±1.14
2	0.05% PBN	12	94±6	161±15	1.09±0.23	10.6±3.73	0.65±0.11	6.52±2.85
3	0.1% tranexamic acid	18	95±6	164±12	1.19±0.29	9.49±2.18	0.73±0.18	5.84±1.49

* : Based on histopathological examination.

Values are indicated as mean±standard deviation.

The relative organ weight was calculated as the percent of body weight.

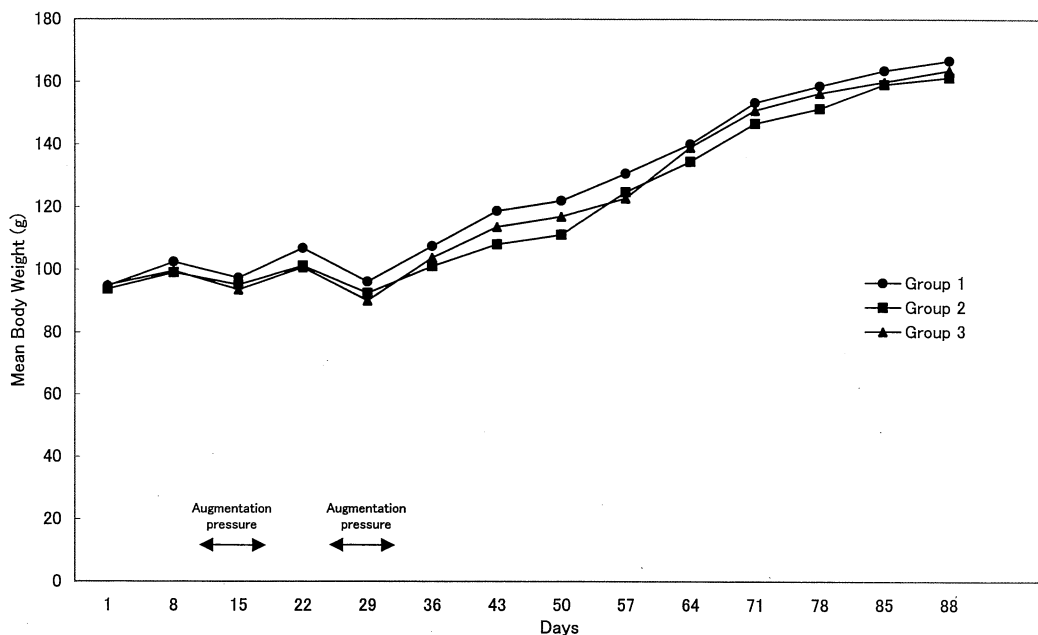


Fig. 3. Growth curves of body weight of hamsters given BOP followed by PBN or tranexamic acid

量及び摂水量は Table 2 に示す。ハムスター 1 匹あたりの 1 日平均摂餌量及び摂水量は、第 1 群の 9.5 g と 13 mL に比して、第 2 及び 3 群ではそれぞれ 8.6 g と 12 mL 及び 9.4 g と 13 mL であり、有意な差はなかった。第 2 及び 3 群のハムスター 1 匹あたり 1 日あたりの PBN 及び TA 摂取量は、それぞれ 6.0 及び 9.4 mg と算出された。

2. PBN 及び TA による膀胱癌に対する影響

膀胱癌変の発生率及び病変数は Table 3 に示す。本実

験において認められた膀胱癌変はいずれも膀胱由来のものであり、膀胱上皮の過形成、異型過形成及び膀胱癌と判定された(Fig. 4)。過形成と異型過形成の発生率は、第 1 群と第 2 または 3 群の間に有意な差がなかった。これに対し、膀胱癌の発生率は、第 1 群の 59 % に比して、第 2 群で 33 % と統計学的には有意でなかったが、低下傾向が認められ、第 3 群では 22 % と有意な低下を認めた。また、過形成及び異型過形成の 1 個体あたりの発生数に第 1 群と第 2 または 3 群の間に有意な差がみられなかった。膀胱癌の 1 個体あたりの発生数は、第 1 群の 0.88±0.78

Table 2. Food consumption and water intake of hamsters given BOP followed by PBN or tranexamic acid

