

Nicotinamide の *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine による ハムスター膵発癌ポストイニシエーション期の抑制

奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室

三井雅之

INHIBITION BY NICOTINAMIDE OF THE POST-INITIATION PHASE OF *N*-NITROSOBIS(2-OXOPROPYL)AMINE-INDUCED PANCREATIC CARCINOGENESIS IN HAMSTERS

MASAYUKI MITSUI

Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University

Received October 11, 2000

Abstract : Nicotinamide (NA) is synthesized from tryptophan and other amino acids in human bodies, or supplemented foods as one of vitamins. In this study, the chemopreventive effects of NA on pancreatic duct carcinogenesis initiated with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) in Syrian hamsters were investigated. Female 5-week-old hamsters were given three weekly subcutaneous injections of BOP at a dose of 10 mg/kg body weight followed by 0.5 % (Group 1) or 0.2 % NA (Group 2) in drinking water for 49 weeks. Additional groups received the BOP injection alone (Group 3), or 0.5 % (Group 4) or 0.2 % NA (Group 5) in drinking water without BOP injections. Group 6 served as a non-treated control. All animals were sacrificed at 52 weeks after the beginning of the experiment and proliferative lesions in the pancreas were histopathologically assessed. All animals showed no toxic signs including growth retardation. The incidences and multiplicities of dysplastic lesions in the exocrine pancreas were significantly lower ($p < 0.05$) in Groups 1 and 2 than in Group 3, but NA did not affect the incidence and multiplicity of pancreatic adenocarcinomas. Morphometrically, the number and area of islets increased in hamsters given NA. Pancreatic hepatocytes appeared in the pancreas of hamsters given BOP and NA but there was no difference in the incidence of these cell populations. In other organs, the incidences and multiplicity of hyperplasia in the lung were more significantly decreased ($p < 0.05$) in Group 1 than in Group 3, and there was statistically more significant increase ($p < 0.05$) in the multiplicity of intrahepatic cholangiocellular carcinoma in Group 2 than in Group 3. The present results indicate that pancreatic carcinogenesis was inhibited by NA when administered during the post-initiation phase of carcinogenesis by BOP in hamsters. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 51, 446~457, 2000)

Key words : nicotinamide, pancreatic carcinogenesis, hamster, *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP), inhibition

緒 言

近年、日本人の主要な死因は、結核などの感染症から脳血管疾患、がんなどの成人病に移行しつつあり、がんは1981年以降の死亡原因の第1位となっている。その後もがんの死亡率は増加の一途をたどり、1994年にはがんによる死亡者数は約24万4千人に達し、総死亡者数の27.8%をも占めるに至った¹⁾。早期診断・早期治療などの医療技術の進歩により、がんの治療成績は徐々にではあるが確実に向上し、胃癌あるいは子宮癌の死亡率は減少傾向にある。その一方で、治療成績が上がらない難治性癌があり、その代表的なもの1つとして膀胱癌が挙げられる。膀胱癌の切除率は約30%、切除後の5年生存率は約20%である²⁾ことから、難治性膀胱癌の制御のためには化学予防物質を検索することは重要な研究課題となっている。

ニコチン酸アミド nicotinamide (NA)(Fig. 1)は、微生物の発育因子などとして自然界に広く分布し、植物界ではニコチン酸と相互に変換して存在する。またNAは生体内酸化還元反応の重要な補酵素である nicotinamide adenine dinucleotide(NAD⁺)や nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺)の構成成分として体内に分布し、ビタミンB複合体を構成する栄養素のひとつでもある。ヒトでは腸内細菌によりトリプトファンから合成され得る。性状は無色、水溶性の結晶で、肉をはじめ、肝臓、魚、全小麦粒、卵など多くの食品中に含まれる³⁾。主な用途としては、食品栄養学的な作用に基づいてビタミンの強化剤や乳児用調製粉乳などの食品や清涼飲料などとして、また

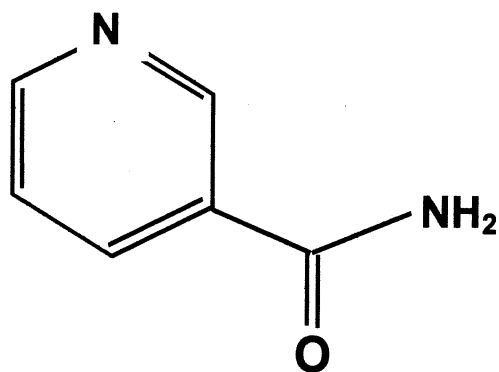


Fig. 1. Structure of nicotinamide

飼料の栄養強化剤や医薬品としても使用されており、今後も使用量の増加が予想されている。

実験動物に膀胱癌を誘発するモデルとして、ラットに azaserine^{4,5)}、4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide^{6,7)}などを投与する方法、ハムスターに *N*-nitrosobis(2-oxopropyl) amine (BOP)関連ニトロソ化合物を投与する方法⁸⁻¹¹⁾が知られている。しかし、ラットではヒトで稀な腺房細胞由来の癌が発生するのに対し、ハムスターではヒト膀胱癌の中で最も高頻度かつ悪性である膀胱癌が発生することから、ハムスターを用いた実験モデルがヒト膀胱癌抑制物質検索に適切かつ有用な系である。また、ハムスターを用いた膀胱癌モデルとしては、methionine および ethionine を用いた augmentation pressure によって短期間に膀胱の腫瘍性病変を誘発する方法^{8,9,12,13)}と BOP を1~4回皮下投与し、約40週間の期間を経て膀胱癌を誘発するイニシエーション-プロモーションプロトコール^{14,15)}がある。本研究は、後者のプロトコールによるハムスター膀胱癌モデルを用いて BOP によるポストイニシエーション作用に対する NA の影響について検討した。

実験材料および方法

実験のプロトコールを Fig. 2 に示す。5週齢の雌シリアンハムスター(日本 SLC:静岡)120匹を用い、MF 固形飼料(オリエンタル酵母社製:東京)を自由に与えた。BOP はナカライテスク(京都)から購入した。BOP は滅菌生理食塩水にて溶解し、NA は有機化学合成薬品工業(東京)から購入し、イオン交換水にて溶解し飲水投与した。飲水は週2回の割合で交換した。

