

N-Nitrosobis(2-oxopropyl) amine によるハムスター膾と
肝内胆管癌発生に対する
N-(4-hydroxyphenyl) retinamide 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

笛 木 修

EFFECTS OF *N*-(4-HYDROXYPHENYL)RETINAMIDE ON
PANCREATIC AND INTRA-HEPATIC BILE DUCT CARCINOGENESIS
BY *N*-NITROSOBIS(2-OXOPROPYL)AMINE IN HAMSTERS

OSAMU FUEKI

Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University

Received August 16, 1999

Abstract : Effects of *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR), a synthetic retinoid, on pancreatic duct and intra-hepatic bile duct carcinogenesis were investigated using a rapid production of pancreatic duct carcinomas in hamsters and the following results were obtained.

1. No toxic signs including growth retardation and loss of pancreas and liver weights of 4-HPR were observed.
2. As pancreatic ductal lesions, duct epithelial hyperplasia, atypical hyperplasia and adenocarcinoma were histologically observed.
3. The diet containing 0.0015 % 4-HPR reduced the numbers of atypical hyperplasia, adenocarcinoma and total ductal lesions.
4. The diet containing 0.01 % and 0.04 % 4-HPR increased the incidence and number of intra-hepatic bile duct carcinoma.

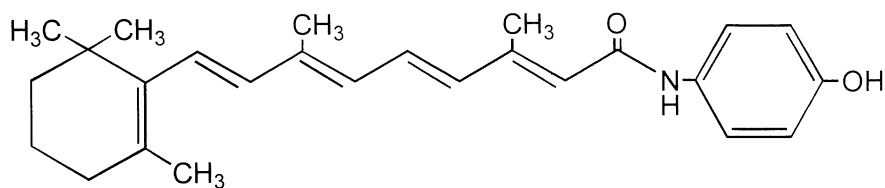
These results indicate that 4-HPR possesses diverse actions inhibiting pancreatic duct carcinogenesis in low doses, and enhancing intra-hepatic bile duct carcinogenesis in high doses. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 50, 375~385, 1999)

Key words : hamster, pancreas, liver, *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR), chemoprevention

緒 言

レチノイドは、臨床的に抗腫瘍作用を持つ物質として急性前骨髄球性白血病、子宮頸部癌や皮膚の扁平上皮癌などに使用されてきたが、肝臓への蓄積による毒性のため、その利用範囲は制限されてきた¹⁾。 *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR)は合成レチノイドで、1960

年代後半に米国で R. Gander によって合成されたものである (Fig. 1)²⁾。 4-HPR は動物実験において肝、乳腺、膀胱、肺、卵巣、皮膚、前立腺発癌に対する抑制効果が報告され³⁻⁵⁾、毒性も低い^{6,7)}、有望な化学予防物質と評価されてきた。一方、臨床においても 4-HPR は切除後乳癌の対側乳腺における発生予防⁸⁻¹⁰⁾、口腔内の白板症の癌への進展阻止^{9,11)}、基底細胞癌の切除後の再発予防^{8,9)}



Molecular formula : $C_{26}H_{33}NO_2$

Molecular weight : 391.6

Fig. 1. Chemical structure of *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR).

や子宮頸部癌のハイリスク群における発生予防¹²⁾の効果判定試験がすでに実施されている。

膀胱癌は、ヒトに発生する癌の中でも最も予後不良なものの一つであり、診断および治療技術の発達した今日においても早期発見は困難であり、切除率は約30%、術後の5年生存率は約20%である¹³⁾。ヒト膀胱癌で最も高頻度に発生し、かつ悪性度の高い膀胱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膀胱癌発生系がある¹⁴⁾。ハムスター膀胱癌は組織学的にも¹⁵⁾、また遺伝子異常の観点からも^{16,17)}ヒト膀胱癌に類似し、膀胱癌機構とその予防物質を検索するのに適する実験系とされている。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必要とするため、短期間で膀胱癌を発生せしめうる実験系の開発が望まれていた。Mizumoto et al.¹⁸⁻²⁰⁾は、ラットの肝発癌系において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という理論^{21,22)}を膀胱癌発生系に応用し、短期に膀胱癌を発生せしめうる系を確立した。この系においては膀胱癌変は膀胱上皮の過形成、異形過形成を経て、膀胱内癌、さらに浸潤癌へと進展するが¹⁵⁾、本実験では、過形成または異形過形成病変が発生している時期に4-HPRの投与を開始し、本物質によって膀胱癌変の癌への進展の抑制効果について検索した。さらにこの系においては肝内胆管上皮細胞も*N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)によりイニシエートされることより、4-HPRの肝内胆管癌発生に対する影響についても検索した。

材料と方法

1. 化学物質

被験物質である4-HPRはR. W. Johnson Pharmaceutical Research Institute (Spring house, PA)より供給を受けた。BOP, *DL*-ethionine, *L*-methionineはナ

カライテスク株式会社(京都)より購入し、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)はSigma Chemical Co. (St. Louis, MO)より購入した。

