Streptozotocinによるインスリン産生膵島腫瘍の 発生過程における病態生理に関する研究

神戸大学医学部内科学第2講座

(主任: 馬場茂明教授)

鹿 住 敏

Biochemical Studies on Rats in the Course of the Induction of Insulin-Secreting Islet Cell Tumors by Streptozotocin

Tsutomu KAZUMI

The Second Department of Internal Medicine

Kobe University School of Medicine

Kobe, Japan

Director: Prof. Shigeaki Baba

This study was performed to examine the oncogenic action of streptozotocin on the endocrine pancreas in male Wistar rats and to clarify physiologic responses in the course of and after the tumor induction. In addition, induced tumors were examined histologically and measurements of pancreatic hormones in tumors were done using radioimmunoassay.

Young male Wistar rats were injected intravenously with 65mg/kg of streptozotocin alone, or with streptozotocin, 65mg/kg, preceded by 15 min. by a single intraperitoneal injection of nicotinamide, 500mg/kg, or of picolinamide, 250mg/kg. The administration of streptozotocin alone resulted in gross intolerance to glucose with flat and depressed plasma insulin response, whereas the diabetogenic action of the nitrosourea compound was partially prevented by pretreatment with nicotinamide or picolinamide. Although those animals pretreated with nicotinamide or picolinamide did not show any signs of overt diabetes, slightly abnormal glucose tolerance was found one week after treatment.

Serial oral glucose tolerance tests in rats treated with streptozotocin and nicotinamide showed that the elevation of blood glucose levels after glucose loading was depressed significantly 7 months after treatment. Plasma insulin responses were distinctly elevated 9 months following treatment. The mean insulinogenic index increased from 0.34 at one week after treatment to 1.01 at the 5th month and was 1.65 and 2.87 at 7 and 9 months following treatment, respectively. These results suggest that islet cell tumors had already been induced within 7 months. Induced neoplasms were capable of secreting large amounts of insulin 9 months following the injection.

Nine to 26 months after the various treatment schedules, 110 pancreatic islet cell tumors were induced in 11 out of 19 (58%), in 25 out of 30 (83%), and in 13 out of 16

rats (81%) treated with streptozotocin alone, or with streptozotocin and nicotinamide or picolinamide. Blood glucose levels — less than 100mg/100ml even after glucose load — were low, and plasma insulin levels rose markedly following glucose load in tumor-bearing rats. Thus, insulinogenic responses were much greater as compared to those of tumor-free rats. No significant difference was observed among the rats with tumors induced by streptozotocin alone, or by streptozotocin with nicotinamide or picolinamide with regard to their blood glucose and plasma insulin responses to an oral glucose load. These findings suggest that pancreatic islet cell tumors induced by streptozotocin with and without nicotinamide or picolinamide are insulin-secreting, and that streptozotocin itself has oncogenic effects on the rat endocrine pancreas.

While pancreatic tissue from tumor-free rats contained 14 U/g wet weight of insulin, mean insulin concentrations in islet cell tumors amounted to 401 U/g wet weight, indicating that insulin-secreting tumors induced by streptozotocin have large stores of insulin. In addition, pancreatic glucagon was demonstrated immunochemically in some tumors, suggesting that these neoplasms consisted of at least more than one type of pancreatic endocrine cell.

Pancreatic islet cell tumors measuring up to 0.9cm were round, well-delineated, and were frequently observed in the splenic segment. They had a thin fibrous capsule and their cells stained, in general, with aldehyde-fuchsin. Ultrastructurally, most tumors examined consisted of granulated B cells, although the number of secretory granules appeared to be less than that of non-neoplastic B cells. The units of rough-surfaced endoplasmic reticulum appeared prominent. Cells whose secretory granules were similar to those of pancreatic A cells were encountered, while those characteristics of D cells were not encountered in the tumors examined.

Neither macroscopic nor microscopic abnormalities were observed in livers of tumor-bearing rats.

I. い と ぐ ち

実験動物における膵臓腫瘍、特に膵ラ島腫瘍の自然発生はきわめて稀れであり⁽⁴¹⁾、ラットにおいてもその発生率はきわめて低い⁽⁴²⁾。

近年、臓器特異性発癌物質のあいつぐ発見によって実験動物の特定臓器に選択的かつ高率に癌を発生させることが可能となって癌研究に広く応用されている。膵ラ島腫瘍の実験的作成は困難でありその報告も少ない。しかも現在のところこれらの研究の重点は化学構造と臓器特異性の関係等の基礎的検討、発生した膵ラ島腫瘍の組織学的検索におかれており、とくに腫瘍発生過程ならびに担腫瘍ラットにおける病態生理に関する報告はごく稀れである。

最近、Rakietin⁽³⁵⁾、Volk⁽³⁶⁾、馬場⁽⁵⁾、土井⁽¹¹⁾らによって streptozotocin (以下、STZ と略す) と nicotinamide との併用投与により膵ラ島腫瘍が高率に発生することが報告された。STZ は *Streptomyces achromogenes* から単離された nitrosoourea 化合物で、抗細菌作用⁽⁵⁵⁾、抗腫瘍作用⁽¹³⁾ および催糖尿病作用⁽³³⁾ を有する。この催糖尿病作用は膵A細胞にほとんど影響を与えることなくB細胞を選択的に破壊することによって発現する。STZ 投与後比較的早期に膵ラ島内の NAD 含有量の著明な減少が認められる⁽²⁾。一方、NAD 合成過程における前駆物質である nicotinamide の併用投与は STZ の抗腫瘍作用に影響を与えることなく催糖尿病作用のみを抑制するが⁽⁴³⁾、ラ島内 NAD 含有量の減少が認められないことが報告されている⁽²¹⁾。

今回、著者は STZ 単独、STZ と nicotinamide あるいはその異性体である picolinamide との併用投与により、ラット膵内分泌に対する STZ の催腫瘍作用を検討し、腫瘍の発生過程ならびに担腫瘍ラットの病態生理を観察した。あわせて腫瘍の病理組織学的検索および膵ホルモン含有量を測定し、作成された腫瘍は主としてインスリン産生細胞性腫瘍であることなど、その発現に関して興味ある知見を得たので報告する。

II. 実験材料および方法

1. 実験動物

体重150から200gのWistar系雄ラットを実験動物として用いた。以下述べる実験の時以外は固型飼料オリエンタルMF(オリエンタル酵母, 東京)と水道水を自由に摂らせた。