実験は、ハムスターを6群に分け、第1群、第2群および第3群(各群30匹)には10 mg/kg 体重の BOP を1週間に1度の割合で3回背部皮下に投与した。BOP 最終投与1週間後から第1群および第2群には0.5%および0.2%の濃度で NA を飲水水中に混じて49週間自由に与えた。第3群は NA を含まないイオン交換水を自由に摂取させる BOP 単独群とした。第4群および第5群(各群10匹)はそれぞれ第1群および第2群に対する BOP 非投与対照群として、同時期より NA の濃度0.5%および0.2%溶液を飲水として投与した。第6群(10匹)は無処置対照群とした。NA の用量に関しては、予備試験をおこない、飲水量に影響の認められなかった0.5%を最高濃度とした。また、飲水量は給水瓶交換時に給残量から毎回測定算出し、体重は月1度の割合で測定した。

動物は実験開始から52週にてエーテル深麻酔下で放血致死させ、肉眼的に諸臓器を観察した。その後、膀胱、

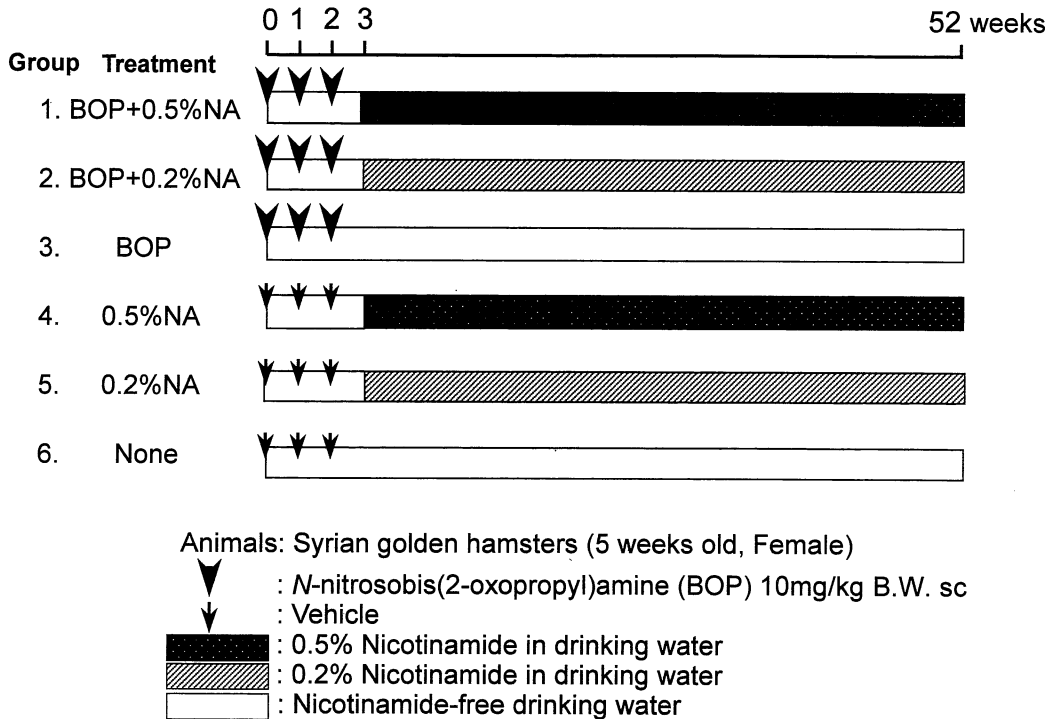


Fig. 2. Experimental design

肺, 腎臓, 肝臓, 気管および副腎を採取し, 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した. その後アルコール系列にて脱水後パラフィン包埋をおこない, 薄切切片を作製の上, ヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色を施し, 腫瘍性病変の有無を中心に病理組織学的検索を行った. 膵臓は, 胃葉, 脾葉, 十二指腸葉および頭部の4つの解剖学的区域が判別できるように固定の上, Fig. 3に示すようにそれぞれの部分の組織標本を作製した¹⁶⁾. なお, 膵腫瘍の発生が実験開始28週後の死亡例で最初に認められたことから, それ以降の死亡例をも有効動物とし, 生存例とともに病理組織学的検索を実施した. BOP非投与群である第4群, 第5群および第6群については, 膵臓のH-E染色標本を用いて, 脾葉と胃葉におけるランゲルハンス氏島(ラ氏島)の単位面積当たりの数とその面積, 平均直径, 周囲長をIPAP画像解析装置(住化テクノス社製:大阪)を用いて計測した.

統計学的評価法として, 病変の発生率については χ^2 検定, 体重, 臓器重量および病変の動物1匹あたりの発生個数については分散分析を用いた.

結 果

1. 生存日数および生存率

実験終了時の生存匹数および実験期間中の平均生存日数は, 第1群で30匹中16例, 344.6±50.9日, 第2群で30匹中19例, 348.1±54.2日, 第3群で30匹中18例, 333.7±74.9日, 第4群で10匹中8例, 358.8±47.5日, 第5群で10匹中10例, 379.0±0日および第6群で10匹中8例, 362.0±41.6日であった. 平均生存率については, BOP投与群ではNAの併用投与により生存日数が延長する傾向がみられたものの有意なものではなかった. BOP非投与群には生存率における明らかな群間差はなく, NA投与による生存率への影響はみられなかった.

2. 体重推移

実験期間中の体重推移はFig. 4に示す如く, NA投与初期においては第6群に比較して, 他の群では体重増加の抑制傾向が認められたが, 28週目頃から第6群に比し, 平均体重がむしろ増加する傾向がみられた. 剖検時最終体重は, 第1群で188±26g, 第2群で163±33g,