2. 実験プロトコール

動物は8週齢、体重約100g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)100匹を使用した。ハムスターは一群20匹として5群に分け、プラスチックケージ毎に5匹として飼育した。動物室は、温度23°C、湿度50%の条件下で12時間毎に昼夜の照明を施すべく調節した。食餌と水は自由摂取とし、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)、コリン欠乏食としてLombardi CD diet (Dyets Inc., Bethlehem, PA)を使用した。

実験プロトコールはFig. 2に示す。ハムスター短期膀胱癌発生モデルに基づき、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投与、*L*-methionineおよびBOP投与からなる一連の操作をaugmentation pressureと称し、本実験では実験開始後11日目と26日目より2回のaugmentation pressureを行った。第2回目augmentation pressure終了後、すなわち実験開始後50日目より4-HPRの投与を開始し、その投与量に従い、5つの実験群を作成した。第1群(対照群)は、基礎食を投与し、第2~5群は、4-HPRを0.0015, 0.004, 0.01あるいは0.04%の濃度で基礎食に添加したものを投与した群とした。これらの群に対し、病変の増殖状態を検索するため、各群5匹の動物に屠殺の2時間前に体重kgあたり30mgの

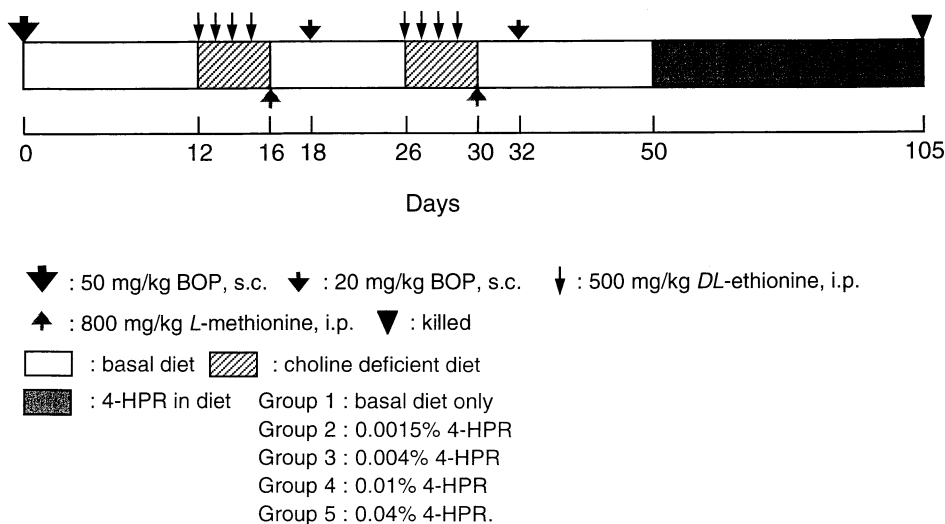


Fig. 2. Experimental design.

BrdU を腹腔内投与した。なお、BOP, DL-ethionine, L-methionine および BrdU は投与直前に生理食塩液に溶解し、BOP および BrdU は体重 kg あたり 10 ml の割合で、DL-ethionine および L-methionine は体重 kg あたり 20 ml の割合で投与した。

全動物は、実験開始後 105 日で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、剖検した。膵臓と肝臓を注意深く摘出し、重量測定をした後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。膵組織は濾紙上に伸展して固定し、脾葉×2、胃葉×2、十二指腸葉×1 の 5 箇所に分割して標本作製処理を行った。肝臓は、固定後に肉眼的な腫瘍数(直径 1 cm 以上の腫瘍を計数)を計測した。組織はパラフィン包埋した後に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。BrdU の免疫組織化学的染色は、一次抗体としてマウスの抗 BrdU モノクローナル抗体(DAKO, Denmark)を用い、二次抗体にはビオチン化ウサギ抗マウス IgG グロブリン(DAKO, Denmark)を使用した。発色は strept ABC complex / HRP キット(DAKO, Denmark)を使用し、ヘマトキシリンにより核染色を行った。BrdU の標識率は膵臓の膵管の過形成病変および異型過形成病変では 3,000 個の細胞を、膵管癌および肝内胆管癌では 4,000 個の細胞を計数し、核に BrdU の取り込みが観察された細胞の数を百分率で表した。

3. 統計学的手法

統計には SAS システム (Version 6.04, SAS Institute

Japan) を用いた。体重、臓器重量および病変数は Dunnett の T-test で、病変の発生頻度はカイ 2 乗法を用いて解析を行った。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、体重および臓器重量は Table 1 に示す。実験期間中の体重の変化は 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 4 匹、第 3 群で 20 匹中 1 匹、第 4 群で 20 匹中 3 匹、第 5 群で 20 匹中 5 匹が途中死亡した。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、augmentation pressure 終了後は一貫して増加が認められた。最終体重は、第 2 群で 194.9 ± 13.8 g、第 3 群で 190.5 ± 20.7 g と第 1 群の 186.5 ± 14.9 g に比して軽微な高値が、第 5 群で 174.1 ± 21.4 g と第 1 群に比して軽微な低値が観察されたが、有意差は認められなかった。臓器重量では、肝臓の相対重量において第 4 群で 8.8 ± 3.0 %、第 5 群で 8.1 ± 2.1 % と第 1 群の 7.0 ± 1.6 % に比して軽微な高値が観察されたが、有意差は認められなかった。食餌摂取量は Table 2 に示す。各投与群で、ハムスター 1 個体あたり 1 日 9~10 g の食餌が摂取され、各群間に差は認められなかった。ハムスターの 4-HPR 摂取量は、ヒト (体重 60 kg) の 1 日あたりの摂取量に換算すると第 2 群で 51.74 mg、第 3 群で 139.58 mg、第 4 群で 338.45 mg、第 5 群で 1400.65 mg に相当する

