

膵液を用いた膵管発癌機構の解析

—発癌物質を投与した動物膵液の変異原性—

岡 保夫

膵癌は悪性腫瘍の中でも予後不良である難治性癌の1つである。その新たな治療戦略として、癌の発生及び進展の阻害、あるいは遅延させる化学予防法の開発が重要視されている。

膵管上皮細胞は膵液に暴露されている事より、膵液中に発癌物質が分泌される事が、膵管上皮細胞由来である膵管癌の発生には重要であると考えられるが、膵液の発癌における役割に関する知見は乏しい。今回我々は、膵管癌の好発するハムスターと、膵管癌の発生が稀であるラットについて、強力な膵発癌物質である *N*-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP), *N*-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine (BHP) を投与して採取した膵液の変異原性について、Ames test (微生物変異原性試験法) を用いて検索した。また、その膵液中の変異原物質を High-performance liquid chromatography (HPLC) を用いて検索した。

その結果、ハムスターでは BOP, BHP を投与後採取した膵液には強い変異原性が認められ、HPLC 解析でも膵液中に BOP, BHP の代謝産物が認められた。一方、ラットではいずれの物質を投与しても膵液に変異原性は認めず、HPLC 解析でも膵液中に BOP, BHP の代謝産物は認められなかった。

以上の結果より、膵管癌の発生には膵液中に変異原物質が分泌されている事が重要な役割を果たしている事、膵液を用いた Ames test が膵管発癌物質のスクリーニング系になる可能性が示唆された。

(平成17年10月24日受理)

Mechanistic Analysis of Pancreatic Ductal Carcinogenesis from Pancreatic Juice — Mutagenicity of Pancreatic Juice in Animals Treated with Carcinogens —

Yasuo OKA

Pancreatic duct adenocarcinoma has one of the lowest cure rates of all human malignancies. Therefore, the development of chemopreventive methods to inhibit or delay carcinogenesis and progression of cancer extremely important.

Pancreatic duct adenocarcinoma originates in the ductal epithelium of the pancreas. The secretion of carcinogens into pancreatic juice is considered to be an important factor in carcinogenesis of the pancreatic duct, because the ductal epithelium of the pancreas is exposed to

リーニング系を開発することである。そのため、膵管癌が発生するハムスターと膵管癌が発生しないラットに膵管発癌物質を投与し採取した膵液の変異原性について、Ames test (微生物変異原試験法) を行いその変異原性の差を検索した。また、膵液中の変異原物質の同定を High-performance liquid chromatography (以下、HPLC) を用いて試みた。

材料及び方法

1. 化学物質

膵管発癌物質として BOP, BHP を用い、非発癌物質として 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-bitanone (以下、NNK) を用いた。BOP, BHP, NNK はそれぞれ Nakarai Chemical Co., Ltd. (Kyoto) より購入した。それぞれの化学構造を Figure 1a, b, c に示す。

2. 動物及び膵液採取方法

本実験は川崎医科大学動物実験研究委員会の承認を受け (No. 04-106, 2004年, No. 05-008, 2005年), 川崎医科大学動物実験指針に基づいて行われた。また、奈良県立医科大学動物実験施設において、同施設の動物実験倫理規定を遵守して行われた。

動物は、10-15週齢雄性シリアンゴールデンハムスター、10-15週齢雄性 F344 ラット (Nihon SLC Inc., Shizuoka) を用いた。

膵液の採取は、それぞれの動物とも pentobarbital sodium (NEMBUTAL™, DAINIPPON PHARMACEUTICAL Co., Ltd. Osaka) 50 mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔を行い、上腹部正中切開にて開腹、共通管の十二指腸開口部直前を結紮した後閉腹した。16時間後、全身麻酔下にて再開腹し肝門部総胆管を結紮する。続けて総胆管を切開し、総胆管内に内径 0.28 mm, 外径 0.61 mm のポリエチレンチューブ (INTRAMEDIC™, BECTON DICKINSON Co., Ltd. New Jersey) を留置した。続けて右頸静脈を露出し、BOP, BHP, NNK はそれぞれ 400 mg/kg, セクレチン (Eisai, Co., Ltd. Tokyo) 200 U/kg を同部位より静注し、約 6 時間かけて膵液を採取した (Fig. 2a, b)。変異原性試験のための膵液は数匹の動物より採取したものをプールし、使用するまで -80℃にて凍結保存し

