Streptozotocin のラット膵臓, および腎臓に 対する催腫瘍作用, ならびに担腫瘍ラットの 糖代謝特性に関する研究

神戸大学医学部第2内科

芳野 原, 鹿住 敏, 馬場 茂明

Studies on the Tumorigenic Action of Streptozotocin and on the Physiologic Responses to Glucose Loading in Tumor-Bearing Rats

Gen YOSHINO, Tsutomu KAZUMI and Shigeaki BABA

The Second Department of Internal Medicine
Kobe University School of Medicine
Kobe, Japan

Pancreatic islet cell tumors were induced in 37 of 44 male Wistar rats (84%), surviving 9 to 14 months after treatment, not only by various doses of streptozotocin alone, but also by the combined administration of streptozotocin with nicotinamide or picolinamide.

A single i.v. injection of 30, 40, 50 and 65 mg/kg body weight of streptozotocin alone produced adenomas of pancreatic islet cells in 8 out of 9 (89%), 6 out of 7 (86%), 2 out of 4 (50%) and 1 out of 2 rats (50%), respectively. The neoplasms were seen in all of the 8 rats given a single, 65 mg/kg body weight, i.v. injection of streptozotocin, preceded (15 min) by a single, 250 mg/kg body weight, i.p. injection of picolinamide. Among the 14 rats given a single, 500 mg/kg body weight, i.p. injection of nicotinamide, 15 min before a single i.v. injection of 65 mg/kg body weight of streptozotocin, 13 rats (93%) developed pancreatic islet cell adenomas.

Renal tumors were seen in only 3 rats treated with streptozotocin and nicotinamide. Each of them had islet cell tumors of the pancreas. None of the rats used in this study developed hepatic tumors.

Plasma insulin levels rose markedly following the glucose load in most of the rats with islet cell tumors, irrespective of the kind of treatment schedules, as compared to the response of the controls, whereas 4 out of 34 rats with islet cell tumors showed no insulin response to the glucose load and hyperglycemia.

The present study demonstrates that streptozotocin, even in a dose of 30 mg/kg body weight, has an exceedingly marked tumorigenic action on the rat endocrine pancreas, while it has slight effect on kidneys and little on livers. Observations on the physiologic responses

of the rats with islet cell tumors indicate that the induced tumors could be classified into two groups on the basis of their insulin responses to glucose load: 'high insulin responding tumor' and 'low insulin responding tumor'.

はじめに

StreptozotocinはStreptomyces achromogenes から単離された nitrosourea 化合物で、抗細菌作用⁽⁹⁾、抗腫瘍作用⁽⁸⁾、および催糖尿病作用を持つ⁽¹⁾⁽¹⁷⁾。この催糖尿病作用は膵B細胞を選択的に破壊することによって発揮されることが知られている。

実験動物における膵臓腫瘍、特にランゲルハンス島腫瘍の自然発生率は極めて低く、ラットにおいても1%以下であるが、最近では streptozotocin の投与により、ラットに高率に膵ラ島腫瘍が発生することが知られている⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾。また、著者らはすでに streptozotocin 単独、streptozotocin と nicotinamide あるいはその異性体である picolinamide との併用投与により、ラットに膵ラ島腫瘍を発生せしめ、その発生過程、および担腫瘍動物の病態生理を観察し、報告してきた⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁷⁾⁽¹³⁾。さらに最近では streptozotocin の投与によりラットに腎臓腫瘍が高率に発生することが確認されるにいたった⁽¹⁾⁽¹⁸⁾⁽²⁰⁾。

今回、著者らは Wistar 系ラットに種々の濃度の streptozotocin を投与し、その膵臓、腎臓、および肝臓に対する催腫瘍作用を観察し、さらに作成したラ島腫瘍を持つラットの糖代謝特性を観察した。

実験材料および方法

体重150から200 g の Wistar 系雄性ラット106匹を用い、25±1℃の恒温室で飼育し、処置後、固型飼料(オリエンタルMF)と水は自由に摂取させた。

ラットは処置方法により7群に別け、9から14カ月間観察した。すなわち streptozotocin の30、40、50および65mg/kg体重を各々11、12、10、17匹のラットに投与した。(以下、各々、S30、S40、S50、S65群と略す)また、streptozotocin 65mg/kg体重と nicotinamide 500mg/kg体重を22匹に併用投与し、streptozotocin 65mg/kg体重と picolinamide 250mg/kg体重を14匹に併用投与した。(以下各々をSNおよびSP群と略す)。さらに、10匹を未処置の正常対照群とした。

