

ハムスター実験膵癌における alloxan の影響

大阪府立成人病センター外科, *同 病理

石川 治 大東 弘明 佐々木 洋
今岡 真義 岩永 剛 建石 竜平

THE INFLUENCE OF ALLOXAN ON THE PANCREATIC CARCINOGENESIS OF SYRIAN GOLDEN HAMSTER

Osamu ISHIKAWA, Hiroaki OOHIGASHI, Yo SASAKI,
Shingi IMAOKA, Takeshi IWANAGA and Ryuhei TATEISHI*

The Center for Adult Diseases, Osaka
Departments of Surgery, Pathology*

膵癌発生における耐糖能障害の影響を知る目的で, N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine [BOP] によるハムスター実験膵癌において, alloxan [AL] 投与の影響をみた。AL 投与群では軽度の耐糖能障害と組織学的に一部のランゲルハンス島 [ラ島] に変性を認めた。BOP 単独投与の場合と比較して, AL を前または同時に投与すると膵管上皮の異型巣・癌巣の発生数は軽度低下した。しかし杯状の粘液細胞から成る異型巣は増加していた。とくにこの種の異型巣は BOP 単独投与群では主に large duct に認めたのに対し, AL 併用群では small duct にも多く発生しており, 本病変の発生領域がラ島障害を契機に末梢側へ拡大した可能性が示唆された。

索引用語: N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine, alloxan, 耐糖能, 杯細胞

結 言

一般に insulin 分泌能が低下した状況下では癌の発生は抑制されるであろうと予想される。なぜなら, insulin はそれ自体, または他の因子と協調して標的細胞の DNA 合成を亢進せしめ, 一種の成長因子として働いている¹⁾と考えられるからである。しかしながら, 従来から膵癌の高危険群の1つに糖尿病患者があげられている。たとえば膵癌診断時に空腹時血糖値が上昇しているものの頻度は20%前後²⁾, さらに糖負荷テストで耐糖能の低下を呈するものまで含めると50~90%にもぼっている³⁾⁴⁾。その際, 一次性糖尿病が膵癌の高危険群となっているのか, または単に膵癌に続発したランゲルハンス島 [ラ島] 細胞の減少や随伴性膵炎などの二次性の要因によるものかの鑑別は容易でない。また耐糖能低下またはラ島の障害を契機として発生してくるものとそうでないものとの間に癌の発生機序面での相違点があるのかもしれない。

そこでわれわれはヒト膵管癌の実験モデルである N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine [BOP]⁵⁾⁶⁾ による hamster 実験膵癌において, ラ島 β 細胞の障害剤である Alloxan [AL] を投与して, その影響を検索し, 上記の問題点について考察を行った。

対象および方法

週齢約11週の Syrian golden hamster に対して, BOPは20mg/kg・体重を0.5mlの生理食塩水に溶解し, これを週1回の割合で計5回皮下注射した。ALは25mg/kg・体重を0.5mlの生理食塩水に溶解し, 2日に1回の割合で計12回腹腔内注射した。各実験群は, A: 無処置 (16匹), B: AL 単独投与 (23匹), C: BOP 単独投与 (34匹), P: AL と BOP の同時開始 (15匹), E: AL 投与後 BOP 投与 (24匹) の5群に分類した。B群ではAL投与終了後, C・D・E群ではBOP投与終了後, 25週後に屠殺した。屠殺前の24時間は絶食に保ち, 各群のうちの半数の動物には屠殺30分前に10%ブドウ糖液5ml/kg・体重を舌静脈から one shot 注入した。屠殺時採取した血液は血糖値・insulin (IRI) 値の測定に供し, 膵組織は全葉を摘出し, Hematoxylin-

<1987年1月14日受理>別刷請求先: 石川 治
〒537 大阪市東成区中道1-3-3 大阪府立成人
病センター外科

表1 実験スケジュール

AL: Alloxan 25mg/kg/2days (ip)×12. BOP: N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine 20mg/kg/w (sc)×5

処置	25週	有効匹数
A (無処置)	→	16
B (AL)	→	23
C (BOP)	→	34
D (AL+BOP)	→	15
E (AL→BOP)	→	24

図1 Grade I 異型巢 (H-E 染色, ×100). 単層の, 背丈の高い上皮から構成されており, 一部核の極性喪失が認められる.