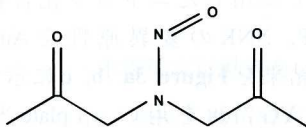


Fig. 1a. BOP の化学構式

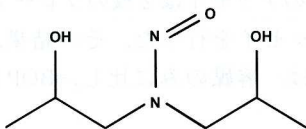


Fig. 1b. BHP の化学構式

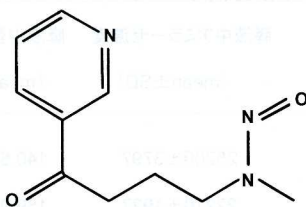


Fig. 1c. NNK の化学構式

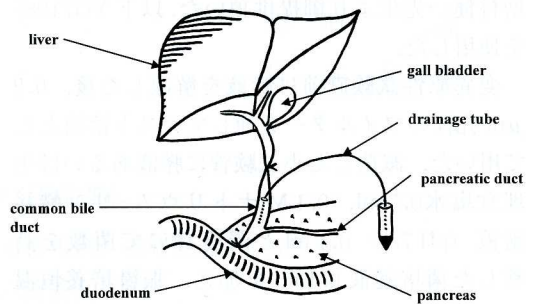


Fig. 2a. 膵液採取法 (模式図)

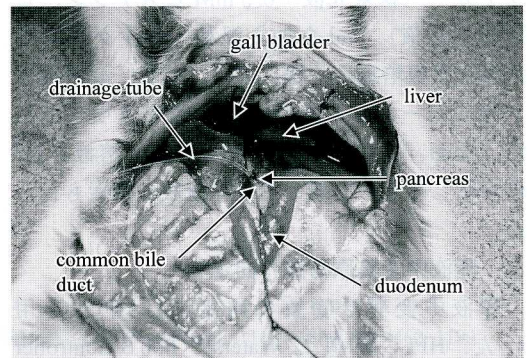


Fig. 2b. 膵液採取法

た。また、実験の再現性を確認するため同様の実験を3回行った。

3. 腩液中 α -アミラーゼ、蛋白濃度の測定

動物10匹を用いて腩液中 α -アミラーゼ、蛋白濃度の測定を行った。 α -アミラーゼ濃度は、試薬にシリカキッド AMY を用い、臨床化学分析装置 TBA-120 FR (TOSHIBA, Ltd. Tokyo) にて測定した。また、蛋白量は試薬にマイクロ TP-AR (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka) を用い、分光光度計 U-1100 (HITACHI, Ltd. Tokyo) にて測定した。

4. 変異原性試験

全ての変異原性試験は、肝 S9 非存在下にて Ames preincubation assay を行った。この方法はヒスチジン生合成系を支配している DNA 上に塩基対置換型変異やフレームシフト型変異の起こったサルモネラ変異株を用いて、ヒスチジン要求性から非要求性に戻る復帰突然変異を調べる方法である^{9),10)}。テスト菌株は、ニトロソ化合物高感受性株である *Salmonella typhimurium* YG 7108 (国立医薬品衛生研究所, 変異遺伝部, 増村健一先生より御提供頂いた。以下 YG7108) を使用した。

変異原性試験直前に腩液を解凍した後、0.2 μm 孔径のフィルターを通してテスト溶液として用いた。滅菌した小試験管に腩液あるいは生理食塩水 0.5 ml, 0.1 M ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.1 ml と濁度計にて菌数を調整した菌培養液 0.1 ml を加え、振盪培養恒温槽で 37°C, 20 分間インキュベーションした。トップアガー (軟寒天液 + 0.5 mM ヒスチジン, ビオチン溶液) 2 ml を加え混和, 最少グルコース寒天平板培地に一様に広げ, 37°C, 48 時間インキュベーション後コロニー数をカウントした。なお、インキュベーション後の溶液を 10^7 倍希釈したものをを用いて生存菌数の検索も行った。

5. 腩液中変異原物質の同定

腩液中変異原物質の同定には HPLC を用いた。HPLC 装置は WatersTM 600 S Controller (Waters Co., Ltd. New Castle) を用いた。ニト

ロソ化合物を標的物質とし、カラムには Jasco Finepac SIL C18 (内径 4.6 mm \times 25 cm, Japan Spectroscopic, Tokyo) を用いた。検体の腩液は径 0.2 μm の膜フィルターを通し, 50 μl を注入, アセトニトリル溶液 (アセトニトリル:水 = 2:3) によって溶出分離を行った。流速は 0.5 ml/分, 検出は 239 nm で行った。

6. 統計処理

各群間の比較は Mann-Whitney U test で行い, P 値 0.05 以下で有意差ありとした。

結 果

1. ハムスター、ラット腩液中のアミラーゼ及び蛋白濃度

ハムスター、ラット腩液中のアミラーゼ及び蛋白濃度を **Table 1** に示す。腩液中のアミラーゼ濃度は、ハムスターが 25200 ± 3797 IU/L, ラットが 22210 ± 1927 IU/L であり, 両者の間に有意差は認めなかった。腩液中の蛋白濃度は、ハムスターが 140.5 ± 16.2 mg/dl, ラットが 159.0 ± 19.3 mg/dl であり, 両者の間に有意差は認めなかった。