2. 使用薬剤ならびにその投与方法

ラットを16時間絶食した後、65mg/kg体重のSTZ(Upjohn, USA, Lot, 1613E)を軽いエーテル麻酔下に尾静脈内に投与した(以下、S群と略す)。STZは0.01 M citrate bufferに溶解後ただちに使用した。Nicotinamide(半井化学, 京都, Lot, MG 38325)とpicolinamide(半井化学, Lot, H00423)は蒸留水に溶解し、それぞれ500, 250mg/kg・体重をSTZ投与15分前に腹腔内に投与した(以下、それぞれSN, SP群と略す)。S, SNおよびSP群にはそれぞれ150, 40および29匹のラットを使用した。

3. 経口ブドウ糖負荷試験

経口ブドウ糖負荷試験(以下、糖負荷試験と略す)はラットを16時間絶食した後、pentobarbital麻酔下で施行した。ブドウ糖は50%溶液を用いて3 g/kg・体重をポリエチレン・チューブにて胃内に投与した。糖負荷前、負荷後30, 60および120分に頸静脈から採血し、血糖はAuto-Analyzer® テクニコンを用い、Hoffman法⁽²⁾により、血中インスリン(以下、IRIと略す)は2抗体法⁽³⁾により測定した。また、Seltzerらの方法⁽⁴⁾に準じて糖負荷後30分のinsulinogenic index(以下、IIと略す)を算出した。

STZを投与して9から26ヶ月間経たラットをpentobarbital麻酔下に開腹し、膵臓および肉眼的に確認された膵腫瘍を摘出し、ただちに以下の実験に供した。

4. 組織標本の作成

光学顕微鏡用の標本作成にはBouin液で固定後、パラフィンに埋理し、hematoxylin-eosin染色, azan染色を行なった。膵腫瘍および膵組織の一部にはMasson染色のGoldner変法⁽⁷⁾を後染色としてaldehyde-fuchsin染色⁽⁸⁾を施行した。

電子顕微鏡用にはMillonigの磷酸緩衝液で稀釈した2% glutaraldehyde液で1時間固定し、さらに1% osmium tetroxide液で1時間後固定を行ない、ethanol系列で脱水後エポキシ樹脂埋理⁽⁹⁾を行なった。超薄切片を酢酸ウラニールとクエン酸鉛で二重染色⁽³⁾し、日立HS-8型電子顕微鏡で観察した。

膵腫瘍の存在が確認された例においては肝臓の光学顕微鏡による組織学的検索も施行した。

5. 膵腫瘍のインスリンおよびグルカゴン含有量

摘出した膵臓および膵腫瘍を秤量した後凍結し、インスリンおよびグルカゴンを酸アルコール法にて抽出した。インスリンは2抗体法⁽³⁾、グルカゴンは30Kを抗体としてデキストラン・チャコール法⁽⁴⁾を用いたradioimmunoassayにより測定した。

なお、推計学的検定はStudent "t" testにより行なった。以下述べる数値はすべて平均±標準偏差である。

III. 実験成績

1. STZ投与後急性期の糖代謝

図1はSTZ投与1週間後のS群、SN群およびSP群における糖負荷試験の血糖、IRIを比較したもので

ある。S群では空腹時血糖は $168 \pm 26 \text{ mg/100ml}$ と対照の $87 \pm 5 \text{ mg/100ml}$ と比較して有意($P < 0.005$)に高く、糖負荷後30, 60および120分においても 361 ± 22 , 464 ± 25 および $461 \pm 32 \text{ mg/100ml}$ で有意(それぞれ $P < 0.001$)に、かつ著明な過血糖を呈した。また、IRIも糖負荷に対する分泌反応がまったく認められず終始低値であった。これらの重症インスリン欠乏型糖尿病ラットは1日尿量が90から100ml, 1日尿糖排泄量が10gにも達し、その大多数は数ヶ月で糖尿病性白内障が出現した。また、発育も不良で1年以上の生存率はきわめて低かった。

Fig. 1. Blood glucose and plasma insulin (IRI) levels during oral glucose tolerance tests in rats 1 week after treatment with streptozotocin alone (A, 7 rats), streptozotocin and nicotinamide (B, 7 rats) or picolinamide (C, 7 rats) and in normal controls (D, 9 rats). In this and subsequent figures vertical lines represent standard errors of the mean.

Fig. 2. Serial changes of blood glucose and plasma insulin (IRI) responses to oral glucose load in rats treated with streptozotocin and nicotinamide. The n in parentheses represents the number of animals in each group.

一方, SN および SP 群ではごく軽度の耐糖能異常が認められるにすぎなかった。すなわち, SN 群では空腹時, 糖負荷後30および60分における血糖はそれぞれ 56 ± 3 , 158 ± 10 および 196 ± 17 mg/100ml で, 正常対照の 87 ± 5 , 137 ± 7 および 160 ± 9 mg/100ml と比較して有意差は認められなかったが, 負荷後120分値は 265 ± 24 mg/100ml で対照の 194 ± 7 mg/100ml に比して有意 ($P < 0.005$) に高値であった。IRI も全体に低く, かつ正常対照と比較して有意差は認められなかったが, 糖負荷に対する分泌反応も認められた。SP 群の耐糖異常は SN 群のそれよりさらに著明であった。糖負荷前, 負荷後30分の血糖はそれぞれ 64 ± 8 , 151 ± 8 mg/100ml で正常対照と比較して有意差はみられなかったが, 60および120分では 233 ± 17 と 295 ± 20 mg/100ml で有意 (それぞれ $P < 0.005$, < 0.01) に高値であった。血糖値は糖負荷試験のすべての時点において SN 群と有意差はみられなかったが, IRI は経口糖負荷に対する分泌反応こそ認められたが糖負荷後30と60分で有意 (それぞれ $P < 0.005$) に低値を示した。SN および SP 群では顕性糖尿病の発症はみられず, かつ長期間の生存率を保つことができた。

これらの耐糖能異常を I I でみると, 正常対照群のそれが 0.73 ± 0.26 であるのに反し, S 群では 0 に等しく, SN および SP 群ではそれぞれ 0.34 ± 0.09 および 0.13 ± 0.03 と低下していた。