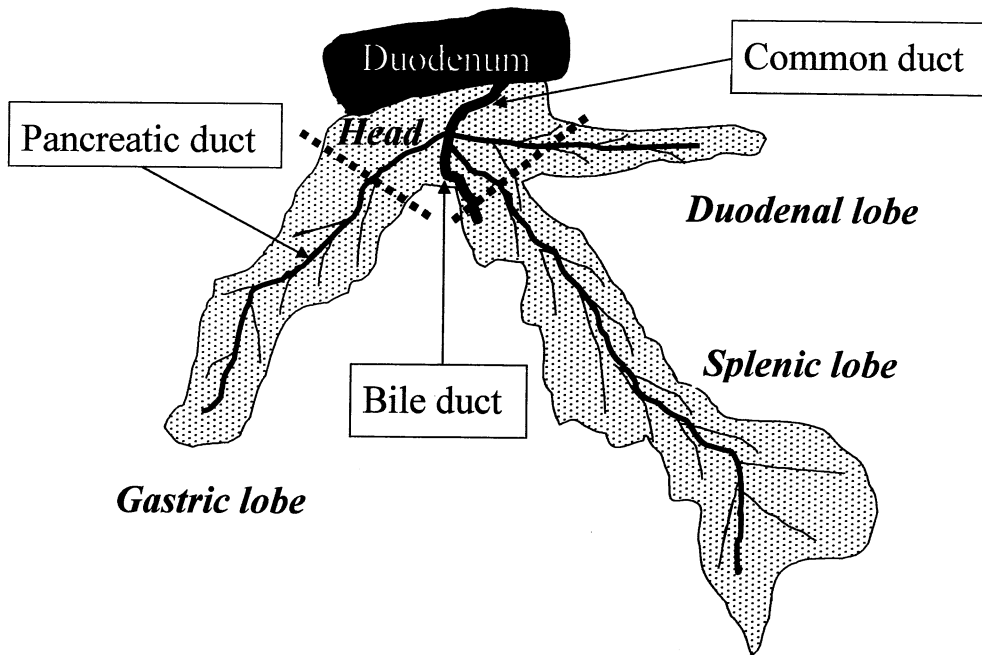


Fig. 3. Portion of pancreas of Syrian hamster

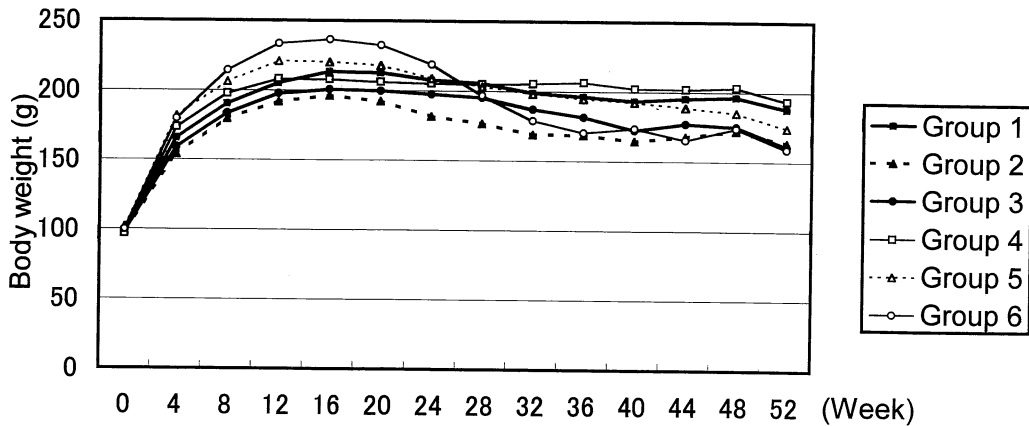


Fig. 4. Body weight changes in hamster treated with BOP and/or nicotinamide

第3群で 161 ± 26 g, 第4群で 194 ± 34 g, 第5群で 174 ± 30 g および第6群で 159 ± 21 g であった. 第1群では第6群に比し, 有意な ($P < 0.01$) 体重の増加が認められた. BOP 投与群間および BOP 非投与群間で NA 投与に依存した体重増加傾向がみられたが, 統計学的有意差は認められなかった.

3. NA 摂取量

実験期間中の飲水摂取量は第6群で最も多く, 次いで第3群が多く, NA を含む群では飲水摂取量が減少傾向にあった. また NA 投与群間でも高濃度群で低濃度群よりも低値の傾向が投与期間を通じて観察され, 飲水忌避の傾向が認められた. 最終的な1匹1日あたりの平均飲

水量は Table 1 に示した如く、第 3 群の 26.94 mL/日/動物に対し、第 1 群および第 2 群では 11.05 mL/日/動物および 15.89 mL/日/動物であり、第 6 群の 30.63 mL/日/動物に対し、第 4 群および第 5 群では 12.21 および 18.41 mL/日/動物であった。各群の NA 摂取量は第 1 群で 55.25 mg/日/動物、第 2 群で 31.78 mg/日/動物、第 4 群で 61.05 mg/日/動物、第 5 群で 36.82 mg/日/動物と算出された。

4. 膵臓の増殖性病変

膵臓の増殖性病変を腺癌と膵管異形成に判定した結果は Table 2 に示す。また、これらの病変の発生部位につき検索した結果は Table 3 に示す。

腺癌の多くは高分化型ないし中分化型管状腺癌であり、高円柱状ないし立方状の異型細胞が小腺管構造を形成し、線維増生を伴い間質への浸潤を示した(Fig. 5.1)。細胞異型や構造異型が浸潤癌と同様に高度で、明らかな間質

Table 1. Water and NA intake by hamster treated with BOP and/or nicotinamide

Group	Treatment	NA concentration (%)	Water intake (mL/day/animal)	NA intake (mg/day/animal)
Group 1	BOP+0.5% NA	0.5	11.05	55.25
Group 2	BOP+0.2% NA	0.2	15.89	31.78
Group 3	BOP	0	26.94	0
Group 4	0.5% NA	0.5	12.21	61.05
Group 5	0.2% NA	0.2	18.41	36.82
Group 6	None	0	30.63	0

Table 2. Incidence and multiplicity of pancreatic ductal lesions in hamsters treated with BOP followed by nicotinamide

Group	Treatment	Effective no. of animals ^{a)}	Incidence(%)			Multiplicity ^{c)}		
			Adc ^{b)}	Dys	Total	Adc	Dys	Total
Group 1	BOP+0.5% NA	30	21(70.0)	8(26.6)*	25(83.3)	1.00±0.94	0.33±0.66*	1.33±1.09*
Group 2	BOP+0.2% NA	29	18(62.0)	8(27.5)*	22(75.8)	1.27±1.79	0.41±0.77*	1.68±1.75
Group 3	BOP	30	18(60.0)	20(66.6)	26(86.6)	1.23±1.50	1.06±1.01	2.30±1.80
Group 4	0.5% NA	10	0	0	0	0	0	0
Group 5	0.2% NA	10	0	0	0	0	0	0
Group 6	None	10	0	0	0	0	0	0