ものであった。

2. 低用量 4-HPR による膵発癌の抑制

膵病変の発生率および病変数は Table 3 に示す。本実験において認められた膵病変はいずれも膵管由来のものであり、膵管上皮の過形成、異型過形成および膵管癌に分類された (Fig. 4)。過形成病変、異型過形成病変、膵管癌の発生率はいずれの群においても 100% 近い値を示し、対照群と 4-HPR 投与群の間に有意差は認められなかった。個体あたりの膵病変数においては、第 2 群で第 1 群に比して減少が認められ、膵管上皮の異型過形成では、第 1 群の 4.8 ± 2.6 個に対して第 2 群では 2.6 ± 1.6 個 ($P < 0.05$)、膵管癌では、第 1 群の 4.9 ± 2.4 個に対して第 2 群では 3.1 ± 1.6 個 ($P < 0.05$)、総病変数では、第 1 群の 24.4 ± 5.1 個に対して第 2 群では 16.9 ± 5.5 個 ($P < 0.01$) と有意な減少が認められた。その他の 4-HPR 投与群では、第 1 群に比して有意な差は認められなかった。BrdU の標識率は Table 4 に示す。膵病変においては、膵管上皮過形成、異型過形成、膵管癌のいずれの病変においても第 1 群と 4-HPR 投与群の間に有意差は認められなかった。

3. 高用量 4-HPR による肝内胆管発癌の促進

肝内胆管癌の発生率および病変数は Table 5 に示す。本実験において認められた肝病変は、組織学的検索により肝内胆管癌であることが判明した (Fig. 4)。肝内胆管癌の発生率については、第 1 群の 17 例中 7 例 (41.2%) に比して、第 4 群で 17 例中 14 例 (82.4%) ($P < 0.05$)、第 5 群で 15 例中 14 例 (93.3%) ($P < 0.01$) と 4-HPR 0.01% 以上の投与群で有意に高値が認められた。肝内胆管癌の個体あたりの発生数についても第 1 群の 0.4 ± 0.5 個に比して、第 4 群で 2.1 ± 1.6 個 ($P < 0.01$)、第 5 群で 2.3 ± 1.2 個 ($P < 0.01$) と 4-HPR 0.01% 以上の投与群で有意に高値が認められた。BrdU の標識率 (Table 4) は、肝内胆管癌においては、第 1 群の $4.7 \pm 1.0\%$ に比して第 3 群で $5.4 \pm 0.7\%$ 、第 4 群で $5.6 \pm 0.5\%$ 、第 5 群で $5.4 \pm 0.4\%$ と 4-HPR 0.004% 以上の投与群で軽微な標識率の増加が認められたが、有意差は認められなかった。

考 察

本実験において低用量である 0.0015% 4-HPR は BOP による膵管発癌を抑制的に、また 0.01% と 0.04% の 4-HPR は肝内胆管発癌に促進的に作用することが判明した。レチノイドを用いた膵発癌に関する研究では BOP あるいはアザセリンによる膵癌発生に対し、その発生頻度の減少が報告され²³⁻²⁶⁾、少なくともレチノイドは膵発癌に対し、促進的にはたらく証拠のないことが示さ

Table 1. Number of animals, body weight and organ weight for BOP treated hamsters fed basal diet or basal diet supplemented with 4-HPR

Group	Compound and Dose	Initial No. of Animals	Effective No. of Animals	Body Weight (g)		Absolute Organ Weight		Relative Organ Weight	
				Initial	Final	Pancreas (g)	Liver (g)	Pancreas (%)	Liver (%)
1	Basal Diet	20	17	113.2 ± 6.0	186.5 ± 14.9	1.07 ± 0.48	13.0 ± 2.9	0.58 ± 0.27	7.0 ± 1.6
2	0.0015% 4-HPR	20	16	113.8 ± 5.8	194.9 ± 13.8	0.95 ± 0.43	12.0 ± 1.8	0.49 ± 0.22	6.2 ± 1.0
3	0.004% 4-HPR	20	19	114.0 ± 6.8	190.5 ± 20.7	0.96 ± 0.50	13.1 ± 2.9	0.51 ± 0.29	6.9 ± 1.5
4	0.01% 4-HPR	20	17	112.9 ± 7.5	184.6 ± 14.3	1.03 ± 0.32	16.2 ± 5.5	0.57 ± 0.19	8.8 ± 3.0
5	0.04% 4-HPR	20	15	113.1 ± 6.2	174.1 ± 21.4	1.08 ± 0.74	14.0 ± 3.2	0.61 ± 0.36	8.1 ± 2.1

Values are indicated as mean \pm standard deviation.
The relative organ weight was calculated as the percent of body weight.