2. BOP, BHP, NNK の変異原性

本実験で使用したニトロソ化合物である BOP, BHP, NNK の変異原性を Ames test で検討した結果を **Figure 3a, b, c** に示す。テスト菌株は YG 7108 を用い, 1 plate 当たりの BOP, BHP, NNK の濃度は 0, 250, 500 μg とした。1 回のアッセイは 2 枚のプレートを用い, 3 回のアッセイを行った。その結果, BOP の変異原性は, 溶媒のみに比し, BOP 250, 500

Table 1. ハムスター、ラット腩液中のアミラーゼ及び蛋白濃度

動物	腩液中アミラーゼ濃度	腩液中蛋白濃度
	(mean \pm SD)	(mean \pm SD)
ハムスター	25200 \pm 3797	140.5 \pm 16.2
ラット	22210 \pm 1927	159.0 \pm 19.3

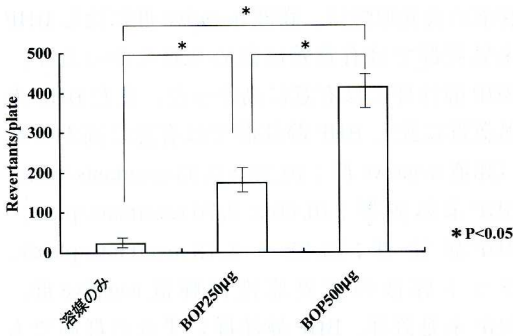


Fig. 3a. BOP の変異原性

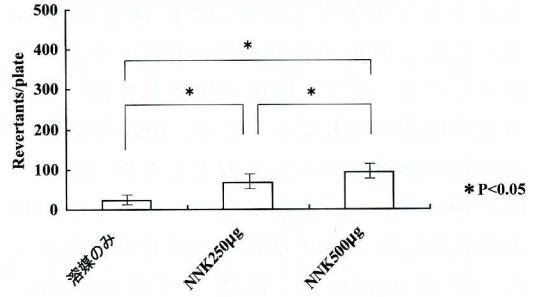


Fig. 3c. NNK の変異原性

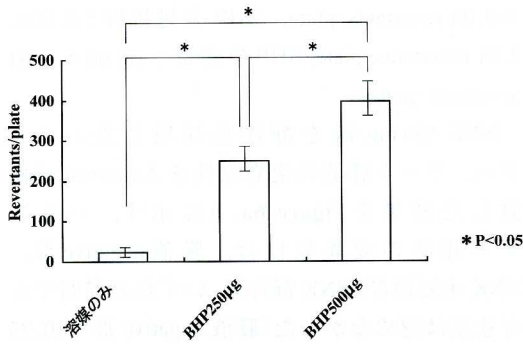


Fig. 3b. BHP の変異原性

に高かった (溶媒のみ: 23.7 ± 2.62 revertants/plate, BHP 250 $\mu\text{g}/\text{plate}$: 249.5 ± 6.02 revertants/plate, BHP 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$: 396.7 ± 12.99 revertants/plate).

NNK の変異原性は、溶媒のみに比し、NNK 250, 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で有意に高かった。また NNK 250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ に比し、NNK 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で有意に高かった (溶媒のみ: 23.7 ± 2.62 revertants/plate, NNK 250 $\mu\text{g}/\text{plate}$: 67.2 ± 2.21 revertants/plate, NNK 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$: 93.7 ± 4.11 revertants/plate)。

$\mu\text{g}/\text{plate}$ で有意に高かった。また BOP 250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ に比し、BOP 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で有意に高かった (溶媒のみ: 23.7 ± 2.62 revertants/plate, BOP 250 $\mu\text{g}/\text{plate}$: 173.2 ± 4.64 revertants/plate, BOP 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$: 411.7 ± 10.24 revertants/plate)。

BHP の変異原性は、溶媒のみに比し、BHP 250, 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で有意に高かった。また BHP 250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ に比し、BHP 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で有意