Streptozotocin (Upjohn, Kalamazoo, Michigan, Lot U9889, 11837 GGS-22B)は citrate buffer (pH4.5)に溶解し、可及的速やかに尾静脈より投与した。Nicotinamide (Nakarai, Kyoto, Lot WTE 1323) および picolinamide (Nakarai, Kyoto, Lot H00423)は各々蒸留水に溶解し、streptozotocin 投与15分前に腹腔内へ投与した。

病理組織学的検索は、処置後9カ月以上生存したラットを開腹し、膵臓、腎臓、および肝臓の一部を摘出し、Bouin液で固定した後、パラフィンに包埋し、5から6μmの切片を作成し、hematoxylin-eosin染色を施行した。肉眼的に膵腫瘍の確認できなかったラットにおいては膵組織の連続切片を作成し、微少腫瘍の有無を確認した。

代謝位相の観察は処置後約1年目に経口ブドウ糖負荷試験(以下OGTTと略す)を施行した。ラットを16時間絶食の後、pentobarbital 麻酔下にて、50%ブドウ糖溶液を用い、3g/kg体重をポリエチレンチューブにて胃内に投与した。ブドウ糖負荷前、負荷後30、60および120分に頸静脈より採血し、血糖および血中インスリン(以下IRIと略す)を測定した。血糖はAuto-Analyzer:Hoffman法により⁽¹⁰⁾、血中IRIは2抗体法により⁽¹⁶⁾、ラットinsulin (Novo Batch R 171)を標準として測定した。IRI値が測定限界以上の場合は、radioimmunoassayに用いた borate buffer (0.1M, pH8.6)にてサンプルを2部に希釈して再測定を行った。

Table 1. Incidence of pancreatic islet cell tumors in male wistar rats. Induced by streptozotocin with and without nicotinamide or picolinamide.

Treatment (mg/kg X No. of Rx)	Administration route	Number treated	Number surviving 9 months or more	Animals with tumors	
				No.	(%)
Streptozotocin, 30 X 1	iv b)	11	9	8	89
Streptozotocin, 40 X 1	iv b)	12	7	6	86
Streptozotocin, 50 X 1	iv b)	10	4	2	50
Streptozotocin, 65 X 1	iv b)	17	2	1	50
Streptozotocin, + Nicotinamide, 500 X 1 a)	ip	22	14	13	93
Streptozotocin, + Picolinamide, 250 X 1 a)	ip	14	8	8	100

a) Administered 15min. prior to streptozotocin.

b) Caudal vein used.

Fig. 1. Islet cell adenoma of the pancreas found in a rat killed 11 months after a single intravenous injection of 40 mg/kg body weight of streptozotocin. H & E, X20.

結 果

1. 腫瘍の発生と部位

Streptozotocin 単独投与の場合、ラットの生存率と streptozotocin の投与量の間には逆相関が認められた。処置後9カ月以上生存したラット数と膵ラ島腫瘍の発生率を Table 1 に示した。

S30群11匹の内、9カ月以上生存したものは9匹で、この内で7匹に肉眼的にラ島腫瘍が認められた。さらに、もう一匹のラットにおける膵連続切片の検索にて2個の微小腫瘍の存在が確認された。S30群におけるラ島腫瘍の発生率は89%で、弧立性腫瘍は5例であり、その内1例は、微小腫瘍であった。

S40群 匹中9カ月以上生存したのは7匹で、肉眼的にラ島腫瘍 (Fig. 1) の認められたのは6匹であった。さらに2個の微小腫瘍が膵連続切片の検索にて発見された。2例が弧立性腫瘍であった。

Fig. 2. Renal tumor in a rat killed 14 months after the combined treatment with streptozotocin and nicotinamide. H & E, $\times 10$.

S50およびS65群で9カ月以上生存したものは、各々4および2匹で、この内、ラ島腫瘍の確認されたのは2匹と1匹であった。前者の内の1例が孤立性腫瘍であった。

SN群22匹の内、9カ月以上生存したのは14匹で、この内、11匹に24個のラ島腫瘍が肉眼的に確認された。孤立性腫瘍は4例であった。さらに2匹に微小腫瘍が確認された。SN群におけるラ島腫瘍の発生率は93%であった。

SP群14匹の内、9カ月以上生存したのは8匹で、全例に肉眼的にラ島腫瘍が確認され、うち5例が孤立性であった。

対照とした未処置長期飼育ラット10匹の脾臓には、ラ島腫瘍は認められなかった。

以上いずれのラ島腫瘍の光顕所見もすでに発表したインスリノーマの像に類似していた。

腎臓腫瘍はSN群の3匹にのみ認められた。処置後14カ月目に2匹に肉眼的に確認され、この内1匹はtubular adenomaで(Fig. 2)、他の1例はnephroblastomaで開腹時、血性腹水を認めた。さらに処置後10カ月目に光顕的検索にて1例にtubular adenomaが発見された。