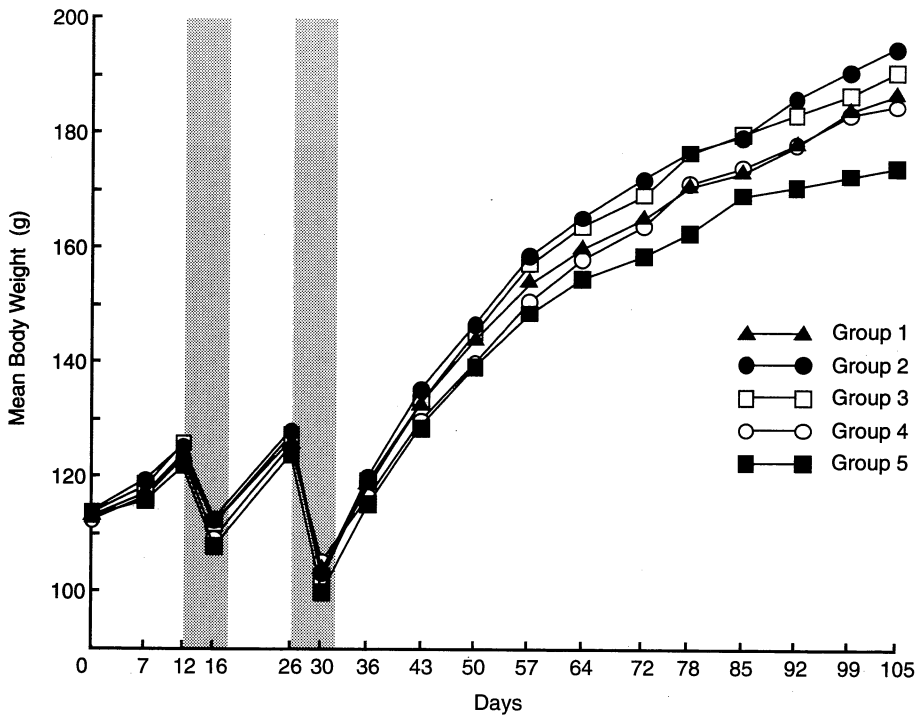


Fig. 3. Growth curves for BOP treated hamsters fed basal diet or basal diet supplemented with 4-HPR. Shaded columns indicate the augmentation pressure period.

Table 2. Food consumption for BOP treated hamsters fed basal diet or basal diet supplemented with 4-HPR

Group	Compound and Dose	Average Body Weight in Experiment Period (g)	Average Food Consumption per Day (g)	Average 4-HPR Consumption per Day (mg)	4-HPR Consumption Converted to Human Dose per Day (mg)
1	Basal Diet	168.4	9.35	—	—
2	0.0015% 4-HPR	174.6	10.03	0.15	51.74
3	0.004% 4-HPR	172.7	10.04	0.40	139.58
4	0.01% 4-HPR	167.0	9.42	0.94	338.42
5	0.04% 4-HPR	161.2	9.41	3.76	1400.65

Human body weight was hypothesized as 60 kg.

れている。近年、われわれの研究室で実施した実験²⁷⁾においても、βカロテン、パーマカロテン、緑茶ポリフェノールがBOPによる膵管発癌を抑制することが報告されている。また、Longnecker et al.²⁴⁾は4種のレチノイドを用い、アザセリンによるラット膵腺房細胞発癌と肝発癌について検索した結果、膵腫瘍はN-(4-pivaloyloxyphenyl)retinamideとN-(2,3-dihydroxypropyl)retinamide投与により減少するも、肝発癌の促進を見い

だしている。本実験においては低用量の4-HPRすなわち0.0015%群で、膵管の異型過形成と膵管癌の数および膵の総病変数を減少せしめたが、肝内胆管発癌には影響を与えなかった。一方、高用量の4-HPRすなわち0.01%と0.04%群では膵管発癌には影響を与えなかったが、肝内胆管発癌を促進した。本実験結果より4-HPRはその用量に依存した二面的な作用を有することが判明し、この結果はレチノイドのアザセリン発癌における肝と膵