2. 腫瘍の発生過程における糖代謝の推移

SN 群の糖負荷試験における血糖と IRI の推移を示したものが Fig. 2 である。糖負荷後の血糖値は 1 週間目と比較して 5 ヶ月目でそれぞれ低下傾向がみられ, 血糖上昇(頂値と空腹時血糖値との差)も 208 ± 25 から 136 ± 22 mg/100ml に抑制されていた。7 ヶ月目では糖負荷による血糖上昇も 73 ± 10 mg/100ml とさらに抑制され, 血糖値もそれぞれ著明に低下した。すなわち, 負荷後30, 60および120分ではそれぞれ 169 ± 15 から 129 ± 8 , 186 ± 20 から 129 ± 11 および 228 ± 24 から 138 ± 12 mg/100ml と 5 ヶ月目と比較して有意に低下していた (それぞれ, $P < 0.05$, < 0.025 および < 0.01)。糖負荷後の血糖値は 9 ヶ月目でさらに低下し, それぞれ 111 ± 11 , 102 ± 8 および 113 ± 9 mg/100ml であった。また, 空腹時血糖も 51 ± 7 mg/100ml であった。

これらの血糖の推移に伴って経口ブドウ糖負荷に対するインスリン分泌反応も 5 および 7 ヶ月目では一週間目と比較して高反応であった。さらに, 9 ヶ月目では空腹時の IRI も 44 ± 9 μ U/ml と高く, 糖負荷後30, 60および 85 ± 17 μ U/ml と過剰なインスリン分泌反応がみられた。これらのラットではすでに肉眼的に膵腫瘍が認められた例も存在した。

糖負荷に対する血糖と IRI の反応の推移を I I で観察すると 1 週間目に 0.34 ± 0.09 であった I I は 5 および 7 ヶ月目にはそれぞれ 1.01 ± 0.40 および 1.65 ± 0.77 と時間の経過とともに漸増し, 9 ヶ月目においては, 2.87 ± 0.62 と 1 週間目の I I と比較して有意 ($P < 0.005$) に上昇した。

Table 1. Incidence of pancreatic islet cell tumors in male Wistar rats induced by streptozotocin, 65mg/kg, i.v., with and without nicotinamide, 500mg/kg, or picolinamide, 250mg/kg, i.p.

Treatment	Number treated	Number survived 9 months or longer	Animals with tumors	?
Streptozotocin	150	19	11	58
Streptozotocin + Nicotinamide	40	30	25	83
Streptozotocin + Picolinamide	29	16	13	81
	219	65	49	75

3. 膵ラ島腫瘍の発生率

STZ 投与後9ヶ月以上生存した65匹のラットの44匹に(68%)肉眼的に94個の膵腫瘍の発生が認められた。光学顕微鏡による組織学的検索によりこれら44匹のラットの2匹に2個、新たな5匹に14個の微小腺腫が認められた。全体では65匹中49匹(75%)に108個の膵腫瘍の発生が認められた(Table. 1)。

作成方法別による腫瘍発生率はS群で58%, SN群で83%, SP群では81%であった。肉眼的に認められた腫瘍の直径は1~9mmで楕円形ないしはほぼ円形であった。腫瘍表面の色調は赤味を帯び、硬く、周囲の膵組織より突出しており、その境界は鮮明であった。肉眼的な腫瘍が確認されなかったラットの中には光学顕微鏡による組織学的検索で微小腺腫が発見された例もあり、中には微小腺腫のみが6個もみられた例もあった。膵腫瘍が多発生であったラットは27匹でその多くはそれぞれ2から3個の腫瘍を有しており、残りの22匹では孤立性であった。腫瘍は正常膵ラ島の分布と一致して splenic segment に多く認められた。

Fig. 3. Photomicrographs of pancreatic islet cell tumors induced by streptozotocin alone (d), streptozotocin with nicotinamide (a and c) and with picolinamide (b).

4. 腫瘍の光学顕微鏡的所見

腫瘍の組織学的性状は各例によって、また同一例でも腫瘍の部位によって多少の相違がみられた。腫瘍は薄い結合組織性被膜に包まれ、その横断面では立方状ないしは多角形の明るい腫瘍細胞が蜂巢状に充実していた(Fig. 3, a, b)。被膜から結合組織線維が内方に向かって索状に侵入することにより腫瘍は分割され、

腫瘍細胞は房状または索状に配列されていた。多くの腫瘍細胞では aldehyde-fuchsin に青紫色に良染する分泌顆粒がみられ、この顆粒は血管腔に面した細胞質内に多く認められた (Fig. 3, C.)。細胞核は円形ないし卵円形でその発達は良く、大小不同がみられたが染色質はほぼ均等で核質は明るかった。核小体は大きくかつ鮮明であるが分裂像はほとんどみられなかった。腫瘍内には血管の分布が豊富でしばしば出血を伴っていた。直径数mmを超える大きな腫瘍では出血とともに壊死が著明で硝子変性が認められた。膵臓内に発生した腫瘍の辺縁部には膵外分泌部にみられる膵管類似構造がみられ (Fig. 3, d), 外分泌細胞に酷似した細胞が混入している腫瘍もみられた。

検索した範囲内では肝臓に肉眼的、光学顕微鏡的に特記すべき所見はみられなかった。

5. 腫瘍の電子顕微鏡的所見

腫瘍は一般に分泌顆粒を有する細胞より構成されていた。その分泌顆粒は直径800から2000 Å で電子密度は比較的高く、明瞭な限界膜と比較的幅広い halo がみられ、B顆粒と思われた。顆粒の大きさは正常B細胞のそれより一般に小さく、大小不同も認められた。また、その数は腫瘍細胞によっても差がみられ、ごく少ないものから非常に豊富なもの (Fig. 4, a) までみられたが、正常ラ島のそれと比較して一般に少なかった。

細胞核の胞体内での占める割合が大きく、粗面小胞体の発達が良好で所によってはのう胞状に拡張している像がしばしばみられ、胎生期B細胞に酷似した腫瘍細胞も認められた (Fig. 4, b)。

検索した範囲内で典型的なAあるいはD細胞は認められなかったが、時には正常ラ島にみられるようなA顆粒に酷似した分泌顆粒を有する腫瘍細胞も認められた。

Fig. 4. Electronmicrographs of islet cell tumors of the rat pancreas induced by streptozotocin alone (b) and streptozotocin with nicotinamide (a).