いずれのニトロソ化合物も YG 7108 に対し変異原性を示し、変異原性の強さはその濃度に比例して上昇することが認められた。

3. ニトロソ化合物投与動物唾液の変異原性

BOP 400 mg/kg を静注後採取したハムスター、ラット唾液の変異原性を Ames test で検討した結果を Figure 4a, b に示す。ハムス

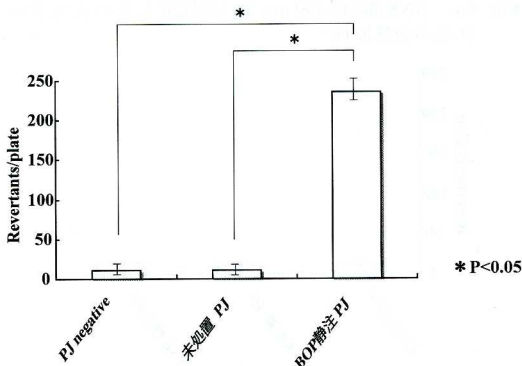


Fig. 4a. BOP 静注 (400 mg/kg) 後採取したハムスター唾液の変異原性

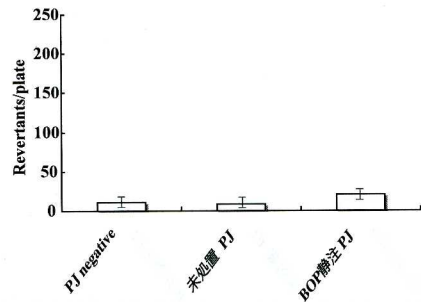


Fig. 4b. BOP 静注 (400 mg/kg) 後採取したラット唾液の変異原性

ター腭液の変異原性は、腭液のかわりに溶媒のみをテスト溶液とした群(以下、腭液 negative 群)に比し BOP 未処置動物の腭液をテスト溶液とした群(以下、BOP 未処置動物群)では有意差は認められなかったが、BOP を静注した動物の腭液をテスト溶液とした群(以下、BOP 静注群)では有意に高かった。また BOP 未処置群に比し BOP 静注群では有意に高かった(腭液 negative 群: 10.25 ± 0.95 revertants/plate, BOP 未処置群: 10.00 ± 2.70 revertants/plate, BOP 静注群: 232.75 ± 9.39 revertants/plate)。ラット腭液の変異原性は腭液 negative 群, BOP 未処置群, BOP 静注群いずれの群間でも有意差は認めなかった(腭液 negative 群: 10.25 ± 0.95 revertants/plate, BOP 未処置群: 8.50 ± 3.31 revertants/plate, BOP 静注群: 20.00 ± 1.41 revertants/plate)。

BHP 400 mg/kg を静注後採取したハムスター, ラット腭液の変異原性を Ames test で検討した結果を Figure 5a, b に示す。ハムスター

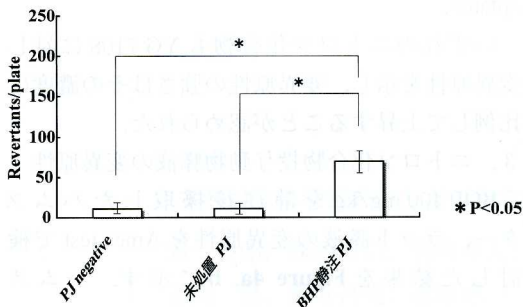


Fig. 5a. BHP 静注 (400 mg/kg) 後採取したハムスター腭液の変異原性

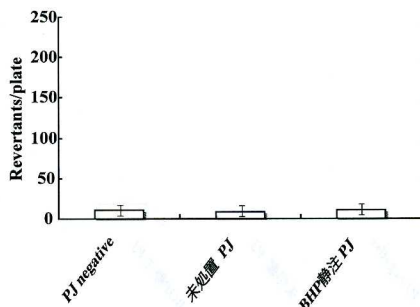


Fig. 5b. BHP 静注 (400 mg/kg) 後採取したラット腭液の変異原性

腭液の変異原性は、腭液 negative 群に比し BHP 未処置群では有意差は認められなかったが、BHP 静注群では有意に高かった。また BHP 未処置群に比し BHP 静注群では有意に高かった(腭液 negative 群: 10.25 ± 0.95 revertants/plate, BHP 未処置群: 10.00 ± 2.70 revertants/plate, BHP 静注群: 73.25 ± 4.78 revertants/plate)。ラット腭液の変異原性は腭液 negative 群, BHP 未処置群, BHP 静注群いずれの群間でも有意差は認めなかった(腭液 negative 群: 10.25 ± 0.95 revertants/plate, BHP 未処置群: 8.50 ± 3.31 revertants/plate, BHP 静注群: 10.00 ± 0.81 revertants/plate)。

NNK 400 mg/kg を静注後採取したハムスター, ラット腭液の変異原性を Ames test で検討した結果を Figure 6a, b に示す。ハムスター腭液の変異原性は、腭液 negative 群, NNK 未処置群, NNK 静注群, いずれの群間でも有意差は認めなかった(腭液 negative 群: 10.25 ± 0.95 revertants/plate, NNK 未処置群: 10.00