Group	Treatment	Average food consumption per day(g)	Average water intake per day(mL)	Total chemical intake (mg/animal)	Average chemical consumption per day(mg)
1	Non treatment	9.5	13	0	0.0
2	0.05% PBN	8.6	12	198	6.0
3	0.1% tranexamic acid	9.4	13	310	9.4

Table 3. Incidence and mean number of pancreatic duct lesions of hamsters given BOP followed by PBN or tranexamic acid

Group	Treatment	Effective No. of Animals	Incidence of Pancreatic Duct Lesions				Mean Number of Pancreatic Duct Lesions		
			Hyperplasia	Atypical Hyperplasia	Carcinoma	Total	Hyperplasia	Atypical Hyperplasia	Carcinoma
1	Non treatment	17	17(100%)	16(94%)	10(59%)	17(100%)	8.29±2.91	2.52±1.84	0.88±0.78
2	0.05% PBN	12	12(100%)	11(92%)	4(33%)	12(100%)	10.83±5.70	3.00±2.41	0.41±0.66
3	0.1% tranexamic acid	18	18(100%)	16(89%)	4(22%)*	18(100%)	9.00±4.45	2.22±1.43	0.27±0.57*

* : Significantly different from control group at $P < 0.05$ by Chi-square test.

* : Significantly different from control group at $P < 0.05$ by Dunnett's t-test.

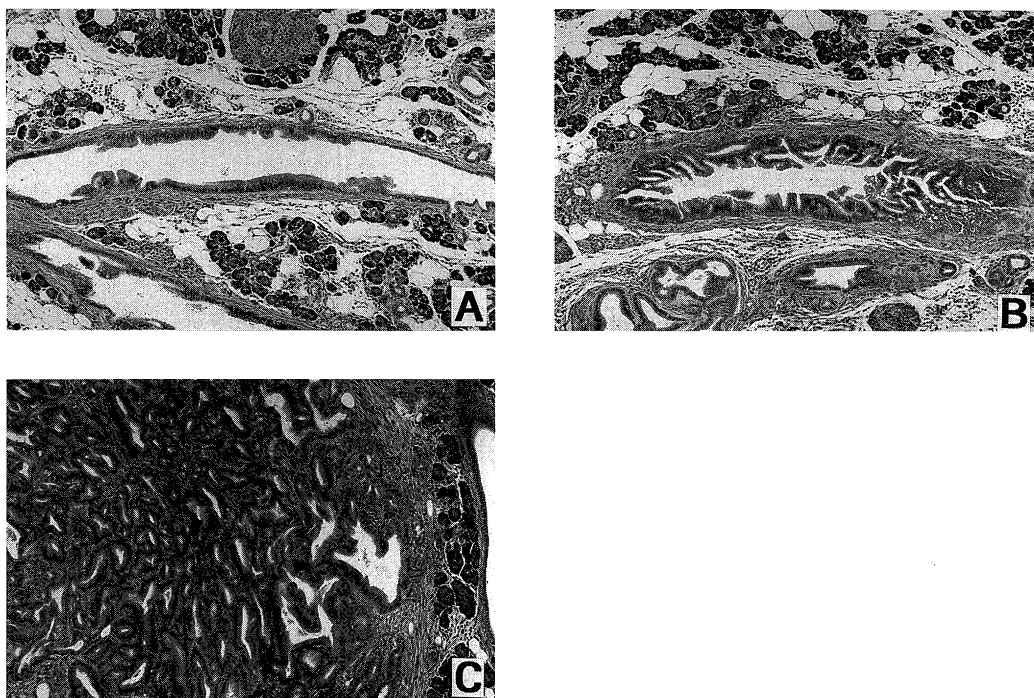


Fig. 4. Representative histologic features of pancreatic ductal lesions of hamsters given BOP followed by tranexamic acid. A : hyperplasia of pancreatic duct epithelium, B : atypical hyperplasia of pancreatic duct epithelium, C : pancreatic adenocarcinoma. H.E. stain×25

個に比して、第2群では 0.41 ± 0.66 個と低下傾向が認められたものの、有意な差ではなかったが、第3群では 0.27 ± 0.57 個と有意な低下がみられた。一方、過形成、異型過形成及び膵管癌におけるPCNA標識率(Table 4)は、第1群と第2または3群の間に有意な差はみられなかった。