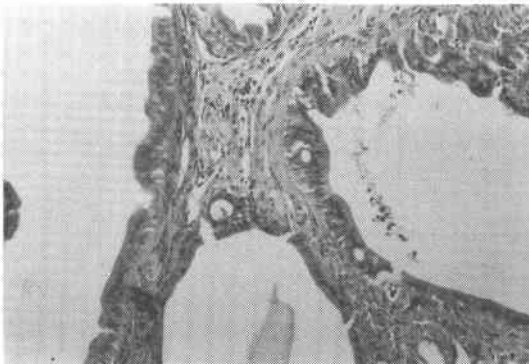
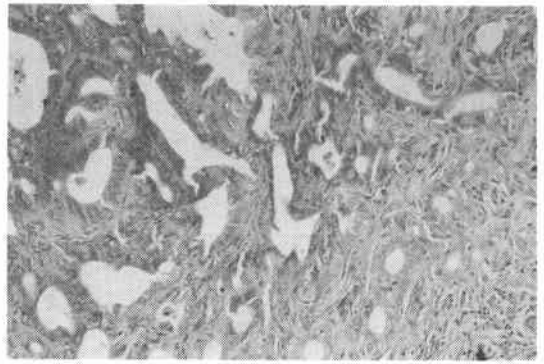


図2 Grade II 異型巢 (H-E 染色, ×100). 多層化した異型上皮細胞より構成されている.



図3 Grade III 異型 (癌) 巢 (H-E 染色, ×100). 浸潤性増殖が認められる.



Eosin 染色後光学顕微鏡下に検索した (表1).

膀胱上皮に発生した病巣は, 軽度異型 (grade I): 一層の背丈の高い上皮から成り, 核の極性を喪失しているもの, 中等以上の異型 (grade II): 前記細胞の重層化しているもの, 癌 (grade III): 基底膜浸潤を伴うもの, の3群に分類した. またこれらの異型・癌巣は杯状の粘液産生細胞から構成されているもの (G(+)) と, そうでないもの (G(-)) とに分類した (図1~3).

結 果

各群における実験開始前と屠殺時の体重とそれらの差・増加率をみると各群間で著差はなく, 体重減少のみられた群はなかった (表2). また各群のうちで糖負荷をせずに屠殺した半数の動物の平均血糖値 (BSa)・IRI 値 (IRIa) を表3に示した. 残りの半数, すなわち糖負荷30分後の動物における平均血糖値 (BSb)・IRI 値 (IRIb) とから $\Delta IRI/\Delta BS = (IRIb - IRIa) / (BSb - BSa)$ (u/g) を各群について算出した. その結果, BSa・

表2 実験前後における体重とその変化

群	実験前の体重	屠殺時の体重	体重増加 (率)
A	111 ± 6g	123 ± 16g	12g (+11%)
B	106 ± 22g	113 ± 19g	7g (+7%)
C	108 ± 9g	112 ± 12g	4g (+4%)
D	103 ± 16g	114 ± 30g	11g (+11%)
E	122 ± 29g	134 ± 16g	11g (+9%)

IRIa には各群間で有意差はなかったが, $\Delta IRI/\Delta BS$ は A 群2.1, B 群1.8, C 群1.2, D 群0.7, E 群0.9の順に低下していた (表3). 組織学的に投与例では一部のラ島に壊死・脱落像を認めた (図4) が, 膵全体にわたる変化ではなかった.

つぎに各群における異型巢・癌巣の一匹あたりの平均発生数を比較した. A・B 群ではこれらの病巣は認められなかった. まず G (-) の grade I 病巣について

表3 各群における空腹時血糖値 (BSa), IRI値 (IRIa) と $\Delta IRI/\Delta BS$

$$\Delta IRI/\Delta BS = \frac{IRIb - IRIa}{BSb - BSa}$$

群	BSa (mg/dl)	IRIa ($\mu U/ml$)	$\Delta IRI/\Delta BS$ (U/g)
A (No treat.)	45 ± 15	8.2 ± 3.2	2.1
B (AL)	68 ± 5	6.5 ± 1.0	1.8
C (BOP)	64 ± 13	8.6 ± 3.5	1.2
D (AL-BOP)	57 ± 18	7.7 ± 4.2	0.7
E (AL-BOP)	49 ± 10	6.0 ± 2.3	0.9

図4 Alloxan 投与例におけるラ島の部分壊死・脱落像 (AL 単独投与群), (H-E, ×100)