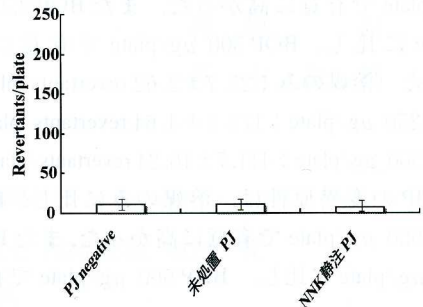


Fig. 6a. NNK 静注 (400 mg/kg) 後採取したハムスター腭液の変異原性

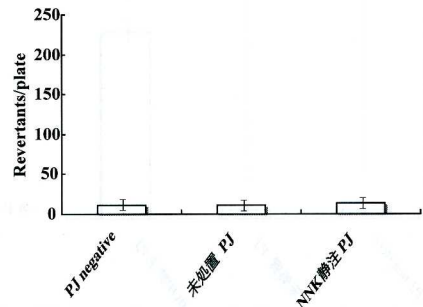


Fig. 6b. NNK 静注 (400mg/kg) 後採取したラット腭液の変異原性

± 2.70 revertants/plate, NNK 静注群： 7.75 ± 0.95 revertants/plate). ラット腭液の変異原性は、腭液 negative 群, NNK 未処置群, NNK 静注群, いずれの群間でも有意差は認めなかった (腭液 negative 群： 10.25 ± 0.95 revertants/plate, NNK 未処置群： 8.50 ± 3.31 revertants/plate, NNK 静注群： 10.50 ± 3.41 revertants/plate).

なお、いずれの実験群においてもインキュ

ベーション後の YG 7108 の生菌数を検査した結果、生存菌数に差異はみられず、revertant 数と復帰突然変異率が相関することが確認された。

4. ニトロソ化合物投与動物腭液の HPLC 解析

BOP 400 mg/kg を静注後採取したハムスター、ラット腭液の HPLC 解析の結果を Figure 7a, b に示す。ハムスター腭液では、BOP の代謝産