^{a)} Based on histological examination

^{b)} Adc : adenocarcinoma, Dys : dysplastic lesion

^{c)} Mean±SD

* p<0.05 compared with the BOP alone group

Table 3. Distribution of proliferative lesions in hamster pancreas treated with BOP followed by nicotinamide

Group	Treatment	Splenic lobe		Gastric lobe		Doudenal lebe		Head	
		Adc ^{a)}	Dys	Adc	Dys	Adc	Dys	Adc	Dys
Group 1	BOP+0.5% NA	0.46±0.63	0.14±0.45	0.38±0.49	0.15±0.36	0	0	0.31±0.47	0.09±0.29
Group 2	BOP+0.2% NA	0.44±0.68	0.17±0.47	0.42±0.64	0.11±0.32	0.06±0.25	0	0.48±0.77	0.16±0.37
Group 3	BOP	0.40±0.72	0.36±0.66	0.55±0.78	0.31±0.54	0.07±0.26	0.07±0.26	0.30±0.54	0.42±0.70
Group 4	0.5% NA	0	0	0	0	0	0	0	0
Group 5	0.2% NA	0	0	0	0	0	0	0	0
Group 6	None	0	0	0	0	0	0	0	0

^{a)} Adc : adenocarcinoma, Dys : dysplastic lesion

The values are mean±SD(No./animals).

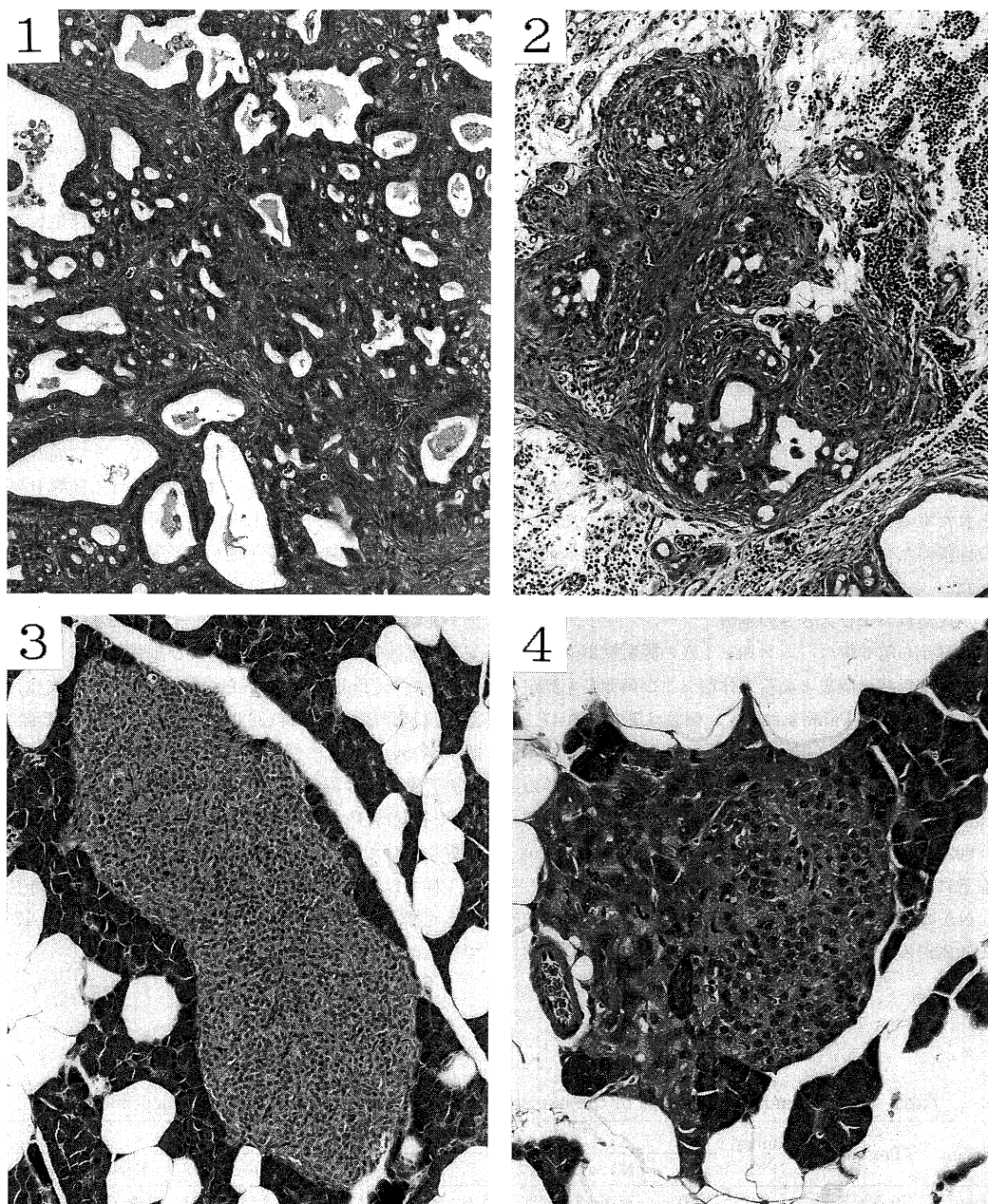


Fig. 5. 1 ; Ductal adenocarcinoma in the pancreas of hamster treated with BOP and nicotinamide. (H.E., $\times 100$).
2 ; Ductal dysplastic lesion in the pancreas of hamster treated with BOP and nicotinamide. (H.E., $\times 100$).
3 ; Enlarged pancreatic islet of hamster treated with nicotinamide. (H.E., $\times 100$).
4 ; Pancreatic hepatocytes in the pancreas of hamster treated with BOP and nicotinamide. (H.E., $\times 200$).