6. 担腫瘍ラットの糖代謝

担腫瘍ラットはしばしば低血糖発作をおこし死亡した。その時の血糖は26から38mg/100ml で IRI は94から194 μ U/mlであった。

STZ 投与後9ヶ月以上生存したラットで肉眼的あるいは組織学的検索により腫瘍の確認された例における糖負荷試験の成績を示したものが Fig. 5 である。16時間絶食後の血糖は 61 ± 4 mg/100ml で、腫瘍の発生がみられなかったラットの 96 ± 8 mg/100ml と比較して有意 ($p < 0.01$) に低く、IRI は 47 ± 5 μ U/ml と有意 ($p < 0.05$) に高値を示した。経口糖負荷による血糖と IRI の反応様式にも腫瘍の有無により顕著な差がみられ

た。すなわち、担腫瘍ラットの血糖は糖負荷後30分で 97 ± 6 mg/100mlと増加したが、60および120分値はそれぞれ 90 ± 5 , 102 ± 7 mg/100mlで血糖曲線はほぼ平坦であった。一方、腫瘍が発生しなかったラットでは血糖は漸増し120分値は 155 ± 24 mg/100mlであった。糖負荷に対するインスリン分泌反応はさらに顕著で、腫瘍の認められなかったラットではIRIの増加が軽微であるのに対し、担腫瘍ラットでは糖負荷後30分で 47 ± 5 から 132 ± 12 μ U/mlと著明かつ有意 ($P < 0.001$) に増加し、60分でも 93 ± 11 μ U/mlと有意 ($P < 0.005$) に高値であった。この血糖、IRIの顕著な反応は脾腫瘍の個数とは関係なく、微小腫瘍をただ1個有するラットにおいても認められた。

Fig. 5. Blood glucose and plasma insulin (IRI) responses to oral glucose load in tumor-bearing and tumor-free rats. The n in parentheses represents the number of animals in each group.

脾腫瘍の作成方法別に糖負荷試験の成績を比較すると (Fig. 6), 空腹時の血糖はすべて70mg/100ml以下であり、糖負荷による血糖の増加は軽度で終始100mg/ml以下であったものが大部分を占めていた。糖負荷に対するインスリン分泌のパターンも3群において類似しており、S群、SNおよびSP群において糖負荷後30分ではそれぞれ 49 ± 7 から 118 ± 24 , 50 ± 6 から 152 ± 13 , および 28 ± 12 から 80 ± 20 μ U/mlと過剰なインスリン分泌反応が認められた。これらの経口負荷に対する血糖とIRIの反応をIIでみるとS群では、 1.66 ± 0.52 , SN群では 3.43 ± 0.96 , SP群では 3.60 ± 1.03 で3群間に有意差は認められなかった。全体としてみると 2.93 ± 0.58 で腫瘍の発生が認められなかったラットの 0.82 ± 0.21 に比し著明な高値であった。

7. 腫瘍のインスリンおよびグルカゴンの性格

酸アルコール法により抽出された腫瘍のインスリンおよび腫瘍のみられなかった脾臓より抽出されたインスリンは標準として用いたラットインスリンと免疫化学的に同一のものであり (Fig. 7), それぞれ別の11個の腫瘍中のインスリン含有量は 401 ± 113 U/g・湿重量で、腫瘍のみられなかった脾臓の 14 ± 7 U/g・湿重量と比較して有意 ($P < 0.05$) に高値であった。さらに腫瘍のみられなかった脾臓および腫瘍から抽出された脾グルカゴンについても免疫化学的にブタグルカゴンと同一のものであった。 (Fig. 8), 腫瘍のみられなかった脾臓および腫瘍中のグルカゴン含有量はそれぞれ5199, 6545 ng/g・湿重量であった。

Fig. 6. Comparison of blood glucose and plasma insulin (IRI) responses in rats with insulin-secreting islet cell tumors induced by streptozotocin alone (A), streptozotocin with nicotinamide (B) or picolinamide (C). Dotted lines represent those of tumor-free rats. The n represents the number of animals in each group.

Fig. 7. Insulin standard curve and dilution curves of rat pancreas and tumor extracts.

Fig. 8. Glucagon standard curve, using 30K antiserum, and dilution curves of rat pancreas and tumor extracts.

IV. 考 察

1. 発生実験について

膵ラ島腫瘍の実験的作成はハムスターでBKウイルスにより腺癌の発生がみられ⁽⁵⁴⁾、ラットにおいてはX線照射⁽⁷⁾⁽²⁹⁾⁽³⁹⁾⁽⁶⁷⁾、中性子照射⁽²²⁾、種々のalkaloid⁽²³⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾あるいはquinoline誘導体⁽²²⁾による報告がみられるにすぎない。ラットに作成された腫瘍は組織学的にはB細胞からなる腺腫がほとんどであるが、まれには腺癌の発生も報告されている。X線照射による腫瘍の発生率はラットの系統、照射方法および照射後の期間によって異なるが全体として低く、他の内分泌臓器および腎臓の腫瘍を高率に併発する。致死量以下のX線1回全身照射によるWistar⁽⁷⁾およびSprague-Dawleyラット⁽³⁹⁾における腫瘍発生率はそれぞれ11, 19%であり、反復照射によるそれは22%である⁽²⁹⁾。また、alkaloid投与による初期の報告でも発生率は17%と低い⁽⁴⁴⁾。Quinoline誘導体の1つである6-diethyl-aminomethyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxideによるラ島腫瘍の発生率は59%と比較的高率であるが、ラ島腫瘍以外に腸癌および肺腺腫の合併がみられる⁽²²⁾。腫瘍の発生率の数字そのものは、著しく低い場合は例外として、あまり重要な所見であるとは思われないが、著者の示した50~79%、全体として65%という腫瘍発生率は高い。したがって、STZによる膵ラ島腫瘍の実験的作成は生存条件さえそろえばより確実、かつ簡便な方法といえる。

2. STZの催腫瘍作用について

今回、STZとnicotinamideとの併用投与のみならずpicolinamideとの併用投与、さらにSTZ単独投与によっても膵ラ島腫瘍が高率に発生し、作成方法のいかんにかかわらずインスリン産生膵B細胞腫瘍が主体であった。この事実は少なくともラット膵内分泌部に対してはSTZそれ自身が催腫瘍作用を有し、nicotinamideおよびpicolinamideは重症糖尿病の発症阻止、糖尿病による死亡率の低下、ひいては寿命の延長という役割を担っているものと思われる。実際にSTZの単独投与後10ヶ月経過した1匹のラットにB細胞腫瘍が発生したという報告がある⁽⁵⁰⁾。また、投与されたSTZは膵ラ島組織内のみならず腎皮質、肝臓組織