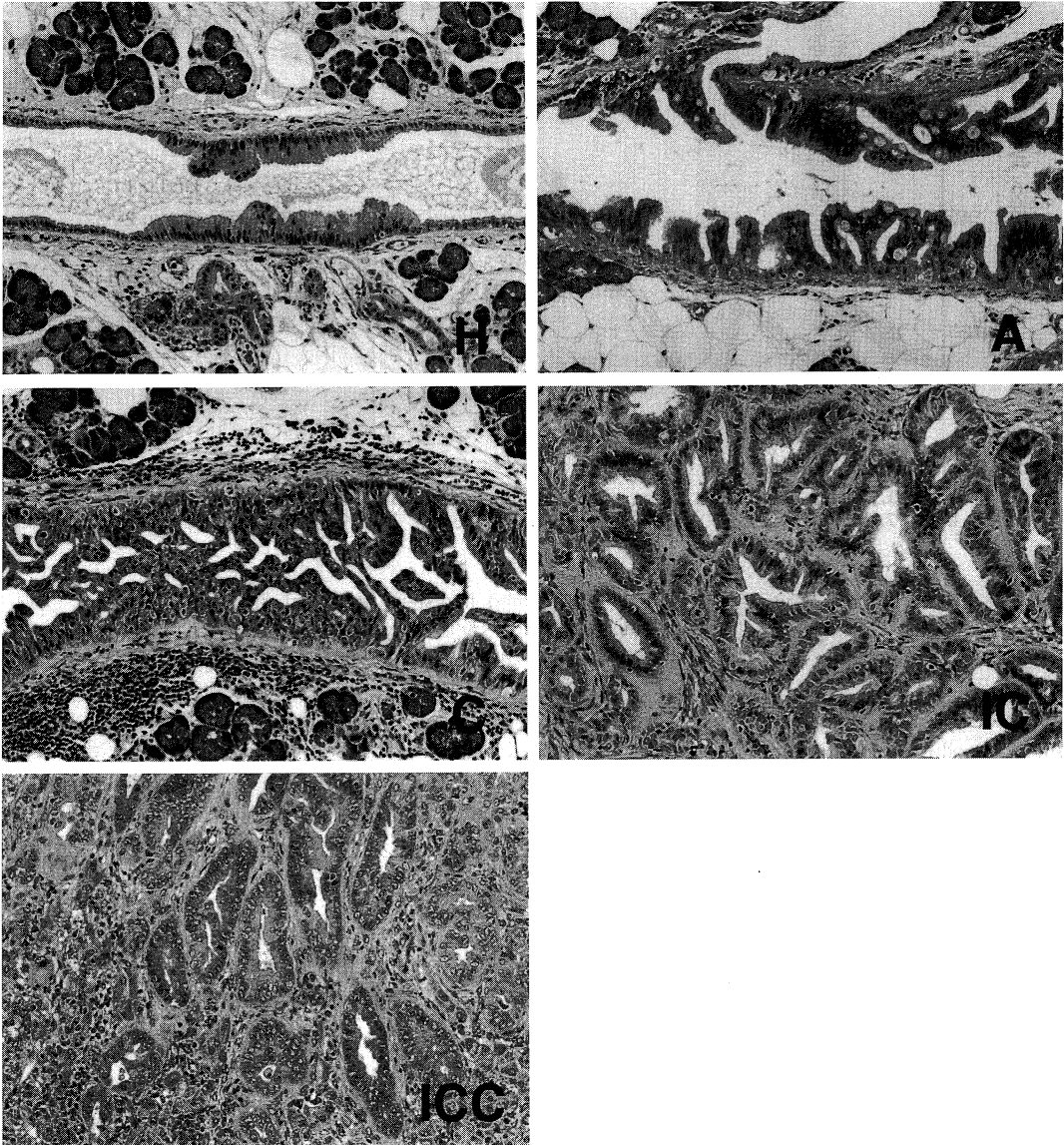


Fig. 4. Photomicrographs of pancreatic and hepatic lesions in hamsters induced by BOP. H : hyperplasia of pancreatic duct epithelium. A : atypical hyperplasia of pancreatic duct epithelium. C : intraductal carcinoma of pancreas. IC : invasive carcinoma of pancreas. ICC : intra-hepatic cholangiocarcinoma.

の二面性の効果の報告²⁴⁾と一致するものである。

Tamura et al.³⁾は、ラット肝発癌に対する 4-HPR と all-*trans*-retinoic acid の影響を検索し、4-HPR がコリン欠乏アミノ酸食による内因性肝発癌と diethylnitrosamine による外因性肝発癌のいずれをも抑制し、その抑制効果は all-*trans*-retinoic acid より強いことを報告した。このような結果の相違は、使用した動物種による代謝の違い、あるいは腫瘍性病変を誘発した化学物質の違いに起因するのではないかと推察した。肝腫瘍発生系に対してレチノイドを投与した過去の動物実験⁵⁾でも抑制効果を示すものと促進効果を示すものの両者が存在しており、レチノイドの肝腫瘍発生系に対する効果は、様々なファクターにより両者に働きうるものと考えられる。

4-HPR の抗腫瘍作用についてはアポトーシスが関与していることが示唆されている²⁸⁻³¹⁾。アポトーシスの誘導機構については、他のレチノイドに抵抗性を示す細胞においてアポトーシスを誘導することより、RAR, RXR 等のレチノイドレセプターを介さないアポトーシスの誘導機構の存在が示唆されてきた³²⁻³⁴⁾、Oridate et al.³⁵⁾により、4-HPR 投与により発生した活性酸素種がアポトーシスを誘導することが子宮癌の培養細胞系で報告された。さらに近年では、レチノイドレセプターを介する腫瘍細胞の増殖抑制機構の存在も示されてきている³⁶⁻³⁸⁾。