浸潤を伴わないいわゆる上皮内癌も、本実験では腺癌に含めて評価した。しばしば周囲にリンパ球などの細胞浸潤を伴い中等度の異型性を有する膵管上皮の限局性増殖性病変のみを膵管異形成(Fig. 5. 2)と判定し、異型のないまたは軽度な単純過形成は除外した。腺癌および膵管異形成の発生率は、第1群で30匹中21例(70.0%)および8例(26.6%)、第2群で29匹中18例(62.0%)および8例(27.5%)、第3群で30匹中18例(60.0%)および20例(66.6%)であった。したがって、統計的に異形成は第3群に比し、第1群と第2群で有意に($P < 0.05$)減少した。また、異形成の動物1匹あたりの発生個数は第3群1.06個に比し、第1群0.33個および第2群0.41個で有意に($P < 0.05$)減少した。腫瘍性病変全体(腺癌と異形成の合計)では第3群2.30個に比し、第1群1.33個で有意に($P < 0.05$)減少した。葉別にみた結果では、群間に有意な差は認められなかった。各葉間では若干の相違が認められたものの、これは葉の総面積に基づく差であり、単位面積当たりの異形成・腺癌の発生に差は認められなかった。

5. ラ氏島数および大きさの解析

第4群から第6群のハムスター1匹の膵組織単位面積当たりのラ氏島の個数と面積、体積および周囲長を測定・算出した結果をTable 4に示す。個数は第6群の47.0±14.6個に比し、第4群では72.6±15.4個と有意に($P < 0.01$)増加した。また、第5群でも有意差はないものの増加傾向を示した。ラ氏島の平均面積は第6群の0.0105±0.0021 mm²に比し、第4群では0.0125±0.0014 mm²で有意に増加し($P < 0.05$)、第5群でも増加傾向を示した。NAの濃度に依存性してラ氏島の数と大きさが増加する傾向がみられた。同様に平均直径を基に算出した体

積では、第6群の0.0009に対し、第4群では0.0013と有意に増加し、周囲長も第4群で長い傾向を示した。第4群、第5群および第6群における典型的な大型のラ氏島の組織像をFig. 5.3に示す。

6. 膵臓肝細胞の出現

ラ氏島周囲の膵外分泌組織中にみられる好酸性細胞である膵臓肝細胞の発生数を検索した。その多くがBOP投与群で発生し、非投与群では第6群で1例発生したのみであった。膵臓肝細胞発生率および動物1匹あたりの発生個数は、Table 5に示すように、第3群で20.0%、0.43個に比し、第1群で36.6%、2.00個、第2群で24.1%、0.44個といずれも有意差は認められなかった。代表的な膵臓肝細胞の組織像をFig. 5.4に示す。

7. 他臓器の増殖性病変

第1群、第2群および第3群において、その他の臓器で発生した腫瘍性病変としては、肺における肺胞上皮過形成、腺腫、腺癌、扁平上皮癌が、腎臓では過形成、腎細胞腺腫、腎細胞癌、腎芽腫が、肝臓では肝細胞小増殖巣、肝腺腫、肝細胞癌、肝内胆管腺腫、胆管癌、嚢胞腺腫が比較的高頻度に認められた。その他頻度は低いが、気管の乳頭腫、甲状腺の腺腫および副腎の皮質過形成が観察された(Table 6)。これらの発生頻度に関しては、肺胞上皮過形成が第3群(30匹中25例)に比し第1群(30匹中17例)で有意に($P < 0.05$)減少した。しかし一方、肝内胆管癌が第3群(30匹中0例)に比し第2群(29匹中5例)で有意に($P < 0.05$)増加した。動物1匹あたりの発生個数に関しては、腎臓の過形成が第3群で0.20個に対し第1群では0個と有意($P < 0.05$)に減少し、一方発生頻度と同様、肝内胆管癌が第3群0個に比し第2群0.17個で有意に($P < 0.05$)増加した。

Table 4. Morphometric analysis of the hamster endocrine pancreas treated with nicotinamide

Group	Treatment	Animal No.	Islet				
			No.	No./animal ^{a)}	Area(mm ²) ^{a)}	Volume(mm ³) ^{a)}	Perimeter(mm) ^{a)}
Group 4	0.5% NA	8	581	72.6±15.4**	0.0125±0.0014*	0.0013±0.0002*	0.7236±0.0723
Group 5	0.2% NA	10	627	62.7±18.8	0.0118±0.0029	0.0011±0.0004	0.6650±0.1122
Group 6	None	9	423	47.0±14.6	0.0105±0.0021	0.0009±0.0003	0.6881±0.0926

^{a)}: The values are mean±SD.

*: Significantly different from Group 6 at $p < 0.05$

** : Significantly different from Group 6 at $p < 0.01$

Table 5. Incidence and multiplicity of pancreatic hepatocytes in hamsters treated with BOP followed by nicotinamide

Group	Treatment	Animal No.	Pancreatic hepatocytes		No./animal ^{a)}
			Incidence(%)	No.	
Group 1	BOP+0.5% NA	30	11(36.6)	60	2.00±5.13
Group 2	BOP+0.2% NA	29	7(24.1)	13	0.44±1.05
Group 3	BOP	30	6(20.0)	13	0.43±0.93
Group 4	0.5% NA	8	0	0	0
Group 5	0.2% NA	10	0	0	0
Group 6	None	9	1(11.1)	1	0.13±0.31

^{a)} : The values are mean±SD.

Table 6. Site of proliferative lesions in hamsters treated with BOP followed by nicotinamide

Group		Incidence(%) ^{a)}			Multiplicity ^{b)}		
		Group 1	Group 2	Group 3	Group 1	Group 2	Group 3
		BOP+0.5% NA	BOP+0.2% NA	BOP	BOP+0.5% NA	BOP+0.2% NA	BOP
Lung	Hyperplasia	56.7*	72.4	83.3	1.80±2.11	1.63±1.45	2.57±2.27
	Adenoma	56.7	62.1	50.0	1.03±1.22	0.87±0.94	0.83±0.99
	Adenocarcinoma	30.0	27.6	36.7	0.33±0.55	0.33±0.61	0.63±1.07
	Squamous cell carcinoma	6.7	0.0	6.7	0.07±0.25	0	0.07±0.25
Kidney	Hyperplasia	0.0	10.3	16.7	0*	0.10±0.31	0.20±0.48
	Renal cell adenoma	6.7	3.4	0.0	0.13±0.57	0.03±0.18	0.03±0.18
	Renal cell carcinoma	6.7	3.4	3.3	0.13±0.51	0.03±0.18	0.07±0.25
	Nephroblastoma	0.0	0.0	6.7	0	0	0.13±0.35
Liver	Hepatocellular foci	13.3	17.2	16.7	0.17±0.46	0.30±0.75	0.17±0.38
	Hepatocellular adenoma	13.3	13.8	6.7	0.17±0.46	0.17±0.46	0.07±0.25
	Hepatocellular carcinoma	6.7	3.4	6.7	0.07±0.25	0.03±0.18	0.07±0.25
	Cholangiocellular adenoma	10.0	6.9	3.3	0.10±0.31	0.10±0.40	0.03±0.18
	Cholangiocellular carcinoma	10.0	17.2*	0.0	0.10±0.31	0.17±0.38*	0
	Cystadenoma	6.7	0.0	0.0	0.07±0.25	0	0
Trachea	Papilloma	0.0	0.0	3.3	0	0	0.03±0.18
Thyroid	Adenoma	0.0	0.0	3.3	0	0	0.03±0.18
Adrenal	Cortical hyperplasia	6.7	0.0	10.0	0.03±0.18	0	0.10±0.31