3. PBN 及び TA による膵炎における炎症性変化に対する影響

膵臓の炎症性変化の組織学的所見は Table 5 及び

Fig. 5 に示す。膵管病変のない膵組織においては、促進圧力操作によるものと考えられる腺房細胞の脱落、脂肪化、浮腫のみられる動物があったが、PBN または TA の投与による影響はみられなかった。膵管病変部周囲においては、第1群にてリンパ球を主とした炎症細胞浸潤、浮腫及びうっ血がみられた(Fig. 5A)。第1群と比較し、この変化は第2群では著変はみられなかったが、第3群(Fig. 5B)においては炎症細胞浸潤、浮腫及びうっ血の程度がいずれも軽減していた。

Table 4. PCNA labeling indices in the pancreas of hamsters given BOP followed by PBN or tranexamic acid

Group	Treatment	PCNA labeling index(%)		
		Hyperplasia	Atypical Hyperplasia	Carcinoma
1	Non treatment	5.73 ± 1.76	17.20 ± 7.32	42.51 ± 23.93
2	0.05% PBN	4.09 ± 2.52	15.89 ± 6.43	42.72 ± 20.39
3	0.1% tranexamic acid	6.39 ± 2.51	21.08 ± 9.30	46.49 ± 15.89

Table 5. Histopathological findings of inflammatory reactions in the pancreas of hamsters given BOP followed by PBN or tranexamic acid

Group	Treatment	Lesion	Inflammatory cells	Fibrosis	Lipomatosis	Edema	Congestion
1	Non treatment	Non-ductal lesion	-	-	-~+	-~+	-
		Ductal lesion*	++~+++	-~++	-	+~++	±~++
2	0.05% PBN	Non-ductal lesion	-	-	-~+	-~+	-
		Ductal lesion*	++~+++	-~++	-	+~++	±~++
3	0.1% tranexamic acid	Non-ductal lesion	-	-	-~+	-~+	-
		Ductal lesion*	+~++	-~++	-	±~+	±~+

- : absent, ± : slight, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe

* : Ductal lesions including hyperplasia, atypical hyperplasia and adenocarcinoma.

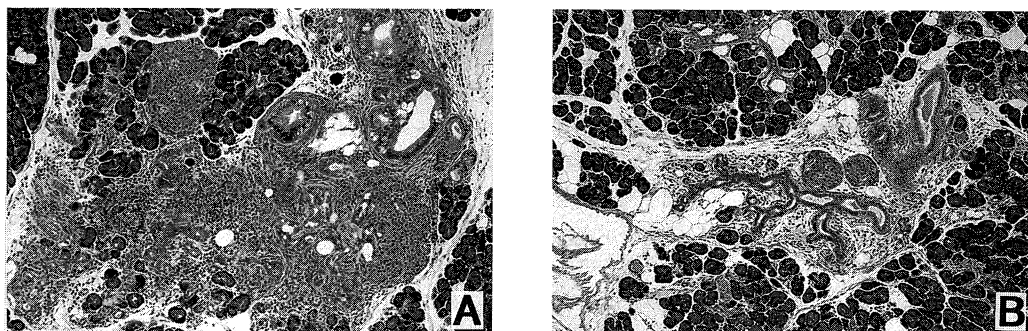


Fig. 5. Representative histologic features of inflammatory reactions in pancreas of hamsters given BOP followed with or without tranexamic acid. A : pancreas of hamster of group 1, B : pancreas of hamster of group 3. H.E. stain×25

考 察

本研究において、BOP によるハムスター膵管発癌に対して、膵炎の発症に重要とされている PA の阻害剤である TA は、膵発癌を抑制することが判明し、また、随伴する炎症の程度も軽減させることが示された。TA には膵管病変の PCNA 標識率を減少させる効果はみられなかった。一方、種々の臓器の炎症メディエーターとして注目されている NO ラジカルを合成する iNOS の阻害剤である PBN は、明らかな膵発癌抑制効果を示さなかった。