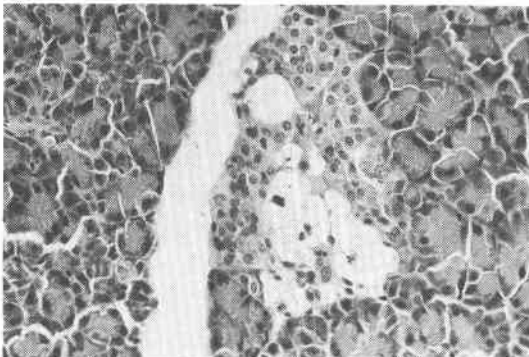
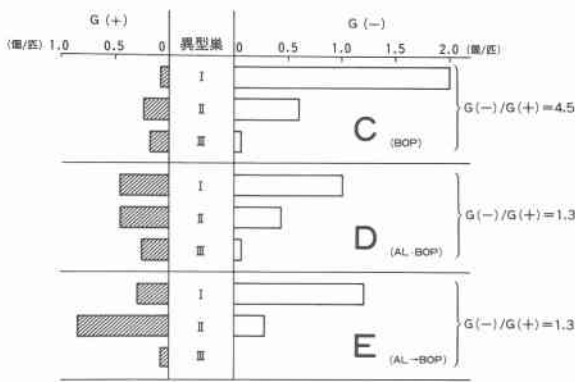


図5 異型巣 (Grades I & II) と癌巣 (Grade III) の平均発生個数

G (+): 杯状の粘液細胞から成る病巣, G (-): 杯状の粘液細胞から構成されていない病巣



はC群では2.0個であるのに対して, D群では1.0個, E群では1.2個と少なかった (図5). grade II, III についても D・E 群の発生病巣数はC群のそれとくらべて低値であった. 一方, G(+)病巣の平均発生数についてみると, C群での grade I 病巣数は0.1個であるのに対し, D群では0.5個, E群では0.3個と低値であ

図6 C および D+E 群における Grade I 病巣の平均発生個数—S および I 亜群別にみた G (+) と G (-) 病巣の発生個数.

S: $\Delta IRI/\Delta BS$ 直線より上方にプロットされた動物 (比較的耐糖能良好群), I: $\Delta IRI/\Delta BS$ 直線より下方にプロットされた動物 (比較的耐糖能不良群)

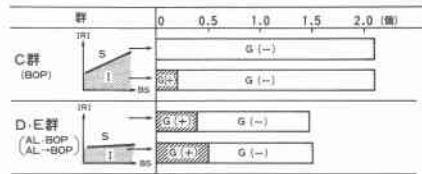


表4 異型巣 (Grades I & II) の発生部位. 各欄における数値は全病巣数に対する末梢腺管由来の病巣数 (頻度). 末梢腺管由来の病巣は, 葉内の腺管で, ラ島と接しているものに限定した.

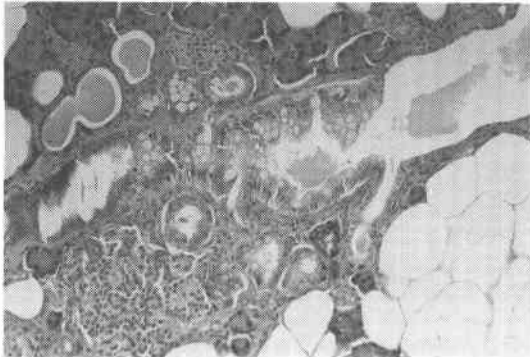
群	C (BOP)	D (AL-BOP)	E (AL-BOP)
G(-)異型巣	89/96 (93%)	29/30 (97%)	21/21 (100%)
G(+)異型巣	2/22 (9%)	10/33 (30%)	4/14 (28%)

た. E 群における grade III の発生数を除くと, すべての grade において G (+) の病巣数は D・E 群の方が C 群よりも多かった. 各群での全病巣における G(-)/G (+) は, C 群では4.5で, D・E 群の1.3に比べて有意 ($p < 0.05$) に高値であった.

各群の (BSa, IRIa) と (BSb, IRIb) の2点を結んだ勾配 $\Delta IRI/\Delta BS$ の直線よりも上にプロットされた動物 (S) と下にプロットされた動物 (I) との間で, grade I 異型巣の平均発生数を比較した (図6). その際, 図5のごとく D・E 群間では著差がなかったので D+E 群と一括した. その結果, C 群のうちで S と I 間では grade I 異型巣の平均発生数はともに2.1であったが, S 群ではすべて G (-) で G (+) はなかった. 一方, I 群では2.1個のうち, 0.2個が G (+) であった. また, D+E 群では grade I 異型巣の平均発生数は1.5と同値であったが, やはり S よりも I の方が G (+) の異型巣の発生数は多かった.