にも多量検出され⁽⁵³⁾, STZ 単独投与により Holtzman ラットにおいてこの2つの臓器に腫瘍が発生するという報告があるが⁽³⁾⁽³⁴⁾⁽⁴⁷⁾, STZ それ自身が催腫瘍作用を有するという事を裏付けるものである。STZ は 2-deoxy-D-glucose の2位の炭素に1分子の 1-methyl-1-nitrosourea (以下, MNU と略す) が結合した化学構造を有する⁽²⁴⁾。MNU は, 程度の差こそあれ, STZ と同様に膵ラ島内に取込まれ⁽⁵⁸⁾, NAD 含有量を低下させ⁽²⁾⁽²¹⁾, ブドウ糖刺激に対するインスリン分泌反応を抑制する⁽¹⁷⁾。さらに¹⁴C-STZ を用いた Karunayake らの成績⁽²⁷⁾によれば(3'-methyl-¹⁴C)-STZ のみが膵ラ島内に有意に検出され, (1-¹⁴C)-STZ および(2'-¹⁴C)-STZ は両者とも膵臓への集積はごく微量である。また, 後二者は前者と比較して尿中に速やかに排泄される⁽²⁸⁾。これらの事実から MNU が STZ の活性部分であり, ブドウ糖分子はラ島細胞への親和性を高めているものと思われる。一般にニトロソ化合物は経胎盤効果が著明で臓器特異性の高い, 強力な発癌剤で, その1つである MNU もラットに神経系の悪性腫瘍⁽⁵¹⁾を, マウスにリンパ腫および肺腺腫⁽²⁶⁾を発生させることから今回のインスリン産生膵臓B細胞腫瘍の発生においても STZ 分子中の MNU が STZ の催腫瘍作用において主要な役割を担っているものと思われる。

STZ の催腫瘍作用の機序は不明である。MNU 分子中の N-nitrosoalkane あるいは MNU の proximal carcinogen である diazomethane は DNA, RNA およびタンパク質をメチル化するとされており⁽¹⁶⁾, このアルキル化が一般の N- ニトロソ化合物と同様に STZ の催腫瘍作用と関連あるものと思われる。Nicotinamide は膵ラ島内に取込まれて⁽⁵²⁾ STZ の膵B細胞の破壊作用のみならず, 膵ラ島に対する MNU の作用も抑制する⁽²¹⁾。今回, nicotinamide と STZ との併用投与によっても膵ラ島腫瘍が高率に発生したという事実からラ島内での STZ によるアルキル化は nicotinamide の存在下でも惹起されるものと思われる。

STZ が膵内分泌部に多く取込まれ膵ラ島腫瘍を高率に発生させるのに対し, MNU は外分泌部に多く取込まれ⁽²⁾ モルモットに外分泌の腺癌を発生させる⁽¹²⁾⁽³⁷⁾。この STZ と MNU の膵内外分泌に対する影響の関連性はある種の quinoline 誘導体の間にもみられる⁽²²⁾。すなわち, 強力な発癌剤である 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide はラット膵外分泌部に親和性が高く, 長期生存例で高率に膵腺房腺腫の発生がみられる。一方, 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide の quinoline に diethylaminomethyl 基を導入した 6-diethylaminomethyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide は膵ラ島細胞に親和性が高く, 高率に膵ラ島腫瘍の発生が認められる⁽²¹⁾。膵内外分泌に与える影響の差異は側鎖の違いによるものと思われ, 発癌剤の臓器特異性という点で興味ある事実である。

ラ島腫瘍の発生過程における病理組織についての詳細な報告はなく, 腫瘍細胞の起源もまた不明である。発生過程において耐糖能異常がみられることから, この耐糖能異常がB細胞を疲弊状態に陥らせ, ついで過形成あるいは偏移をおこし, ついには腺腫への移行という過程, すなわち, 既存のラ島の腺腫様移行という可能性が想定される⁽¹⁰⁾⁽⁵⁷⁾。さらに, 今回膵臓内に埋没した腫瘍の辺縁部に膵管類似構造がみられたことやイヌの自然発生膵ラ島腺癌⁽⁸⁾やX線照射による膵ラ島腫瘍⁽⁷⁾で腫瘍細胞が膵導管上皮と直接連絡している像がみられることから, 腫瘍形成の場として胎生期の膵ラ島の発生過程と同様に膵導管上皮も想定され, 今後検討されるべき問題と思われる。

STZ により誘発しうる膵ラ島腫瘍はほぼ純粋なインスリン分泌細胞の集合体といえる。本腫瘍の研究は発癌機構の解明のみならず, B細胞の発生起源と発育過程, プロインスリンやインスリンの合成あるいは前者から後者への転換酵素, インスリンの分泌機序等と解明にも利用しうる。最近, STZ により作成した膵ラ島腫瘍がヒトのそれと同様に STZ に感受性があるという報告⁽³⁶⁾もみられ, 本腫瘍の臨床研究への応用も考えられる。

3. 病態生理について

腫瘍の発生過程における実験動物の病態生理に関する報告はほとんどみられない。X線照射⁽⁵⁷⁾, quinoline 誘導体⁽²²⁾および STZ と nicotinamide との併用投与⁽¹⁰⁾によりそれぞれ耐糖能異常がみられることから腫瘍の

発生過程とこの耐糖能異常との関連性を推論しているにすぎない。今回の著者の成績でも STZ 65mg/kg の単独投与では著明なインスリン欠乏型糖尿病が、STZ と nicotinamide あるいは picolinamide との併用投与においても軽度ないしは中等度の耐糖能異常が認められた。また、STZ と nicotinamide との併用投与を行ったラットにおいて糖負荷試験の推移を観察してみると、糖負荷による血糖上昇は時間の経過とともに漸減し、7 ヶ月目では糖負荷後の血糖値もすべて有意に低下した。糖負荷後の血糖の動きは 9 ヶ月目ではさらに少なく血糖曲線はほぼ平坦であった。これらの血糖の推移に呼応して経口ブドウ糖負荷に対するインスリン分泌反応は 7 ヶ月まで漸増し、9 ヶ月目では負荷後 30 分で 44 から 167 μ U/ml へと著明に上昇した。また、I I も投与後 1 週間目の 0.34 から漸次増加し、9 ヶ月目では 2.87 と有意に上昇した。これらの事実は STZ と nicotinamide の併用投与後 7 ヶ月以内に過剰インスリン分泌反応こそみられないが、すでに膵ラ島腫瘍細胞の増殖している可能性を示唆し、9 ヶ月目では、発生した腫瘍は過剰なインスリン分泌能を有することを意味するものである。