現在、慢性膵炎が膵癌の危険因子であるか否かについての一定の見解はなされていないが、ハムスター短期膵癌発生系において膵管病変の周囲にはしばしば炎症細胞浸潤が観察され、中枢側の太い膵管周囲よりも末梢側の小膵管の病変周囲により強い炎症反応を伴うことが多い。一方、末梢側に発生した異型過形成病変では、中枢側膵管に発生した異型過形成病変に比較して細胞増殖活性と悪性度が高く²³⁾、炎症がその要因であることが示唆される。抗炎症剤として広く用いられている非ステロイド系抗炎症剤による膵発癌修飾作用について、Takahashi²⁴⁾ は indomethacin 及び phenylbutazone が炎症反応と膵発癌の双方を抑制することを報告している。しかし、彼らは同じ報告で、aspirin が炎症反応を抑制するものの、有意な膵発癌抑制作用を認めないことを示している。一方、膵炎の治療に臨床応用されているトリプシン阻害剤である camostat あるいは soybean trypsin inhibitor は、BOP と同時に投与すると膵発癌を抑制するが、BOP 投与後のプロモーション期に投与しても発癌を抑制しないことも報告されている^{25,26)} が、炎症反応については記載がなく、膵発癌修飾作用の機序は不明である。従来、トリプシンは膵炎の発症に重要であるとされ、膵管内圧の上昇などによりトリプシノーゲンが膵房細胞より漏出し、活性化され、次々に他の膵酵素を活性化することで膵の自己消化を誘発しうることが示唆されていた。しかし、近年膵炎の発症機構には、さらに多くの酵素が関与していることが明らかにされている¹³⁾。PA は、線溶系酵素の活性化を介して、膵臓の浮腫、うっ血や炎症細胞浸潤を引き起こし、膵炎の発症に関与することが示されている^{14,15)}。また、本研究で使用したハムスター短期膵癌発生系を用いて作製した膵管癌細胞は、培養系に移すと PA を産生することが観察されている(未発表)。本研究においても TA を投与されたハムスターにて、膵管病変周囲の炎症細胞浸潤、浮腫やうっ血が軽減されており、これらは TA による PA 阻害作用に基づく変化である

ことを示唆する。従って、TA は PA の阻害による炎症の抑制に基づいて膵発癌を抑制した可能性が考えられる。

一方、PBN には明らかな発癌抑制作用はみられなかった。これは、膵炎の発症は通常の感染による炎症の発症機序とは異なり、種々の膵酵素の活性化が炎症の成立に重要であることより、NO の炎症メディエーターとしての役割は、他の臓器に比して重要でないことが示唆される。

炎症による発癌促進の分子機構については、炎症に伴って産生される種々の酸素ラジカルや NO ラジカルが直接 DNA 障害を引き起こし、遺伝子変異を誘発すること^{20,27)}、また、cyclooxygenase など種々の遺伝子の発現異常を引き起こすことで癌化へ関与するとされている^{28,29)}。一方、ハムスター短期膵癌発生系において種々の遺伝子異常の蓄積が癌の発生と進展に関与することが明らかにされつつある³⁰⁾。K-ras 遺伝子変異は、過形成、異型過形成病変よりみられる発癌早期の変化であるが、この変異パターンはすべてコドン 12 の GGT から GAT への点突然変異であり、ニトソサミンにより引き起こされた変異と考えられる³⁰⁾。炎症に伴い発生する種々のラジカルが、DNA 障害を引き起こし、遺伝子変異を誘発する可能性があるが、異型過形成より浸潤性膵管癌への進展過程においては、K-ras 以外の遺伝子変異は発見されておらず、K-ras 以外の既知あるいは未知遺伝子変異があるかについては、今後の研究課題である。また、異型過形成より浸潤性膵管癌への進展過程においては、マトロプロテナーゼ(MMP)-2 の発現・活性化、midkine 遺伝子の発現亢進、nm23 遺伝子発現の亢進、テロメララーゼの活性化など³⁰⁾ 種々の遺伝子発現異常が見出されている。炎症に伴い産生されるサイトカインの中では、IL-1 α がヒト膵癌細胞に対して浸潤・転移能を高める可能性があること、すなわち、膵癌培養細胞培養液中に IL-1 α を添加するとセクレチンの誘導を介して浸潤能が亢進することが報告されている³¹⁾。本研究においてみられた TA による膵癌病変における炎症細胞浸潤抑制は、IL-1 α などのサイトカインの誘導を抑制したことにより膵癌の浸潤増生を抑制した可能性も示唆される。炎症により、どのような遺伝子が発現異常をきたし、浸潤癌の発生と進展に作用するかについては、さらに検索が必要であろう。