^{a)} Effective numbers of hamsters : Group 1 ; 30, Group 2 ; 29, Group 3 ; 30

^{b)} The values are mean±SD

* : Significantly different from Group 3 at $p < 0.05$

考 察

ハムスターにおける BOP 膵発癌過程のポストイニシエーション期に NA を投与すると、0.5% および 0.2% NA は膵管異形成の発生頻度を抑制するとともに動物 1 匹あたりのその数を減少させ、さらに 0.5% NA は膵管癌と膵管異形成を総計した動物 1 匹あたりの数をも減少

させた。この結果は、NA が BOP による膵発癌を抑制したことを示している。Pour ら¹⁷⁾ は、ハムスターにおける BOP 膵発癌過程のイニシエーション期に NA を腹腔内投与することによる膵癌発生の有意な抑制を報告している。今回の実験により、NA はイニシエーション期およびポストイニシエーション期の両期のいずれに投与することによっても BOP 誘発膵発癌抑制作用を有することが

示された。

NAの膵に対する影響としては、NAがラットにおけるストレプトゾトシンによるラ氏島 β 細胞障害を抑制し、その結果ラ氏島依存性の糖尿病の発症を抑制するとの報告がある^{18,19)}。この現象は、NAがストレプトゾトシンによるNADの枯渇を防止し、ポリADPリボースポリメラーゼ(PARP)のDNA修復作用を発揮せしめ、ストレプトゾトシンによる β 細胞障害を阻止するためと説明されている¹⁹⁾。一方、本実験で認められたNAによる膵発癌抑制は、ポストイニシエーション期のものではあるが、NAがBOPによるハムスターの膵でのDNA障害をunscheduled DNA synthesis (UDS)以外の機序により修復しているとの報告²⁰⁾もあることから、PARPをも含め、何らかの抑制機序が働いたものと推察される。さらにNAはマウスの皮膚を7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)でイニシエートし、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)にてプロモートする皮膚発癌系でPARPを介する抗プロモーター作用を有しているとの報告²¹⁾、さらにオルニチン脱炭酸酵素活性を介したプロモーション過程での抑制作用の報告²²⁾もみられる。

NAのその他の生物学的作用としては、ヒト平滑筋細胞の培養系におけるDNA合成の抑制²³⁾がある。さらにNAはヒト臍静脈より得た血管内皮細胞の培養系でDNA合成を抑制すること²⁴⁾から血管増生を抑制する作用をも有していることが報告されている。その他膵ラ氏島の β 細胞の培養系(β TC1)にNAを添加したところtumor necrosis factor- α (TNF- α)の産生が抑制されたとの報告²⁵⁾、ヒト単球の培養系にlipopolysaccharide (LPS)を反応させた場合、NAはBリンパ球の増殖・分化に関連するinterleukin-1(IL-1)およびIL-6ならびにTNF- α の産生を減少させたとの報告²⁶⁾、糖尿病(肥満)マウスにおいては、主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)-IおよびII、細胞間接着分子(ICAM)-1の発現がNA投与により制御されるとの報告²⁷⁾もありNAは免疫への作用も有している。したがって、NAは、多彩な作用を有し、本研究による膵発癌抑制機構はNAの複雑な作用の結果と考えられる。

NAは、ストレプトゾトシンによるラ氏島 β 細胞障害を抑制することは知られているが、NAの長期投与によるラ氏島の変化の詳細な報告はない。本実験では、ラ氏島の数の増加および大型化がNAの投与量に依存して観察された。この事実は、ハムスターのラ氏島の大きさは加齢とともに減少傾向を示すとの報告¹⁶⁾と相反する結果で、NAによる変化と考えられる。ハムスターではラ

氏島のNAD量は肝臓など他の臓器に比べ少ない²⁸⁾。そのためNADの枯渇に陥りやすいことが加齢にともなうラ氏島の変化に関連すると考えられ、NAの投与によりNADの減少が抑制されたものと推察された。しかし、本実験で認められた大型化ラ氏島は若齢期ハムスターの膵臓でみられるものよりも大型であった。また、マウスにNAを14日間腹腔内投与した結果、ラ氏島細胞のDNA合成が増加したとの報告²⁹⁾、in vitroでラ氏島細胞を培養し、NAに暴露した結果、DNA合成が増加したとの報告もある³⁰⁾。これらのことから、NAはラ氏島細胞のDNA複製率を亢進させ、これによりラ氏島が大型化した可能性が考えられる。

本実験では0.5% NAによる膵管の腫瘍性病変の抑制とともに0.2% NAによる肝内胆管癌の増加が認められた。この結果は、NAの用量により二面的な作用を有することを示している。同様の膵および肝における発癌修飾作用の二面性はハムスターにおけるBOP発癌でのN-(4-hydroxyphenyl)retinamide¹³⁾ならびにアゼリン発癌におけるレチノイド³¹⁾においても認められている。また、ハムスターではcrude soybean trypsin inhibitor³²⁾で膵管癌の頻度の抑制と膵外分泌細胞増殖性変化の頻度の増加、oltipraz³³⁾で膵管異形成の頻度の増加と肺腺腫・腺癌の頻度の減少、cigarette smoke³⁴⁾でイニシエーション期投与での膵癌の頻度および数の抑制とプロモーション期投与での肺癌の頻度の増加などの報告もある。これら各化合物の腫瘍発生系に対する効果は、投与時期・期間の相違、動物種、臓器特異性など様々な要因により二面性に働くものと考えられる。