つぎに, 異型巣 (grade I, II) の発生部位を各群間で比較した (表4). 発生部位は, 葉内腺管で islet と密接しているものを small duct とし, それ以外のものはすべて large duct と分類して, small duct タイプのもの占める率を比較した. まず G (-) の異型巣での率は, C 群では93%, D 群では97%, E 群では100%と著差はみられなかった. 一方 G (+) の異型巣は, C 群

図7 葉内末梢膵管に発生したG(+)異型巢(AL・BOP投与群)(H-E染色, ×100)



の9%に比べD群では30%, E群では29%と高率であった。すなわち, BOP単独投与ではG(+)の異型巢はほとんどがlarge ductにしか発生しなかったのに対し, AL併用のD・E群ではsmall ductにもG(+)の異型巢が多く発生していた(図7)。

考 察

一般にALによる実験糖尿病では大量1回投与法が用いられ, 直後の高血糖とその後の低血糖にひき続いて持続性の糖尿病状態が完成される⁷⁾。一方, 少量反覆投与法では糖尿病を発症することなく, 軽微な耐糖能障害にとどまることが報告されている⁸⁾。これまでSyrian golden hamsterではこのような報告をみないが, 著者らの結果では, 一過性の低血糖で死亡した動物を認めておらず, AL投与(B, D, E)群と非投与(A, C)群との間で体重・空腹時血糖値に著差はなかった。しかし各群間で $\Delta IRI/\Delta BS$ を比較した場合, AL投与群ほど低値であり, これは耐糖能の低下を示しているものと解釈できる。本来 $\Delta IRI/\Delta BS$ は同一動物で施行されるべきものであるが, 対象動物が小動物であり, 1回以上の採血が困難であったので各群間で比較した。またALの効果は個体差が大きいと考えられているので, 図6のごとく各群の中で耐糖能の良好な群(S)と不良な群(I)に分けて比較した。なお, 組織学的にはラ島の部分的変性・脱落像が全例に認められており, 全体としては軽度のラ島障害が発生したことは確実であろう。

その結果, BOP単独投与のC群に比較して, ALを前投与したD群や同時投与のE群においては異型巢や癌巢の総発生数は若干低下していた。この場合の実験条件は, ヒトのchemical diabetesに相当する程度

のものである。Pourら⁹⁾はAL 60mg/kg 静注2時間後にBOPを投与すれば発癌率は低下したが, 2週間後では変化を認めなかったと報告している。ただし, この静注2時間後というのは高血糖期であってもinsulin分泌低下時期ではなく, むしろ2週間後こそがinsulin分泌低下による持続性の高血糖期である¹⁰⁾ことが知られている。そのほかこれまでBOP膵発癌実験において, 外的にinsulinを投与すれば発癌率は低下し¹¹⁾, streptozotocinを投与すればラ島腫瘍の発生とともに膵管癌の発生も促進されたという結果¹²⁾が報告されている。これらの所見を総合的に判断するとinsulin量の多寡と発癌率との間には直接の相関はないものと考えてよさそうである。

ところでBOP投与によってとくに膵管癌が好発する理由として, BOPはN-nitroso(2-hydroxy propyl)(2-oxopropyl) amine [HPOP]に変化して, これが環状構造のCyclic HPOPとなれば, GlucopyranoseやFructopyranoseなどと類似した構造となるため, これらのレセプターであるラ島細胞に対して高い親和性を有することがあげられている¹³⁾。ラ島を経由した血液の一部はinsulo-acinar portal systemを介して同一小葉内の外分泌組織へ再分布するとされている¹⁴⁾。当然ラ島を経由せずに直接腺房・膵管上皮細胞へ分布する他の経路も存在する¹⁵⁾が, いずれにしてもcarcinogenの多くは血行性あるいは経膵液性に標的細胞である膵管上皮細胞に到達しているはずである。Gingellら¹⁶⁾¹⁷⁾はBOP投与後, 膵液や胆汁中に分泌されているニトロソアミンは主としてHPOPであり, しかも膵液中のHPOP分泌量は胆汁中のその約1/4であったことを認めている。膵/肝重量比を考慮すると, このことはHPOPが膵へ比較的特異的に集積することを示す所見であり, さらに著者らの結果において発生した異型巢は組織学的にG(+)とG(-)の2つのタイプ¹⁸⁾に大別しえたが, おおのこの癌原物質としてはともにHPOP(あるいはその代謝物質)であると考えべきであろう。