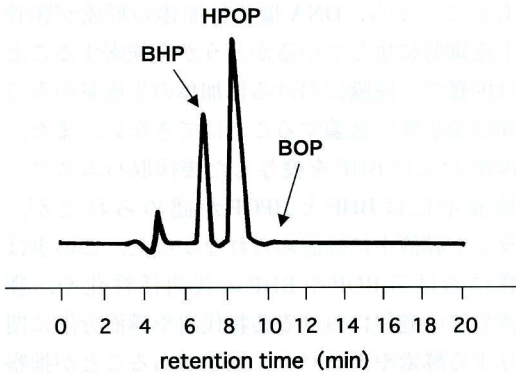


Fig. 7a. BOP 静注 (400 mg/kg) 後採取したハムスター腭液の HPLC 解析

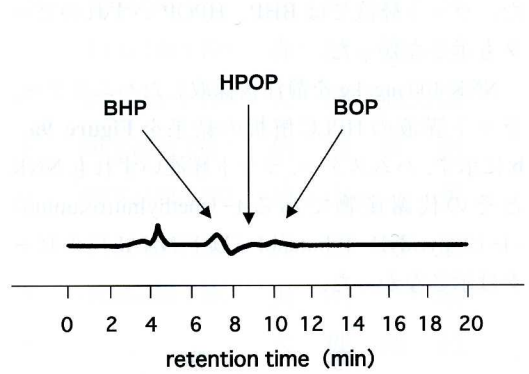


Fig. 7b. BOP 静注 (400 mg/kg) 後採取したラット腭液の HPLC 解析

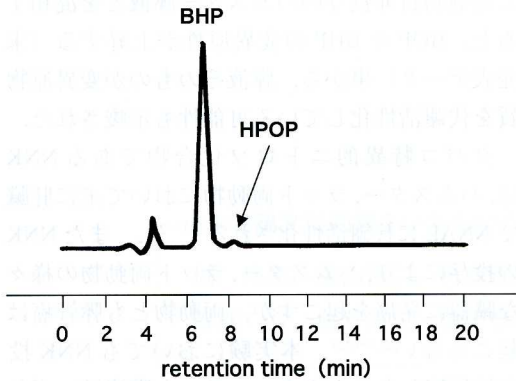


Fig. 8a. BHP 静注 (400 mg/kg) 後採取したハムスター腭液の HPLC 解析

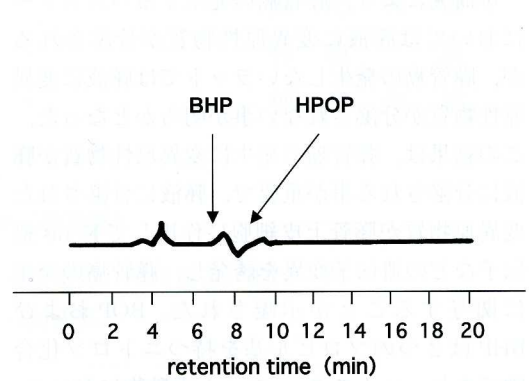


Fig. 8b. BHP 静注 (400 mg/kg) 後採取したラット腭液の HPLC 解析

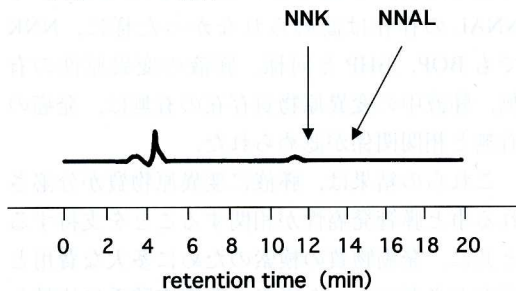


Fig. 9a. NNK 静注 (400 mg/kg) 後採取したハムスター腭液の HPLC 解析

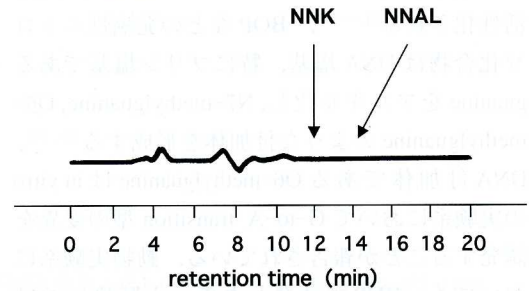


Fig. 9b. NNK 静注 (400 mg/kg) 後採取したラット腭液の HPLC 解析

物であるBHPと*N*-nitroso(2-hydroxypropyl)(2-oxopropyl)amine(以下HPOP)にピークを示したが、BOPのピークは示さなかった。ラット膀胱液ではBOP, BHP, HPOPいずれのピークも示さなかった。

BHP 400 mg/kgを静注後採取したハムスター、ラット膀胱液のHPLC解析の結果をFigure 8a, bに示す。ハムスター膀胱液では、BHPにピークを示したが、HPOPのピークは示さなかった。ラット膀胱液ではBHP, HPOPいずれのピークも示さなかった。

NNK 400 mg/kgを静注後採取したハムスター、ラット膀胱液のHPLC解析の結果をFigure 9a, bに示す。ハムスター、ラット膀胱液いずれもNNKとその代謝産物である4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol(以下NNAL)のピークは示さなかった。

考 察

本研究により、膀胱癌の発生するハムスターにおいては膀胱液に変異原性物質が分泌されるが、膀胱癌の発生しないラットでは膀胱液に変異原性物質が分泌されない事が明らかとなった。この結果は、膀胱癌の発生に変異原性物質が膀胱液に分泌される事が重要で、膀胱液に分泌された変異原物質が膀胱上皮細胞に作用してK-ras遺伝子などの遺伝子変異を誘発し、膀胱癌の発生に関与することが示唆された。BOPおよびBHPは2つのプロピル基を持つニトロソ化合物であり、ハムスター、ラット両動物において、主に肝臓でBOPはBHPおよびHPOPに代謝活性化される^{11)~14)}。BOPなどの発癌性ニトロソ化合物はDNA塩基、特にプリン塩基であるguanineをアルキル化し、N7-methylguanine, O6-methylguanineのような付加体を形成する^{15), 16)}。DNA付加体であるO6-methylguanineはin vitroの実験系においてG-to-A transition型の変異を誘発することが報告されている。動物実験系においても、BHPで誘発したラット肺癌におけるK-ras遺伝子変異も全てG-to-A transition

型の変異であり、この型の遺伝子変異はニトロソ化合物に特徴的であるとされている。このことからハムスター膀胱液に見出されたニトロソ化合物がK-ras遺伝子異常を誘発することが示唆される。一方、BOPやBHPはハムスターやラットの生体内では同様の代謝産物を形成し、両動物の膀胱においてDNA付加体を形成することが報告されている^{15)~17)}。しかし、膀胱上皮細胞は膀胱においては数の少ない細胞であることから、DNA塩基付加体の形成が膀胱上皮細胞に生じているかどうかを検索することは困難で、膀胱における付加体の生成量のみで膀胱発癌性を議論することはできない。また、BOPおよびBHPを投与した後採取ハムスター膀胱液中にはBHPとHPOPが認められたが、ラット膀胱液中には認められなかった。この事は膀胱におけるBOPやBHPの代謝活性化や、膀胱分泌の過程における薬物代謝や膀胱分泌に関与する酵素やタンパクに種差があることが推察される。一方、試験管内でBOPあるいはBHPと発癌物質非投与のハムスター膀胱液とを混和すると、BOPやBHPの変異原性が上昇する(未発表データ)事から、膀胱液そのものが変異原物質を代謝活性化している可能性も示唆された。