本実験で認められた膵臓肝細胞は膵組織中のラ氏島周囲に好酸性の細胞としてみられ、当初eosinophilic metaplasiaと呼ばれた³⁵⁾。その後、これらの細胞が正常肝細胞と形態学的および機能的に同一の細胞であり、膵の多彩な分化能が示された³⁶⁻³⁸⁾。この細胞は細胞質にグリコーゲン、アルブミンを有し、電子顕微鏡によっても肝細胞と極めて類似した形態を示し、毛細胆管をも有している³⁶⁾。Raoら³⁹⁾はラットに銅欠乏食を投与して膵萎縮を誘発し、その後に銅を補充して膵再生を促すと、多数の膵臓肝細胞が出現したと報告している。したがって、膵細胞の肝細胞への分化は肝の再生に関与する現象と考えられる。今回の結果からも、BOP投与と発生率との関係は有意ではなく、外分泌組織の萎縮の程度に依存した発癌とは関係のない変化であることが確認された。またNA投与群とNA非投与群間に本変化の発生に明確な差は認められず、NAは膵臓肝細胞誘導には影響しないことが示された。

以上の結果、ハムスターにおける BOP 膀胱癌過程のポストイニシエーション期に NA を投与すると、膀胱異形成の発生を抑制したが、NA の低用量群では肝内胆管癌の発生が促進された。膀胱化学予防物質の検索においては、種々の用量を用い、至適用量の検索がヒトへの化学予防の外挿のためには必須である。また、今回用いた NA の暴露量がヒトでどの程度にあたるかは定かではないが、極めて大量であると推察される。したがって、本実験の結果を安易にヒトに外挿することは困難であるが、NA のようなビタミン B 群の膀胱癌抑制作用についてのデータは乏しく、今後、食品などに含まれる化学予防物質の検索のための有用な基礎的情報となり得るものである。

結 語

N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine(BOP)を用いたハムスター二段階発癌モデルにおいて、ニコチン酸アミド(NA)の膀胱癌への影響を検討し、以下の結果を得た。

1. NA 0.5%および0.2%飲水投与による毒性所見はみられなかった。
2. BOP 投与群において、膀胱異形成および膀胱癌が発生した。
3. NA 0.5%および0.2%飲水投与により膀胱異形成の発生頻度および動物 1 匹あたりの発生個数が有意に減少した。また NA 0.5%飲水投与により膀胱癌および膀胱異形成総計の動物 1 匹あたりの発生個数が有意に減少した。
4. NA 投与により、ラ氏島の数の増加および大型化が生じた。
5. 膀胱肝細胞の出現に NA による影響はみられなかった。
6. NA 0.5%飲水投与により、肺の過形成の発生頻度および動物 1 匹あたりの発生個数が有意に減少した。
7. NA 0.2%飲水投与により肝内胆管癌の動物 1 匹あたりの発生個数が有意に増加した。

以上の結果より、ハムスターにおける BOP 膀胱癌過程のポストイニシエーション期に NA を投与すると、膀胱癌を抑制することが示された。

本稿を終えるにあたり、終始ご指導、御校閲を賜りました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ならびに堤 雅弘講師に深謝を捧げます。また、本稿の御校閲を賜りました奈良県立医科大学第一病理学教室市島國雄教授、第 3 内科学教室福井 博教授に深謝を捧げます。さらに本研究に直接御指導・御協力をいただいた国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験

研究センター病理部第一室西川秋佳室長、同古川文夫主任研究官に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 渡辺 昌：日本人のがん，金原出版社，東京，p5，1995。
- 2) Yamamoto, M. and Saitoh, Y.: Tumor spread and the factors influencing prognosis in patients with resected pancreatic carcinoma in Atlas of exocrine pancreatic tumors (Pour, P.M., Konishi, Y., Kloppel, G. and Longnecker, D.S. eds), Springer-Verlag, Tokyo, p237, 1994.
- 3) 鈴木郁生・野島庄七・谷村顕雄：食品添加物公定書解説書。第 7 版，廣川書店，東京，pp D-1005-D-1008，1999。
- 4) Longnecker, D. S. and Curphey, T. J.: Adenocarcinoma of the pancreas in azaserine-treated rats. *Cancer Res.* **35**: 2249-2258, 1975.
- 5) Povoski, S. P., Zhou, W., Longnecker, D. S., Roebuck, B. D. and Bell, R. R. Jr.: Stimulation of growth of azaserine-induced putative preneoplastic lesions in rat pancreas is mediated specifically by way of cholecystokinin-A receptors. *Cancer Res.* **53**: 3925-3929, 1993.
- 6) Konishi, Y., Denda, A., Yoshimura, H., Maruyama, H., Yokose, Y., Tanaka T. and Saito, K.: Effect of high-fat diet on the pancreatic tumorigenesis of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in partially pancreatectomized rats. in *Biology of Normal and Cancerous Exocrine Pancreatic Cells*, INSERM Symp. No.15 (Ribet, A., Pradayrol, L. and Susini, C., eds.) Elsevier/North-holland Biomedical Press, Amsterdam, pp317-325, 1980.
- 7) 伝田阿由美：膀胱部分切除ラットにおける 4-Hydroxyaminoquinoline 1-oxide による膀胱癌の発生とその機序に関する研究。奈医誌。 **33**: 549-568, 1982.
- 8) 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.