ところでラットのラ島を障害するとinsuloacinar portal systemの支配領域は縮小されることが推察されている¹⁹⁾。すなわち, 相対的にラ島を経由しないで外分泌組織へ到達する血流の割合が増加するということになる。したがってAL併用のD・E群では, C群に比較してsmall ductに特徴的なG(-)病巣の発生頻度が減少していた原因として, ラ島を経由してsmall ductへ再流入する領域が縮小され, 同時にこの領域へ

到達した HPOP の量も減少していた可能性が推察される。一方、G (+) 病巣の発生数が増加し、BOP だけでは専ら large duct に発生していたものが AL 併与によって small duct にも少なからず発生するようになったが、これについてはラ島を介さずに直接腺房 (同一小葉内でも比較的辺縁部) へ到達した HPOP の量が増加していた、あるいはラ島で代謝されずに HPOP として比較的中枢側の小膵管へ分泌されていた量が増加していたという 2 つの機序が考えられる。このいずれの場合にも膵液中に分泌された HPOP が G (+) タイプの発癌の主因となっていることになる。その傍証としては、(1) AL 単独投与 (B 群) では杯状の形態を呈する粘液細胞は出現しなかったことから、AL の直接効果とは考えられない、(2) 胆汁濃縮作用を有する胆のう内には最も高濃度の HPOP が含まれているはずであるとともに、BOP 投与で胆のうに発生する Polyp 様病変の多くは G (+) のタイプのものである、(3) 胆汁の膵管内逆流防止処置を施しても膵 large duct に癌は発生する²⁰⁾、(4) 腺房細胞が障害されている場合の方が再生時よりも発癌率は低い²¹⁾、などがあげられる。

最後に本研究によって得られた現象は AL 投与によって G (+) 病巣の発生領域がより末梢側へ拡大したとも解釈できる。その場合、これはちょうどヒト胃の腸上皮化領域が加齢や慢性刺激によって口側へ拡大進展していく現象と類似している。ヒト胃における腸上皮化生は前癌病変とは考えられていないが、著者ら¹⁸⁾はハムスターにおける BHP 膵発癌実験では G (+) 異型巣はむしろ前癌的性格の強いことを報告しており、さらにこれは粘液組成やその好発部位からみてもヒト膵の mucous cell に相応するものであると考えられている。実際 Cubilla ら²²⁾²³⁾の報告でも mucous cell が metaplasia, hyperplasia, atypia のいずれの病巣をも構成しうるということが記されており、勝山ら²⁴⁾も粘液組織化学的に杯細胞化生が癌発生の母地になりうる可能性を示唆している。

以上より、ヒト膵管癌にも特有な癌原物質が存在すると仮定するならば、ラ島機能さらに粘液細胞増生の発生機序などの面から膵発癌の機序を解明していく一助となるものと推察された。

結 語

N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine [BOP] によるハムスター実験膵癌発生過程において、ラ島障害剤である Alloxan [AL] 投与の影響を知ることが目的とし

た。

1) AL 25mg/kg/2 日計12回腹腔内投与によって耐糖能は低下した。

2) 異型巣の平均発生個数は、BOP 単独投与群では 3.0個であったが、AL と BOP 同時投与群では 2.4個、AL 投与後 BOP 投与群では 2.6個とやや減少していた。

3) 異型巣・癌巣のうち、杯状の粘液産生細胞から成る [G (+)] 病巣の頻度は、BOP 単独投与群では 18% であったが、他の 2 群ではいずれも 43% と有意に高率であった。

4) G (+) 異型巣が末梢膵管に発生した頻度は、BOP 単独投与群では 9% であったが、他の 2 群では 30% 前後であった。

以上の原因として、ラ島障害に伴う本発癌剤の代謝が修飾されている可能性が推察され、今後ヒト膵癌発生の機序を解明していくうえでもラ島障害や粘液細胞増生の面から検討していく必要性が示唆された。