今回膵発癌を抑制した 4-HPR の用量は、ヒト体重 60 kg に換算すると 1 日約 50 mg となり、ヒト乳癌に対する化学予防剤として使用されている⁸⁻¹⁰⁾ 1 日 200 mg と比較して低用量であり、本研究より得られた知見はヒトへの外挿が可能な用量であると考えられる。肝内胆管発癌を促進した用量はヒトに換算すると 1 日 340 mg または 1,400 mg に相当し、この用量は乳癌予防に用いられている 1 日 200 mg より高用量である。したがって 4-HPR の膵癌発生と進展に関する予防薬としての可能性は 1 日 50 mg が日算量と考えられ、高用量での投与は肝内胆管発癌のリスクが増加する危険性を考慮すべきであると考えられた。

近年、レチノイドの癌治療と予防に対する臨床的ならびに基礎的研究の重要性が指摘されている^{39,40)}。低用量 4-HPR の膵発癌抑制機序については今後の研究課題であるとともに、ヒトへの外挿をする上での観点から、4-HPR 単独投与または他の化学予防薬との併用投与の是非に関する研究も必要であろう。

Table 3. Incidence and mean number of pancreatic lesions for BOP treated hamsters fed basal diet or basal diet supplemented with 4-HPR

Group	Compound and Dose	Effective No. of Animals	Incidence of Ductal Lesions (%)			Number of Pancreatic Lesions per Animal			Total Number of Pancreatic Lesions per Animal
			Hyperplasia	Atypical Hyperplasia	Carcinoma	Hyperplasia	Atypical Hyperplasia	Carcinoma	
1	Basal Diet	17	17 (100)	16 (94.1)	17 (100)	14.6±4.3	4.8±2.6	4.9±2.4	24.4±5.1
2	0.0015% 4-HPR	16	16 (100)	16 (100)	15 (93.8)	11.2±4.8	2.6±1.6*	3.1±1.6*	16.9±5.5**
3	0.004% 4-HPR	19	19 (100)	19 (100)	19 (100)	14.2±3.9	4.3±2.2	4.3±2.2	22.7±5.7
4	0.01% 4-HPR	17	17 (100)	17 (100)	17 (100)	14.1±4.5	4.3±1.9	5.0±2.4	23.4±5.9
5	0.04% 4-HPR	15	15 (100)	14 (93.3)	15 (100)	15.5±3.5	5.3±3.2	3.2±1.5	24.1±5.5

Values are indicated as mean±standard deviation. Significantly different from basal diet group at P<0.05 (*), P<0.01 (**) by Dunnett's t-test.

Table 4. BrdU labeling indices (%) for BOP treated hamsters fed basal diet or basal diet supplemented with 4-HPR

Group	Compound and Dose	Pancreas			Intra-hepatic Cholangiocarcinoma
		Hyperplasia	Atypical Hyperplasia	Carcinoma	
1	Basal Diet	1.6±0.7	2.7±0.8	4.6±1.8	4.7±1.0
2	0.0015% 4-HPR	1.5±0.9	2.6±0.6	4.3±2.9	5.0±0.8
3	0.004% 4-HPR	1.4±1.0	2.7±0.5	4.0±1.7	5.4±0.7
4	0.01% 4-HPR	1.2±0.7	2.8±1.1	4.3±2.0	5.6±0.5
5	0.04% 4-HPR	1.3±0.5	2.9±0.9	4.6±1.3	5.4±0.4

Values are indicated as mean±standard deviation.

Table 5. Incidence and mean number of intra-hepatic cholangiocarcinomas (ICC) for BOP treated hamsters fed basal diet or basal diet supplemented with 4-HPR

Group	Compound and Dose	Effective No. of Animals	Incidence of ICC (%)	Number of ICC per Animal
1	Basal Diet	17	7 (41.2)	0.4±0.5
2	0.0015% 4-HPR	16	8 (50.0)	0.8±0.9
3	0.004% 4-HPR	19	13 (68.4)	1.1±1.1
4	0.01% 4-HPR	17	14 (82.4)#	2.1±1.6**
5	0.04% 4-HPR	15	14 (93.3)##	2.3±1.2**

Values are indicated as mean±standard deviation.

Liver was observed grossly, and nodules over 1 cm in diameter were counted as ICC. Significantly different from basal diet group at P<0.05 (#), P<0.01 (##) by Chi-square test.

Significantly different from basal diet group at P<0.01 (**) by Dunnett's t-test.