タバコ特異的ニトロソ化合物であるNNKは、ハムスター、ラット両動物において主に肝臓でNNALに代謝活性化される^{18)~20)}。またNNKの投与により、ハムスター、ラット両動物の様々な臓器に発癌を起こすが、両動物とも膀胱癌は起こらない^{21)~24)}。本実験においてもNNK投与後採取したハムスター、ラット膀胱液はいずれも変異原性を認めず、膀胱液中にもNNKやNNALの存在は認められなかった様に、NNKでもBOP, BHPと同様、膀胱液の変異原性の有無、膀胱液中的変異原物質存在の有無は、発癌の有無と相関関係が認められた。

これらの結果は、膀胱液に変異原物質が分泌される事と膀胱発癌性が相関することを支持すると共に、発癌物質の検索のために多大な費用と労力が必要であった従来の発癌実験系に比較して、本実験系は簡便で短時間に膀胱発癌物質を

検索しうるスクリーニング系としての有用性を示すものである。

本研究における Ames test で用いたテスト菌株である YG7108 は、DNA 付加体を修復する酵素の 1 つである O6-methylguanine DNA methyltransferases をコードする *ada_{ST}*, *ogt_{ST}* 遺伝子を欠損させたアルキル化剤高感受性株である²⁵⁾。本実験においても BOP, BHP, NNK に対し、YG7108 は高い感受性を示した。YG7108 のニトロソ化合物に対する感受性は、元の菌株である O6-methylguanine DNA methyltransferases が欠損していない TA1535 よりも 4～100 倍高いと報告されている²⁵⁾。一般に、従来のネズミチフス菌を用いた Ames test では加熱食品中に含まれる代表的な発癌物質であるヘテロサイクリックアミンには高い感受性を示すが、動物実験で強い発癌性を示すニトロソ化合物に対する感受性は低いとされていた。ヒト膵癌において、K-ras 遺伝子変異はニトロサミンで誘発され得る G-to-A transition 型が多いことから、ヒト膵癌の発生に環境中のニトロソ化合物の関与が示唆されており、ニトロソ化合物高感受性の YG7108 株を用いることにより、本実験系はヒト膵管癌の発生に関与する環境中の発癌物質を高感度で検出できる実験系となり得る可能性があり、今後、環境中の膵管発癌物質を探索する事によりヒト膵癌の予防に有用な知見が見出され

ることが期待される。

ま と め

1. 本実験の Ames test で用いたテスト菌株である YG7108 は BOP, BHP, NNK といったニトロソ化合物に対して高感受性であり、膵管発癌物質を高感度に検出できた。

2. 膵液に変異原物質が分泌される事と膵管発癌性には相関があり、膵管発癌の過程においては、膵液中に分泌された変異原物質が重要な役割を果たしている事が示唆された。

3. Ames test を用いて膵液の変異原性を検討する本実験系が、有用な膵管発癌物質のスクリーニング法になる可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました済生会中和病院臨床病理部部長、堤 雅弘先生に深甚な謝意を表すとともに、御校閲、御助言賜りました本学消化器外科学教室、角田 司教授、平井敏弘助教授、生化学教室、日高和夫講師に深謝申し上げます。さらに御協力賜りました奈良県立医科大学分子腫瘍学教室ならびに本学消化器外科学教室諸姉姉に感謝いたします。