近年、PA はマウスの悪性黒色腫転移株で高い活性がみられること¹⁶⁾、ヒト膵癌¹⁷⁻¹⁹⁾ や大腸癌³²⁾ において高頻度に発現亢進していることが報告され、また、PA 活性の上昇と膀胱癌の浸潤能の増加との関連が報告されている³³⁾。さらに、マウスの B16 悪性黒色腫細胞にヒト PA 遺伝子を強制発現すると、肺転移巣の形成が促進され³⁴⁾、

膀胱癌細胞培養液に PA を添加すると *in vitro* での癌細胞の浸潤能が亢進することが報告されている³³⁾。これらの報告により、PA は間質基質の分解^{16,34)}、MMP 活性化³⁵⁾、サイトカイン活性化³⁶⁾ や血管新生促進³⁷⁾ などにより癌の浸潤・転移に大きな役割を果たしていることが示唆されている。一方、ハムスター短期膵癌発生系においては、MMP-2 の発現・活性化が浸潤癌の発生に重要であることが示されていることより³⁸⁾、TA による膵癌の発症抑制には、PA の阻害に基づく MMP-2 の活性化の抑制も関与している可能性がある。本研究において、TA により膵管病変の PCNA 標識率が抑制されなかったことは、PA が MMP の活性化に関与し、浸潤癌の発症を抑制した可能性に矛盾しないものである。

本研究で用いた TA の用量は、体重 60 kg のヒトに換算すると 3 g となり、臨床的に使用されている 1 日量 1~2 g に近似するものであり、ヒトへ外挿しうるものと考えられる。しかし、近年化学予防に関する種々の実験により、被験物質の発癌抑制作用の発現には至適な用量が存在する場合や、用量と発癌抑制効果の間に必ずしも相関性がみられず、高用量においてはむしろ発癌促進的に作用する抑制物質もある。従って、本研究を含め動物実験における結果をヒトへ外挿する際には、種々の用量を用いた被験物質の検索が必要となろう。しかし、本研究は、膵管の前癌病変の出現する時期より投与した TA が膵癌の発症を抑制しえたことより、化学物質による術後残存膵よりの膵癌再発予防や K-ras 遺伝子変異を検出された過形成病変を有する慢性膵炎患者の発癌予防のための重要な基礎的情報を提供するものである。

結 語

ハムスター短期膵癌発生系を用い、PBN 及び TA の膵発癌に対する影響について検索し、以下の結果を得た。

1. PBN 及び TA は、ハムスターの体重、膵重量に変化を与えず、毒性所見はみられなかった。
2. 本実験系では、膵管上皮の過形成・異型過形成と膵管腺癌が発生した。
3. TA は、膵臓における膵癌の発症頻度及びハムスター 1 個体あたりの膵癌数も減少せしめた。
4. PBN は、膵臓における膵管病変の発症頻度及びハムスター 1 個体あたりの膵管病変数に影響を与えなかった。
5. TA 及び PBN は、膵管病変及び膵管癌における PCNA 標識率を抑制することはなかった。
6. TA は、膵管病変及び膵癌周囲の炎症反応を抑制し

たが、PBN には炎症反応抑制作用はみられなかった。

以上の結果より、TA は膵管癌発生を抑制し、炎症反応も抑制する作用を有することが判明した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御助言を賜りました恩師奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室小西陽一教授に深甚の謝意を申し上げるとともに、論文の御校閲、御助言を賜りました、第二内科学教室成田亘啓教授、第三内科学教室福井 博教授に深謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり終始御指導を戴きました腫瘍病理学教室堤雅弘講師に心から感謝するとともに、御協力を賜った腫瘍病理学教室の御諸兄姉に感謝致します。なお、本研究は平成 12 年度がん克服戦略研究事業助成金を受けた。また、本論分の要旨は第 59 回日本癌学会において発表した。