結 語

ハムスターにおける短期膵管癌発生系を用い、合成レチノイドである *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) の膵管癌に対する影響について検索し、以下の結果を得た。

1. 4-HPR は、ハムスターの体重・膵臓・肝臓の重量に変化を与えず、毒性所見は見られなかった。
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. 4-HPR の 0.0015% 含有食は、膵臓における膵管病変の発生頻度に影響を与えなかったが、ハムスター 1 個体あたりの膵管上皮の異型過形成と膵管癌および総膵管病変数を減少せしめた。
4. 4-HPR の 0.01% と 0.04% 含有食は、肝内胆管癌の発生頻度を増加せしめ、またハムスター 1 個体あたりの癌の数を増加せしめた。

以上の結果より、4-HPR は、その低用量で膵管癌を抑制せしめ、高用量では肝内胆管癌を促進せしめる二相

性の作用を有することが判明した。

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。

本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附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 1 外科中野博重教授、第 3 内科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を賜った腫瘍病理学教室堤雅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辻内俊文助手、日本ワイスレダリー株式会社橋本英明氏をはじめとする諸兄に感謝いたします。

文 献

- 1) Smith, M. A., Parkinson, D. R., Cheson, B. D., and Friedman, A.: Retinoids in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* **10**: 839-864, 1992.

- 2) **Costa, A., Formelli, F., Chiesa, F., Decensi, A., De Palo, G. and Veronesi, U.** : Prospects of chemoprevention of human cancers with the synthetic retinoid fenretinide. *Cancer Res.* 54 (suppl.) : 2032s-20379, 1994.
- 3) **Tamura, K., Nakae, D., Horiguchi, K., Akai, H., Kobayashi, Y., Andoh, N., Satoh, H., Denda, A., Tsujiuchi, T., Yoshiji, H. and Konishi, Y.** : Inhibition by *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide and all-trans-retinoic acid of exogenous and endogenous development of putative preneoplastic, glutathione *s*-transferase placental form-positive lesions in the livers of rats. *Carcinogenesis*, 18 : 2133-2141, 1997.
- 4) **Moon, R. C.** : Comparative aspects of carotenoids and retinoids as chemopreventive agents for cancer. *J. Nutr.* 119 : 127-134, 1989.
- 5) **Moon, R. C., Mehta, R. G. and Rao, K. V.** : Retinoids and cancer in experimental animals. In Sporn, M. B., Roberts, M. B. Goodman, D. S. (eds) *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, 2nd Edn. Raven Press Ltd., New York, pp.573-595, 1994.
- 6) **Hixson, E. J. and Denine, E. P.** : Comparative subacute toxicity of retinyl acetate and three synthetic retinamides in Swiss mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 63 : 1359-1364, 1979.
- 7) **Rotmensz, N., De Palo, G., Formelli, F., Costa, A., Marubini, E., Campa, T., Crippa, A., Danesini, G. M., Delle Grottaglie, M., Di Mauro, M. G., Filiberti, A., Gallazzi, M., Guzzon, A., Magni, A., Malone, W., Mariani, L., Palvarini, M., Perloff, M., Pizzichetta, M. and Veronesi, U.** : Long-term tolerability of fenretinide (4-HPR) in breast cancer patients. *Eur. J. Cancer* 27 : 1127-1131, 1991.
- 8) **Veronesi, U., De Palo, G., Costa, A., Formelli, F., Marubini, E. and Del Vecchio, M.** : Chemoprevention of breast cancer with retinoids. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 12 : 93-97, 1992.
- 9) **De Palo, G., Veronesi, U., Marubini, E., Camerini, T., Chiesa, F., Nava, M., Formelli, F., Del Vecchio, M., Costa, A., Boracchi, P. and Mariani, L.** : Controlled clinical trials with fenretinide in breast cancer, basal cell carcinoma and oral leukoplakia. *J. Cell. Biochem.* 22 (suppl.) : 11-17, 1995.
- 10) **De Palo, G., Camerini, T., Marubini, E., Costa, A., Formelli, F., Del Vecchio, M., Mariani, L., Miceli, R., Mascotti, G., Magni, A., Campa, T., Di Mauro, M. G., Attili, A., Maltoni, C., Del Turco, M. R., Decensi, A., D'Aiuto, G. and Veronesi, U.** : Chemoprevention trial of contralateral breast cancer with fenretinide. Rationale, design, methodology, organization, data management, statistics and accrual. *Tumori*, 83 : 884-894, 1997.
- 11) **Chiesa, F., Tradati, N., Marazza, M., Rossi, N., Boracchi, P., Mariani, L., Formelli, F., Giardini, R., Costa, A., De Palo, G. and Veronesi, U.** : Fenretinide (4-HPR) in chemoprevention of oral leukoplakia. *J. Cell Biochem.* 17F (suppl.) : 255-261, 1993.
- 12) **Mitchell, M. F., Hittelman, W. K., Lotan, R., Nishioka, K., Tortolero-Luna, G., Richards-Kortum, R., Wharton, J. T. and Hong, W. K.** : Chemoprevention trials and surrogate end point biomarkers in the cervix. *Cancer* 76 (suppl.) : 1956-1977, 1995.
- 13) **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. Longnecker, D. S. (eds), p237 (Springer-Verlag, Tokyo, 1994).
- 14) **Pour, M. and Wilson, R. B.** : Tumors of the pancreas. Williams and Wilkins, Baltimore, p37-158, 1980.
- 15) **Konishi, Y., Mizumoto, K., Kitazawa, S., Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M. and Kawano, T.** : Early ductal lesions of pancreatic carcinogenesis in animals and humans. *Int. J. Pancreatol.* 7 : 83-89, 1990.
- 16) **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 adenocarcinoma in hamsters. *Molecular Carcinog.* 13 : 266-271, 1995.