腫瘍の発生過程のみならず担腫瘍ラットの病態生理に関する報告もごくまれである。Dixit と Bauer⁴⁰⁾ は STZ と nicotinamide との併用投与により作成した膵ラ島腫瘍を有するラットを経静脈性ブドウ糖負荷に対する血糖の反応様式から低血糖群と高血糖群に分類し、前者を“fast-acting tumor”、後者を“slow-acting tumor”と呼んだ。しかし、著者の成績では同様の方法で作成した腫瘍を有するラットの経口糖負荷に対する血糖および IRI の反応様式は酷似したものがほとんどであった。すなわち、血糖は終始低く、IRI は過剰分泌反応を示した。この反応様式の差異は、実験動物の種差によるものとも思われるが今のところ経静脈性糖負荷に対する IRI 反応の記載がなく詳細は不明である。

少くとも著者の作成方法別に糖負荷試験の成績を比較の上では、血糖および IRI の反応様式は酷似し、糖負荷による軽度の血糖上昇と IRI の過剰分泌反応がみられた。これらの事実から作成方法のいかんにかかわらず、発生した膵ラ島腫瘍はインスリン分泌性腫瘍がほとんどであると思われ、腫瘍細胞内に aldehyde-fuchsin 陽性顆粒および電顕的に B 顆粒が確認されたことはこのことを裏付けるのである。また、粗面小胞体の発達が良好であるという事実は本腫瘍のタンパク合成、ひいてはインスリン産生の亢進を示唆するものと思われる。

Volk らの成績⁵⁶⁾では腫瘍を有しないラットと担腫瘍ラットとの間には非絶食時の血糖および IRI に有意差が認められないが、著者の成績では担腫瘍ラットの空腹時の血糖、IRI はそれぞれ 61 ± 4 mg/100ml, 47 ± 5 μ U/ml で腫瘍の確認でできなかったラットのそれと比較してそれぞれ有意差が認められた。糖負荷後の血糖、IRI の変動は腫瘍の有無によりさらに著明であった。すなわち、担腫瘍ラットでは糖負荷にもかかわらず血糖の上昇はほとんどみられず、インスリン分泌反応は著明であったのに反して、腫瘍を有しないラットでは血糖の漸増と IRI の軽度の上昇が認められるにすぎなかった。この経口糖負荷に対する著明な変化は微小腺腫をただの 1 個有するラットにも認められ、腫瘍発生の有無を検索するには経口ブドウ糖負荷試験の施行、特に 30 分後の IRI の測定が有意義であった。

Syrian ハムスターにみられる移植可能な膵ラ島腫瘍²⁰⁾は高インスリン血症を伴う低血糖症を誘発させるにもかかわらず腫瘍中のインスリン含有量は正常膵の約 1/10 と著明に低い⁴⁹⁾。電子顕微鏡による組織学的検索でも典型的な B 顆粒がほとんど認められない¹⁴⁾⁽⁴⁸⁾ことから、このハムスターのラ島腫瘍は十分なインスリン分泌能力を有するが貯蔵能力はきわめて小さいと思われる。一方、今回の STZ による膵ラ島腫瘍のインスリン含有量は 401 U/g で正常対照膵のそれと比較して有意に高かった。組織学的にも aldehyde-fuchsin 陽性顆粒および典型的な B 顆粒が認められていることから本腫瘍は十分なインスリン貯蔵能力を有するものと思われる。さらに、これらの事実は経口糖負荷に対する過剰なインスリン分泌反応を裏付けるものである。

本腫瘍中に正常対照膵から抽出できるのと同じ程度の膵グルカゴンの存在が認められ、免疫化学的に対照膵のそれと同一のものであった。組織学的にも、典型的な A 細胞は認められなかったが、A 顆粒類似の分泌

顆粒を有する腫瘍細胞もごくわでか認められ、A細胞も混在するものと思われる。ハムスターの自然発生ラ島腫瘍ではB細胞⁽¹⁰⁾以外にもA細胞⁽¹²⁾およびカテコラミン分泌細胞⁽¹¹⁾がみられたという報告がある。実験的ラ島腫瘍ではいまだ確認されていないが、ヒトのインスリノーマ⁽⁶⁾⁽⁹⁾と同様にB細胞のみでなく複数の内分泌細胞から構成されている可能性がある。

V. 結 論

STZ の単独投与、STZ と nicotinamide あるいは picolinamide との併用投与を行った Wistar 系雄ラットを長期間観察し、膵内分泌に対する STZ の催腫瘍作用を検討し、腫瘍発生過程における病態生理の解明を試みた。さらに、担腫瘍動物における病態生理を追求し、以下の結論を得た。

- 1) STZ と nicotinamide および picolinamide との併用投与のみならず STZ 単独投与によっても膵ラ島腫瘍を高率に発生せしめた。
- 2) 作成方法のいかにかわらず、誘発した腫瘍は、a) 高インスリン血症を伴う低血糖の自然発生、b) aldehyde-fuchsin 陽性顆粒および電顕的にB顆粒の存在、c) 経口ブドウ糖負荷に対する過剰インスリン分泌反応、d) 高濃度のインスリン含有量、という事実から腫瘍の大部分がインスリン産生膵B細胞腫瘍であった。
- 3) 腫瘍中には正常対照膵から抽出されるのと同じ程度の膵グルカゴンの存在が免疫化学的に証明された。また、腫瘍より抽出されたインスリン、グルカゴンは免疫学的に正常対照膵より抽出されたインスリン、グルカゴンと同一の性格を示した。
- 4) STZ そのものがラット膵内分泌に対して催腫瘍作用を有するものと思われる。
- 5) 腫瘍の発生過程、STZ 投与一週間後において、程度の差こそあれ、耐糖能異常が認められた。
- 6) STZ と nicotinamide との併用投与を行ったラットでは7ヶ月以内にすでに膵ラ島腫瘍が発生している可能性が示唆され、9ヶ月ではすでに過剰なインスリン分泌能を有していた。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師馬場茂明教授に深謝すると共に、本研究に協力して頂いた芳野原学士ならびに糖尿病研究班の方々に心より謝意を表します。