- 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) **Pour, P., Althoff, J. Kruger, 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.
- 11) **Takahashi, M., Pour, P., Althoff, J. and Donnelly, T.** : Sequential alteration of the pancreas during carcinogenesis in Syrian golden hamsters by *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Cancer Res.* **37** : 4602-4607, 1977.
- 12) **Mizumoto, K., Tsutsumi, M., Kitazawa, S., Denda, A. and Konishi, Y.** : Usefulness of rapid production model for pancreatic carcinoma in male hamsters. *Cancer Lett.* **49** : 211-215, 1990.
- 13) **笛木 修** : *N*-Nitrosobis(2-oxopropyl)amine によるハムスター膵と肝内胆管癌発生に対する *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide の影響. *奈医誌.* **50** : 375-385, 1999.
- 14) **Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K., Tanakamaru, Z., Miyauchi, M., Nakamura, H., Ikeda, T., Imazawa, T. and Hirose, M.** : Failure of phenethyl isothiocyanate to inhibit hamster tumorigenesis induced by *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine when given during the post-initiation phase. *Cancer Lett.* **141** : 109-115, 1999.
- 15) **Nishikawa, A., Furukawa, F., Ikezaki, S., Tanakamaru, Z. Y., Chung, F. L., Takahashi, M. and Hayashi, Y.** : Chemopreventive effects of 3-phenylpropyl isothiocyanate on hamster lung tumorigenesis initiated with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Jpn. J. Cancer Res.* **87** : 122-126, 1996.
- 16) **古川文夫** : ハムスターの膵臓癌発生過程における内分泌細胞の免疫組織学的解析. *名古屋市立大学医学雑誌.* **41** : 705-726, 1990.
- 17) **Pour, P. M. and Lawson, T.** : Modification of pancreatic carcinogenesis in the hamster model. XV. Preventive effect of nicotinamide. *J. Natl. Cancer Inst.* **73** : 767-770, 1984.
- 18) **Okamoto, H. and Yamamoto, H.** : DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase activation in pancreatic islets--a new aspect to development of insulin-dependent diabetes and pancreatic B-cell tumors. *Princess Takamatsu Symp.* **13** : 297-308, 1983.
- 19) **Yamamoto, H., Uchigata, Y. and Okamoto, H.** : Streptozotocin and alloxan induced DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islet. *Nature* **294** : 284-286, 1981.
- 20) **Lawson, T.** : Nicotinamide stimulates the repair of carcinogen-induced DNA damage in the hamster pancreas in vivo. *Anticancer Res.* **3** : 207-209, 1983.
- 21) **Ludwig, A., Dietel, M., Schauer, G., Mueller, K. and Hiltz, H.** : Nicotinamide and nicotinamide analogues as antitumor promoters in mouse skin. *Cancer Res.* **50** : 2470-2475, 1990.
- 22) **Gupta, K. P.** : Effects of nicotinamide on mouse skin tumor development and its mode of action. *Biomed. Environ. Sci.* **12** : 177-187, 1999.
- 23) **Cui, Y., An, S., Maturana, J. A., Wu, J. M. and Gutstein, W. H.** : The anti-proliferative effects of nicotinamide and 3-aminobenzamide on human smooth muscle cells in vitro. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **31** : 935-944, 1993.
- 24) **Hiromatsu, Y., Sato, M., Yamada, K. and Nonaka, K.** : Inhibitory effects of nicotinamide on recombinant human interferon-gamma-induced intercellular adhesion on cultured human endothelial cells. *Immunol. Lett.* **31** : 35-39, 1992.
- 25) **Yamada, K., Takane-Gyotoku, N., Inada, C. and Nonaka, K.** : Endogenous tumor necrosis factor-alpha production by a pancreatic beta-cell line : inhibitory effects of hydrocortisone and nicotinamide. *Life Sci.* **59** : 1423-1429, 1996.
- 26) **Hauschildt, S., Ulmer, A. J., Flad, H. D., Heyden, T. and Heine, H.** : ADP-ribosylation : role in LPS-induced phosphorylation of two cytosolic proteins (p 36/38) in monocytes. *Prog. Clin. Biol. Res.* **397** : 147-155, 1998.
- 27) **Papaccio, G., Ammendola, E. and Pisanti, F. A.** : Nicotinamide decreases MHC class II but not MHC class I expression and increases intercellular adhesion molecule-1 structures in non-obese diabetic mouse pancreas. *J. Endocrinol.*

- 160 : 389-400, 1999.
- 28) **Yamamoto, H., Uchigata, Y. and Okamoto H.** : DNA strand breaks in pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103** : 1014-1020, 1981.
- 29) **Sandler, S. and Andersson, A.** : Stimulation of cell replication in transplanted pancreatic islets by nicotinamide treatment. *Transplantation* **46** : 30-31, 1988.
- 30) **Sandler, S. and Andersson, A.** : Long-term effects of exposure of pancreatic islets to nicotinamide in vitro on DNA synthesis, metabolism and B-cell function. *Diabetologia* **29** : 199-202, 1986.
- 31) **Longnecker, D. S., Kuhlmann, E. T., and Curphey, T. J.** : Divergent effects of retinoids on pancreatic and liver carcinogenesis in azaserine-treated rats. *Cancer Res.* **43** : 3219-3225, 1983.
- 32) **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** : 2133-2135, 1992.
- 33) **Son, H.-Y., Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K., Miyauchi, M., Nakamura, H., Ikeda, T. and Hirose, M.** : Organ-dependent modifying effects of oltipraz on *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)-initiation of tumorigenesis in hamsters. *Cancer Lett.* **153** : 211-218, 2000.
- 34) **Nishikawa, A., Furukawa, F., Imazawa, T., Yoshimura, H., Ikezaki, S., Hayashi, Y. and Takahashi, M.** : Effects of cigarette smoke on *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced pancreatic and respiratory tumorigenesis in hamsters. *Jpn. J. Cancer Res.* **85** : 1000-1004, 1994.
- 35) **Pour, P., Mohr, U., Althoff, J. Cardesa, A. and Kmoch, N.** : Spontaneous tumors and common diseases in two colonies of Syrian hamsters. III. Urological system and endocrine glands. *J. Natl. Cancer Inst.*, **56** : 949-961, 1976.
- 36) **Scarpelli, D. G. and Rao, M. S.** : Differentiation of regenerating pancreatic cells into hepatocyte-like cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78** : 2577-2581, 1981.
- 37) **Rao, M. S., Subbarao, V., Luetkeke, N., and Scapelli, D. G.** : Further characterization of carcinogen-induced hepatocytelike cells in hamster pancreas. *Am. J. Path.* **110** : 89-94, 1983.
- 38) **Reddy, J. K., Rao, M. S., Qureshi, S. A., Reddy, M. K., Scarpelli, D.G., and Lalwani, N. D.** : Induction and origin of hepatocytes in rat pancreas. *J. Cell Biol.* **98** : 2082-2090, 1984.
- 39) **Rao, M. S., Subbarao, V. and Reddy, J. K.** : Induction of hepatocytes in the pancreas of copper-deleted rats following copper repletion. *Cell Differentiation* **18** : 109-117, 1986.