文 献

- 1) Longnecker, D. S. and Crawford, B. G. : Hyperplastic nodules and adenomas of exocrine pancreas in azaserine-treated rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **53**(2) : 573-577, 1974.
- 2) Longnecker, D. S. and Curphey, T. J. : Adenocarcinoma of the pancreas in azaserine-treated rats. *Cancer Res.* **35**(8) : 2249-2258, 1975.
- 3) Mizumoto, K., Tsutsumi, M., Denda, A. and Konishi, Y. : Rapid production of pancreatic carcinoma by initiation with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine and repeated augmentation pressure in hamsters. *J. Natl. Cancer Inst.* **80** : 1564-1567, 1988.
- 4) 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* **14** : 1457-1459, 1989.
- 5) Mizumoto, K., Tsutsumi, M., Kitazawa, S., Denda, A. and Konishi, Y. : Usefulness of a rapid production model for pancreatic carcinoma in male hamsters. *Cancer Lett.* **49** : 211-215, 1990.
- 6) Pour, M. and Wilson, R. B. : Tumors of the

- pancreas. Williams and Wilkins, Baltimore, p37-158, 1980.
- 7) **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.
 - 8) **Okita, S., Tsutsumi, M., Onji, M. and Konishi, Y.** : p53 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 adenocarcinomas in hamsters. *Mol. Carcinogenesis* **13** : 266-271, 1995.
 - 9) **The Eurogast Study Group** : An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* **341** : 1359-1362, 1993.
 - 10) **Takano, S., Yokosuka, O., Imazeki, F., Tagawa, M. and Omata, M.** : Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C : A prospective study of 251 patients. *Hepatology* **21** : 650-655, 1995.
 - 11) 吉利 和, 飯島宗一, 石川栄世, 景山圭三, 島峰徹郎 : 現代病理学大系, 肝臓II 膵臓 胆道. 中山書店, 東京, p231, 1983.
 - 12) **Mori, M., Hariharan, M., Anandakumar, M., Tsutsumi, M., Ishikawa, O., Konishi, Y., Chellam, V. G., John, M., Praseeda, I., Priya, R. and Narendranathan, M.** : A case-control study on risk factors for pancreatic disease in Kerala, India. *Hepato-Gastroenterology* **46** : 25-30, 1999.
 - 13) 竹内 正 : 膵臓病学. 南江堂, 東京, p114-115, 1993.
 - 14) **Hirano, T. and Takeuchi, S.** : Anti-ulcer agent, cetraxate hydrochloride (Neuer), prevents subcellular redistribution of lysosomal enzyme in caerulein-induced pancreatitis in the rat. *J. Int. Med. Res.* **22**(2) : 107-112, 1994.
 - 15) **Friess, H., Cantero, D., Graber, H., Tang, W. H., Guo, X., Kashiwagi, M., Zimmermann, A., Gold, L., Korc, M. and Buchler, M. W.** : Enhanced urokinase plasminogen activation in chronic pancreatitis suggests a role in its pathogenesis. *Gastroenterology* **113**(3) : 904-913, 1997.
 - 16) **Shapiro, R. L., Duquette, J. G., Roses, D. F., Nunes, I., Harris, M. N., Kamino, H., Wilson, E. L. and Rifkin, D. B.** : Induction of primary cutaneous melanocytic neoplasms in urokinase-type plasminogen activator (uPA)-deficient and wild-type mice : cellular blue nevi invade but do not progress to malignant melanoma in uPA-deficient animals. *Cancer Res.* **56** : 3597-3604, 1996.
 - 17) **Paciucci, R., Tora, M., Diaz, V. M., and Real F. X.** : The plasminogen activator system in pancreas cancer : role of t-PA in the invasive potential in vitro. *Oncogene* **16**(5) : 625-633, 1998.
 - 18) **Cantero, D., Friess, H., Deflorin, J., Zimmermann, A., Brundler, M. A., Riesle, E., Korc, M. and Buchler, M. W.** : Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma. *Br. J. Cancer* **75**(3) : 388-395, 1997.
 - 19) **Takeuchi, Y., Nakao, A., Harada, A., Nonami, T., Fukatsu, T. and Takagi, H.** : Expression of plasminogen activators and their inhibitors in human pancreatic carcinoma : immunohistochemical study. *Am. J. Gastroenterology* **88** (11) : 1928-1933, 1993.
 - 20) **Ohshima, H. and Bartsch, H.** : Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors : possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Res.* **305** : 253-264, 1994.
 - 21) **Miyajima, T. and Kotake, Y.** : Spin trapping agent, phenyl *N-tert*-butyl nitron, inhibits induction of nitric oxide synthase in endotoxin-induced shock in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215** : 114-121, 1995.
 - 22) **Kotake, Y.** : Pharmacologic properties of phenyl *N-tert*-butylnitron. *Antiox. Redox Signal.* **1** (4) : 481-499, 1999.
 - 23) 堤 雅弘, 沖田俊司, 小西陽一 : 発生部位による膵管上皮由来腫瘍の生物学的特性. *病理と臨床.* **15** (7) : 577-581, 1997.
 - 24) **Takahashi, M., Furukawa, F., Toyoda, K., Sato, H., Hasegawa, R., Imaida, K. and Hayashi,**