なお、本論文の要旨は第5回国際内分泌学会において発表した。また、本論文の一部はEndocrinologyに投稿中である。

文 献

- 1) Amherdt, M., Orci, L., Track, N.S., Lambert, A.E., Kanazawa, Y. and Stauffacher, W.: An ultrastructural study of the islet cell tumor of the golden hamster. *Horm. Metab. Res.*, 3: 252–258, 1971.
- 2) Anderson, T., Schein, P.S., McMenamin, M.G. and Cooney, D.A.: Streptozotocin diabetes. Correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Clin. Invest.*, 54: 672–677, 1974.
- 3) Arison, R.N. and Feudale, E.L.: Induction of renal tumor by streptozotocin in rats. *Nature*, 214: 1254–1255, 1967.
- 4) Aguilar-Parada, E., Eisentraut, E.M., Unger, R.H.: Pancreatic glucagon secretion in normal and diabetic subjects. *Amer. J. Med. Sci.*, 257: 415–419, 1969.
- 5) 馬場茂明, 土井邦紘, 吉田宗儀, 金子滋夫: 実験的膵ラ氏島腫瘍, *Diabetes Journal*, 3: 1–11, 1975.
- 6) Boden, G., Owen, O.E., Rezvani, I., Elfenbein, B.I. and Quickel, K.E.: An islet cell carcinoma containing glucagon and insulin. Chronic glucagon excess and glucose homeostasis. *Diabetes*, 26: 128–137, 1977.

- 7) Boschetti, A.E. and Moloney, W.C.: Observations on pancreatic islet cell and other radiation-induced tumors in the rat. *Lab. Invest.* 15: 565–575, 1966.
- 8) Capen, C.C. and Martin, S.L.: Hyperinsulisms in dogs with neoplasia of the pancreatic islets. A clinical, pathologic, and ultrastructural study. *Path. Vet.*, 6: 309–341, 1976.
- 9) Creutzfeldt, W.: Pancreatic endocrine tumors – The riddle of their origin and hormone secretion. *Israel J. Med. Sci.*, 11: 762–776, 1975.
- 10) Dixit, P.K. and Bauer, G.E.: Studies on rats with islet beta cell tumors induced by nicotinamide and streptozotocin (39368). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 152: 232–236, 1976.
- 11) 土井邦紘: Streptozotocin 糖尿病の発症機序並びに発症阻止に関する実験的研究. *日本内分泌学会雑誌*, 51: 129–147, 1975.
- 12) Druckrely, H., Ivanlovic, S., Bücheler, J., Preussmann, R. and Thomas, C.: Erzeugung Von Magen – und Pankreas – krebs beim Meerschweinchen durch Methylnitroso-harnstoff und – urethan. *Zeisch, Krebsforsch*, 72: 167–182, 1968.
- 13) Evans, J.S., Gerritzen, G.C., Mann, K.M. and Owen, S.P.: Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin (NSC-37917) and its cofactor, V-15774. *Cancer Chemother. Rep.*, 48: 1–6, 1965.
- 14) Falkmer, S., Boquist, L., Foá, P.P., Grillo, T.A.I., Baxter-Grillo, D.L., Sodoyez, J.C., Sodoyex-Goffaux, F. and Whitty, A.J.: Some histological, histochemical, and ultrastructural studies and hormone assays in a transplantable islet carcinoma of the Syrian hamster. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 77: 561–577, 1969.
- 15) Frei, J.V.: Toxicity, tissue changes and tumor induction in inbred Swiss mice by methyl-nitrosourea and-amide compounds. *Cancer Res.*, 30: 11–17, 1970.
- 16) Frei, J.V.: Tissue-dependent differences in DNA methylation products of mice treated with methyl-labelled methyl-nitrosourea. *Int. J. Cancer*, 7: 436–442, 1971.
- 17) Golden, P., Baird, L., Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F. and Walker, M.M.: Effect of 1-methyl-1-nitrosourea and streptozotocin on glucose-induced insulin secretion by isolated islets of Langerhans. *Diabetologia*, 12: 207–209, 1976.
- 18) Goldner, J.: A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Amer. J. Path.*, 14: 237–243, 1938.
- 19) Gomori, G.: Aldehyde-fuchsin: New stain for elastic tissue. *Amer. J. Clin. Path.*, 20: 665–666, 1950.
- 20) Grillo, T.A.I., Whitty, A.J., Kirkman, H., Foá, P.P. and Kobernick, S.D.: Biological properties of a transplantable islet-cell tumor of the golden hamster. I. Histology and histochemistry. *Diabetes*, 16: 409–414, 1967.
- 21) Gunnarsson, R., Berne, C. and Hellerström, C.: Cytotoxic effects of streptozotocin and N-nitrosomethylurea on the pancreatic B cells with special regard to the role of nicotiamide adenine dinucleotide. *Biochem. J.*, 140: 487–494, 1974.
- 22) Hayashi, Y., Furukawa, H. and Hasegawa, T.: Pancreatic tumors in rats induced by 4-nitroquinoline 1-oxide derivatives. The Second International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Topics in Chemical Carcinogenesis (Nakahara, W., Takayama, S., Sugimura, T. and Odashima, S.), pp. 53–72, University of Tokyo Press, Tokyo, 1972.
- 23) 林 裕造, 長谷川紀昭, 今井 清, 片山博雄: Monoctaline 投与による実験的インスローム, *日本病理学会雑誌*, 64: 154, 1975.
- 24) Herr, R.R., Jahnke, H.K. and Argoudelis, A.D.: The structure of streptozotocin. *J. Amer. Chem. Soc.* 89: 4808–4809,