本論文の一部は第63回日本癌学会学術総会(2004年9月福岡)において発表した。

参 考 文 献

- 1) Matsuno S, Egawa S, Fukuyama S, Motoi F, Sunamura M, Isaji S, Imaizumi T, Okada S, Kato H, Suda K, Nakao A, Hiraoka T, Hosotani R, Takeda K : Pancreatic Cancer Registry in Japan : 20 years of experience. *Pancreas* 28 : 219-230, 2004
- 2) Matsuno S, Egawa S, Shibuya K, Shimamura H, Sunamura M, Takeda K, Katoh H, Okada S, Suda K, Nakao A, Isaji S, Hiraoka T, Hosotani R, Imaizumi T : Pancreatic cancer : current status of treatment and survival of 16071 patients diagnosed from 1981-1996, using the Japanese National Pancreatic Cancer Database. *Int J Clin Oncol* 5 : 153-157, 2000
- 3) Yamamoto M, Ohashi O, Saitoh Y : Japan Pancreatic Cancer Registry : current status. *Pancreas* 16 : 238-242, 1998
- 4) Pour P, Althoff J, Kruger FW, Mohr U : A potent pancreatic carcinogen in Syrian hamsters : N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *J Natl Cancer Inst* 58 : 1449-1453, 1977
- 5) Tsutsumi M, Kondoh S, Noguchi O, Horiguchi K, Kobayashi E, Okita S, Ohashi K, Honoki K, Tsujiuchi T, 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
- 6) Konishi Y, Tsutsumi M, Tsujiuchi T : Mechanistic analysis of pancreatic ductal carcinogenesis in hamsters. *Pancreas* 16 : 300-306, 1998
 - 7) Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H, Kato Y : Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 53 : 953-956, 1993
 - 8) Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M : Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53 : 549-554, 1988
 - 9) Ames BN, Mccann J, Yamasaki E : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31 : 347-364, 1975
 - 10) Maron DM, Ames BN : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113 : 173-215, 1983
 - 11) Gingell R, Brunk G, Nagel D, Pour P : Metabolism of three radiolabeled pancreatic carcinogenic nitrosamines in hamsters and rats. *Cancer Res* 39 : 4579-4583, 1979
 - 12) Kokkinakis DM, Scarpelli DG, Rao MS, Hollenberg PF : Metabolism of pancreatic carcinogens N-nitroso-2, 6-dimethylmorpholine and N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine by microsomes and cytosol of hamster pancreas and liver. *Cancer Res* 43 : 5761-5767, 1983
 - 13) Kokkinakis DM, Hollenberg PF, Scarpelli DG : Major urinary metabolites in hamsters and rats treated with N-nitroso (2-hydroxypropyl) (2-oxopropyl) amine. *Cancer Res* 45 : 3586-3592, 1985
 - 14) Mori Y, Takahashi H, Yamazaki H, Toyoshi K, Makino T, Yokose Y, Konishi Y : Distribution, metabolism and excretion of N-nitrosobis(2-hydroxypropyl) amine in Wistar rats. *Carcinogenesis* 5 : 1443-1447, 1984
 - 15) Van Benthem J, Feron VJ, Leeman WR, Wilmer JW, Vermeulen E, den Engelse L, Scherer E : Immunocytochemical identification of DNA adducts, O6-methylguanine and 7-methylguanine, in respiratory and other tissues of rat, mouse and Syrian hamster exposed to 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis* 15 : 2023-2029, 1994
 - 16) Kokkinakis DM, Scarpelli DG : DNA alkylation in the hamster induced by two pancreatic carcinogens. *Cancer Res* 49 : 3184-3189, 1989
 - 17) Kokkinakis DM : Alkylation of rodent tissue DNA induced by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine. *Carcinogenesis* 13 : 759-765, 1992
 - 18) Adams JD, Lavoie EJ, O'Mara-Adams KJ, Hoffmann D, Carey KD, Marshall MV : Pharmacokinetics of N'-nitrososarcosine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in laboratory animals. *Cancer Lett* 28 : 195-201, 1985
 - 19) Hecht SS, Young R, Chen CB : Metabolism in the F344 rat of 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco-specific carcinogen. *Cancer Res* 40 : 4144-4150, 1980
 - 20) Adams JD, LaVoie EJ, Hoffmann D : On the pharmacokinetics of tobacco-specific N-nitrosamines in Fischer rats. *Carcinogenesis* 6 : 509-511, 1985
 - 21) Furukawa F, Nishikawa A, Yoshimura H, Mitsui M, Imazawa T, Ikezaki S, Takahashi M : Effects of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) on N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP) - initiated carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett* 86 : 75-82, 1994
 - 22) Rivenson A, Hoffmann D, Prokopczyk B, Amin S, Hecht SS : Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F 344 rats by tobacco-specific and Aroclor-derived N-nitrosamines. *Cancer Res* 1 : 6912-6917, 1988
 - 23) Castonguay A, Lin D, Stoner GD, Radok P, Furuya K, Hecht SS, Schut HA, Klaunig JE : Comparative carcinogenicity in A/J mice and metabolism by cultured mouse peripheral lung of N'-nitrososarcosine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, and their analogues. *Cancer Res* 43 : 1223-1229, 1983
 - 24) Hecht SS, Hoffmann D : Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco

smoke. *Carcinogenesis* 9 : 875-884, 1988

- 25) Yamada M, Matsui K, Sofuni T, Nohmi T : New tester strains of *Salmonella typhimurium* lacking O6-methylguanine DNA methyltransferases and highly sensitive to mutagenic alkylating agents. *Mutat Res* 381 : 15-24, 1997