- Y. : Effects of various prostaglandin synthesis inhibitors on pancreatic carcinogenesis in hamsters after initiation with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Carcinogenesis* **11**(3) : 393-395, 1990.
- 25) **Furukawa, F., Nishikawa, A., Imazawa, T., Yoshimura, H., Sato, M., Aze, Y. and Takahashi, M.** : Blocking effects of synthetic trypsin inhibitor (camostat) on pancreatic carcinogenesis in hamsters initiated with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl) amine. *Pancreas* **9**(1) : 78-82, 1994.
- 26) **Furukawa, F., Nishikawa, A., Imaida, K., Mitsui, M., Enami, T., Hayashi, Y. and Takahashi, M.** : Inhibitory effects of crude soybean trypsin inhibitor on pancreatic ductal carcinogenesis in hamsters after initiation with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl) amine. *Carcinogenesis* **13**(11) : 2133-2155, 1992.
- 27) **Floyd, R. A., Watson, J. J., Harris, J., West, M. and Wong, P. K.** : Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137** : 841-846, 1986.
- 28) **Hong, W. K. and Sporn, M. B.** : Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* (Washington, DC) **278** : 1073-1077, 1997.
- 29) **Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P.** : Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 7240-7244, 1993.
- 30) **Konishi, Y., Tsutsumi, M. and Tsujiuchi, T.** : Mechanistic analysis of pancreatic ductal carcinogenesis in hamsters. *Pancreas* **16**(3) : 300-306, 1998.
- 31) **Kaji, M., Ishikura, H., Kishimoto, T., Omi, M., Ishizu, A., Kimura, C., Takahashi, T., Kato, H. and Yoshiki, T.** : E-selectin expression induced by pancreas carcinoma derived interleukin-1 α results in enhanced adhesion of pancreas carcinoma cells to endothelial cells. *Int. J. Cancer* **60** : 712-717, 1995.
- 32) **Stephens, R. W., Nielsen H. J., Christensen, I. J., Thorlacius-Ussing, O., Sorensen, S., Dano, K. and Brunner, N.** : Plasma urokinase receptor levels in patients with colorectal cancer : relationship to prognosis. *J. Natl. Cancer Inst.* **91** (10) : 869-874, 1999.
- 33) **Hudson, M. A. and McReynolds, M.** : Urokinase and the urokinase receptor : association with in vitro invasiveness of human bladder cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**(10) : 709-717, 1997.
- 34) **Yu, H. and Schultz, R. M.** : Relationship between secreted urokinase plasminogen activator activity and metastatic potential in murine B16 cells transfected with human urokinase sense and antisense genes. *Cancer Res.* **50** : 7623-7633, 1990.
- 35) **Murphy, G., Atkinson, S., Ward, R., Gavrilovic, J. and Reynolds, J. J.** : The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **667** : 1-12, 1992.
- 36) **Odekon, L. E., Blasi, F. and Rifkin, D. B.** : Requirement for receptor-bound urokinase in plasmin-dependent cellular conversion of latent TGF-beta to TGF-beta. *J. Cell Physiol.* **158** : 398-407, 1994.
- 37) **Mignatti, P. and Rifkin, D. B.** : Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* **49** : 117-137, 1996.
- 38) **Iki, K., Tsutsumi, M., Kido, A., Sakitani, H., Takashima, M., Yoshimoto, M., Motoyama, M., Tatsumi, K., Tsunoda, T. and Konishi, Y.** : Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), membranetype 1 MMP and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 and activation of proMMP-2 in pancreatic duct adenocarcinomas in hamsters treated with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl) amine. *Carcinogenesis* **20**(7) : 1323-1329, 1999.