1967. 25) Hoffman, W.S.: A rapid photoelectric method for the determination of glucose in blood and urine. *J. Biol. Chem.*, 120: 51–55, 1937.
- 26) Joshi, V.V. and Frei, J.V.: Effects of dose and schedule of methylnitrosourea in incidence of malignant lymphoma in adult female mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 45: 335–339, 1970.
- 27) Karunanayake, E.H., Baker, J.R.J., Christian, R.A., Hearse, D.J. and Mellows, G.: Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (¹⁴C)-streptozotocin in the rat. *Diabetologia*, 12: 123–128, 1976.
- 28) Karunanayake, E.H., Hearse, D.J. and Mellows, G.: Streptozotocin: Its excretion and metabolism in the rat. *Diabetologia*, 12: 483–488, 1976.
- 29) Lt. Colonel, C.C. and Berdjis, M.C.: Protracted effects of repeated doses of X-ray irradiation in rats. *Exp. Mol. Path.*, 2: 157–172, 1963.
- 30) Luft, J.H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 409–414, 1961.
- 31) Morgan, C.R. and Lazarow, A.: Immunoassay of insulin: Two antibody system: Plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. *Diabetes*, 12: 115–126, 1963.
- 32) Nonaka, D., Grillo, T.A.I. and Foa, P.P.: Glucagon secretion in normal rats and hamsters and in hamsters with transplantable islet cell tumor. In: Falkmer, S., Hellman, I.B. Taljedal (Eds.): *The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets*. Proc. of an International Symposium, Umea, Sweden, February 17–19, 1969. Pergamon Press, Oxford (1970), p. 149–155.
- 33) Rakieten, N., Rakieten, M.L. and Nakarai, M.V.: Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother. Rep.*, 29: 91–98, 1963.
- 34) Rakieten, N., Gordon, B.S., Cooney, D.A., Davis, R.D. and Schein, P.S.: Renal tumorigenic action of streptozotocin (NSC-85998) in rats. *Cancer Chemother. Rep.*, 52: 563–567, 1968.
- 35) Rakieten, N., Gordon, B.S., Beaty A., Conney, D.A., Davis, R.D. and Schein, P.S.: Pancreatic islet cell tumors produced by the combined action of streptozotocin and nicotinamide (35561). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137: 280–283, 1971.
- 36) Rakieten, N., Gordon, B.S., Beaty, A., Bates, R.W. and Schein, P.S.: Streptozotocin treatment of streptozotocin-induced islet cell adenomas in rats (39275). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 151: 632–635, 1976.
- 37) Reddy, J.K. and Rao, M.S.: Pancreatic adenocarcinoma in inbred guinea pigs induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res.*, 35: 2269–2277, 1975.
- 38) Reynolds, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208–212, 1963.
- 39) Rosen, V.J. Jr., Castanera, T.J., Jones, D.C. and Kimeldorf, D.J.: Islet-cell tumors of the pancreas in the irradiated and nonirradiated rat. *Lab. Invest.*, 10: 608–616, 1961.
- 40) Rosen, V.J. Jr., Castanera, T.J., Kimeldorf, D.J. and Jones, D.C.: Pancreatic islet cell tumors and renal tumors in the male rat following neutron exposure. *Lab. Invest.*, 11: 204–210, 1962.
- 41) Rowlatt, U. and Roe, F.J.C.: Epithelial tumors of the rat pancreas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 39: 17–25, 1967.
- 42) Rowlatt, U.: Spontaneous epithelial tumors of the pancreas of mammals. *Brit. J. Cancer*, 21: 82–107, 1967.
- 43) Schein, P.S., Cooney, D.A. and Vernon, M.L.: The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res.*, 27:

- 2324–2332, 1967. 44) Schoental, R., Fowler, M.E. and Coody, A.: Islet cell tumors of the pancreas found in rats given pyrrolizidine alkaloids from *Amsinckia intermedia* Fisch and Mey and from *Heliotropium supinum*. L. Cancer Res., 30: 2127–2731, 1970. 45) Schoental, R.: Pancreatic islet-cell and other tumors in rats given heliotrine, a monoester pyrrolizidine alkaloid, and nicotinamide. Cancer Res., 35: 2020–2024, 1975. 46) Seltzer, H.S., Allen, E.W., Herron, Jr. A.L. and Brennan, M.T.: Insulin secretion in response to glycemic stimulus: Relation of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes mellitus. J. Clin. Invest., 46: 323–335, 1967. 47) Sibay, T.M. and Hayes, J.A.: Potential carcinogenic effect of streptozotocin. Lancet, 2: 912, 1969. 48) Simar, L.J., Sodoyez, J.C., Grillo, T.A.I., Nagano, T., Lefebvre, P.J. and Foa, P.P.: Biological properties of a transplantable islet-cell tumor of the golden hamster. III Electron microscopic studies. Diabetes, 17: 582–587, 1968. 49) Sodoyez, J.C., Luyckx, A.S. and Lefebvre, P.J.: Biological properties of a transplantable islet-cell tumor of the golden hamster. II Insulin content of the tumor and some metabolic characteristics of the tumor-bearing animals. Diabetes, 16: 415–417, 1967. 50) Steiner, H., Oelz, O., Zahnd, G. and Froesch, E.R.: Studies on islet cell regeneration, hyperplasia and intrainsular cellular interrelations in long lasting streptozotocin diabetes in rats. Diabetologia, 6: 558–564, 1970. 51) Swennberg, J.A., Koestner, A., Wechsler, W., Brunden, M.N. and Abe, H.: Differential oncogenic effects of methyl-nitrosourea. J. Natl. Cancer Inst., 54: 89–96, 1975. 52) Tjälve, H. and Wilander, E.: The uptake in the pancreatic islets of nicotinamide, nicotinic acid and tryptophan and their ability to prevent streptozotocin diabetes in mice. Acta Endocrinologica, 83: 357–364, 1976. 53) Tjälve, H., Wilander, E. and Johansson, E.: Distribution of labelled streptozotocin in mice: Uptake and retention in pancreatic islets. J. Endocr., 69: 455–456, 1976. 54) Uchida, S., Watanabe, S., Aizawa, T., Kato, K., Furuno, A. and Muto, T.: Induction of papillary ependymomas and insulinomas in the Syrian golden hamster by BK virus, a human papovavirus. Gann, 67: 857–865, 1976. 55) Vavra, J.J., DeBoer, C., Dietz, A., Hanka, L.J. and Sokoloski, W.T.: Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. In Antibiotics Annual., pp. 230–235. Antibiotica Inc. New York, 1959–1969. 56) Volk, B.W., Wellmann, K.F. and Brancato, P.: Fine structure of rat islet cell tumors induced by streptozotocin and nicotinamide. Diabetologia, 10: 37–44, 1963. 57) Warren, S., Carlstein, R.G., Steinke, J. and Chute, R.N.: Island -cell tumors in irradiated rats in parabiosis (29075). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 115: 910–912, 1964. 58) Wilander, E. and Tjälve, H.: Uptake of labelled N-nitrosomethylurea in the pancreatic islets. Virchows Arch. A Path. Anat. and Histol., 367: 27–33, 1975.