文 献

- 1) 加治和彦：ソマトメジンとインヒュリン。組織培養 5：364—372, 1979
- 2) Green RC, Baggenstones AH, Sprague R: Diabetes mellitus in association with primary carcinoma of the pancreas. Diabetes 7: 308—311, 1958
- 3) 林 訥欽, 森 洋, 織部孝史ほか：膵癌症例における糖尿病との関連性について。日消外会誌 15: 1758—1764, 1982
- 4) 山形敏一, 建部高明, 豊田隆謙：膵疾患と糖尿病。日臨 26: 544—552, 1968
- 5) Pour PM, Runge RG, Birt D et al: Current knowledge of pancreatic carcinogenesis in the hamster and its relevance to the human diseases. Cancer 47: 1573—1587, 1981
- 6) Pour P, Althoff J, Kruger FW et al: A potent pancreatic carcinogen in syrian golden hamsters. N-Nitrosobis (2-oxopropyl) amine. J Natl Cancer Inst 58: 1449—1453, 1977
- 7) 門田一郎：実験的糖尿病。小坂樹徳, 垂井清一郎, 出井健彦編。糖尿病—基礎と臨床—。東京, 朝倉書店, 1975, p108—113
- 8) 阿倍正和, 小坂樹徳, 吉村不二夫編：膵臓と内分泌。東京, 協同医書出版, 1958, p711
- 9) Pour PM, Donnelly K, Stepan K: Modification of pancreatic carcinogenesis in hamster model. 3. Inhibitory effect of alloxan. Am J Pathol 110: 310—314, 1983
- 10) Houssay BA, Orias O, Sara I: The mechanism

- of action of alloxan on blood sugar. *Science* 102 : 197, 1945
- 11) Pour PM, Stepan K: Modification of pancreatic carcinogenesis in the hamster model. VIII. Inhibitory effect of exogenous insulin. *JNCI* 72 : 1205—1208, 1984
 - 12) Pour PM, Patil K: Modification of pancreatic carcinogenesis in the hamster model. X. Effect of streptozotocin. *JNCI* 71 : 1059—1065, 1983
 - 13) Gingell R, Brunk G, Nagel D et al: Metabolism and mutagenicity of N-Nitroso-2-methoxy-2, 6-dimethyl morpholine in hamsters. *JNCI* 64 : 157—161, 1980
 - 14) Fujita T, Murakami T: Microcirculation of monkey pancreas with special reference to the insulo-acinar portal system. A scanning electron microscopic study of vascular casts. *Arch Histol Jpn* 35 : 255—263, 1973
 - 15) 高橋 徹, 柳沼信久, 京極方久: 人膵臓の血管構築と微小循環. *脈管学* 24 : 19—23, 1984.
 - 16) Gingell R, Pour P: Metabolism of the pancreatic carcinogen N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine after oral and intraperitoneal administration to syrian golden hamsters. *J Natl Cancer Inst* 60 : 911—913, 1978
 - 17) Gingell R, Brunk G, Nagel D et al: Metabolism of three radiolabeled pancreatic carcinogenic nitrosamines in hamsters and rats. *Cancer Res* 39 : 4579—4583, 1979
 - 18) Ishikawa O, Wada A, Oohigashi H et al: Relationship between goblet cells and carcinoma of the pancreas during N-Nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine-induced carcinogenesis in syrian golden hamster. *Cancer Res* 44 : 1630—1634, 1984
 - 19) 渡辺嘉久, 永田和之, 山本 亘ほか: 臓器微小循環—自動調節と病態—4) 膵. *脈管学* 24 : 25—27, 1984
 - 20) Pour P, Donnelly T: Effect of cholecystoduodenostomy and choledochostomy in pancreatic carcinogenesis. *Cancer Res* 38 : 2048—2051, 1978
 - 21) Scarpelli DG, Rao MS, Subbarao V: Augmentation of carcinogenesis N-Nitrosobis (2-oxopropyl) amine administered during s phase of the cell cycle in regenerating hamster pancreas. *Cancer Res* 43 : 611—614, 1983
 - 22) Cubilla AL, Fitzgerald PJ: Morphological patterns of primary non-endocrine human pancreas carcinoma. *Cancer Res* 35 : 2234—2246, 1975
 - 23) Cubilla AL, Fitzgerald PJ: Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. *Cancer Res* 36 : 2690—2698, 1976
 - 24) 勝山 努, 岡田洋一, 那須 毅: 膵臓癌の一剖検例—膵臓癌と膵管上皮のいわゆる杯細胞化生との関連. *癌の臨* 26 : 208—213, 1980