- 17) **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.
- 18) **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.
- 19) **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.
- 20) **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.
- 21) **Solt, D. and Farber, E.** : New principle for analysis of chemical carcinogens. *Nature* **263** : 701-703, 1976.
- 22) **Cayama, E., Tsuda, H., Sarma, D. S. R. and Farber, E.** : Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation. *Nature* **275** : 60-62, 1978.
- 23) **Longnecker, D. S., Curphey, T. J., Kuhlmann, E. T. and Roebuck, B. D.** : Inhibition of pancreatic carcinogenesis by retinoids in azaserine-treated rats. *Cancer Res.* **42** : 19-24, 1982.
- 24) **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** : 3219-3255, 1983.
- 25) **Longnecker, D. S., Curphey, T. J., Kuhlmann, B. S., Roebuck, B. D. and Neff, R. K.** : Effects of retinoids in *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-treated hamsters. *Pancreas* **1** : 224-231, 1986.
- 26) **Appel, M. J. and Woutersen, R. A.** : Effects of dietary beta-carotene and selenium on initiation and promotion of pancreatic carcinogenesis in azaserine-treated rats. *Carcinogenesis* **17** : 1411-1416, 1996.
- 27) **Majima, T., Tsutsumi, M., Nishino, H., Tsunoda, T. and Konishi, Y.** : Inhibitory effects of β -carotene, palm carotene, and green tea polyphenols on pancreatic carcinogenesis initiated by *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in syrian golden hamsters. *Pancreas* **16** : 13-18, 1998.
- 28) **Lotan R.** : Retinoids and apoptosis: implications for cancer chemoprevention and therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **87** : 1655-1657, 1995.
- 29) **Kalemkerian, G. P., Slusher, R., Ramalingam, S., Gadgeel, S. and Mabry, M.** : Growth inhibition and induction of apoptosis by fenretinide in small-cell lung cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **87** : 1674-1680, 1995.
- 30) **Ponzone, M., Bocca, P., Chiesa, V., Decensi, A., Pistoia, V., Raffaghello, L., Rozzo, C. and Montaldo P. G.** : Differential effects of *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation. *Cancer Res.* **55** : 853-861, 1995.
- 31) **Oridate, N., Lotan, D., Xu, X-C., Hong, W. K. and Lotan, R.** : Differential induction of apoptosis by all-trans-retinoic acid and *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin. Cancer Res.* **2** : 855-863, 1996.
- 32) **Delia, D., Aiello, A., Lombardi, L., Pelicci, P. G., Grignani, F., Grignani, F., Formelli, F., Menard, S., Costa, A., Veronesi, U. and Pierotti, M. A.** : *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide induces apoptosis of malignant hemopoietic cell lines including those unresponsive to retinoic acid. *Cancer Res.* **53** : 6036-6041, 1993.
- 33) **Shiekh M. S., Shao, Z-M., Li, X-S., Ordenez, J. V., Conley, B. A., Wu, S., Dawson, M. I., Han, Q-X., Chao, W., Quick, T., Niles, R. M. and Fontana, J. A.** : *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR)-mediated biological actions involve retinoid receptor-independent pathways in human breast carcinoma. *Carcinogenesis* **16** : 2477-2486, 1995.

- 34) **Dmitrovsky E.** : *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide activation of a distinct pathway signaling apoptosis. *J. Natl. Cancer Inst.* **89** : 1179-1181, 1997.
- 35) **Oridate, N., Suzuki, S., Higuchi, M., Mitchell, M. F., Hong, W. K. and Lotan, R.** : Involvement of reactive oxygen species in *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **89** : 1191-1198, 1997.
- 36) **Sabichi, A. L., Hendricks, D. T., Bober, M. A. and Birrer, M. J.** : Retinoic acid receptor β expression and growth inhibition of gynecologic cancer cells by the synthetic retinoid *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *J. Natl. Cancer Inst.* **90** : 597-605, 1998.
- 37) **Clifford, J. L., Menter, D. G., Wang, M., Lotan, R. and Lippman, S. M.** : Retinoid receptor-dependent and-independent effects of *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide in F9 embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* **59** : 14-18, 1999.
- 38) **Sun, S-Y., Li, W., Yue, P., Lippman, S. M., Hong, W. K. and Lotan, R.** : Mediation of *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in human cancer cells by different mechanisms. *Cancer Res.* **59** : 2493-2498, 1999.
- 39) **Evans, T. R. and Kaye, S. B.** : Retinoids: present role and future potential. *Br. J. Cancer* **80** : 1-8, 1999.
- 40) **Whelan, P.** : Retinoids in chemoprevention. *Eur. Urol.* **35** : 424-428, 1999.