他の処置群、および未処置群には腎臓腫瘍は、まったく認められなかった。

すべてのラットの肝切片の組織学的検索では、異常所見は、認められなかった。

2. 担腫瘍ラットの糖代謝

ラ島腫瘍を持つラットのOGTTにおける糖負荷後のIRI反応は、体重および性をそろえた正常対照群に比し、過剰な反応を示すものがほとんどであった。処置別にOGTTの成績を比較すると(Fig. 3)、空腹時血糖はすべての群とも正常対照群に比し低く、糖負荷後30分のIRI値はいずれの群も正常対照群に比し高値を示し、もっとも低値を示したS30群のそれでも正常対照群に比し、有意に高値であった。

さらにS65群でラ島腫瘍を持つラット(D)のインスリン分泌は空腹時でも異常高値を示し、空腹時血糖も36mg/100mlと著明な低血糖状態を示した。しかしながらS30群およびS40群の中の各々2匹、計4匹では糖負荷に対するインスリン反応はまったく認められないものが存在した。(Fig. 4)、これらのラットの血糖曲線は正常対照群と比較しても有意に高値を示し、軽度の耐糖能の異常を示した。

Streptozotocin のラット膵臓、および腎臓に対する催腫瘍作用、
ならびに担腫瘍ラットの糖代謝特性に関する研究 (芳野, 他 2 名)

Fig. 3. Comparison of blood glucose and insulin responses during oral glucose tolerance tests in rats with insulin-secreting tumors induced by a single intravenous injection of 30 (A), 40 (B), 50 (C), and 65 mg/kg body weight (D) of streptozotocin, and by the combined treatment with streptozotocin and nicotinamide (E), or picolinamide (F). In this and subsequent figures, the numbers of animals in each group are indicated in parentheses. Vertical bars represent the standard errors of the mean. Dotted lines represent those of normal control rats of the same sex and body weight.

Fig. 4. Blood glucose and insulin responses during oral glucose tolerance tests in rats bearing islet cell tumors induced by a single intravenous injection of 30 or 40 mg/kg body weight of streptozotocin.

考 案

1. 催腫瘍作用について

wistar 系ラットにおける膵ラ島腫瘍の自然発生率は極めて低く⁽²⁾, 今回検索した未処置のラット10匹にも腫瘍は発見し得なかった。

げっ歯類において, X線照射や化学物質を用いて, ラ島腫瘍の発生率が高まることが知られている⁽⁵⁾⁽²³⁾. 特に最近では streptozotocin がラットに高率にラ島腫瘍を発生せしめることが報告されている⁽¹³⁾⁽²⁷⁾.

今回, われわれは streptozotocin と nicotinamide あるいは picolinamide の併用投与のみならず streptozotocin 単独少量投与にても高率にラ島腫瘍が発生することを確認した。

Rakieten ら⁽⁹⁾ は nicotinamide がラ島腫瘍の発生において cocarcinogen としての役割を演じていることを示唆しているが, 今回の検索では, むしろ nicotinamide は picolinamide と同様に, streptozotocin の催糖尿病作用を阻止し, streptozotocin を投与されたラットが糖尿病死に至るのを防ぎ, かつ腫瘍発生まで生存させる役割を果していることがわかった。実際 S 65 群の 9 ヶ月生存率は 2/17 (12%) ときわめて低率であった。

Streptozotocin の 30mg/kg 体重という少量投与でもラットに高率にラ島腫瘍が発生した事実は注目に値する。Streptozotocin は 2-deoxy-D-glucose と 1-methyl-1-nitrosourea からなり, methyl-¹⁴C-streptozotocin が膵ラ島に集まることが知られている⁽²⁵⁾. さらに 1-methyl-1-nitrosourea は強力な発癌物質でこれが, ラ島細胞の DNA を alkyl 化し, 催腫瘍性を発揮するものと思われる。

Rakieten ら⁽⁹⁾ は Holtzman 系雄性ラットに streptozotocin 50mg/kg 体重を単独投与, あるいは nicotinamide との併用投与を行い, ラ島腫瘍の発生率が各々 4% および 64% であったと報告しているが, 今回 Wistar 系雄性ラットでは streptozotocin 65mg/kg 体重および 50mg/kg 体重の単独投与で, とともに, 50% の発生率であった。さらに 40mg/kg 体重と 30mg/kg 体重では, 各々 86% と 89% と著明に高い発生率を示した。これらの事実より, streptozotocin がほとんど催糖尿病作用を持たない 30mg/kg 体重でも, 内分泌膵に強力な催腫瘍作用を持つことが確認された。

さらに nicotinamide, picolinamide の発癌機構ならびに臓器特異性などに対する作用に不明の点が残されており, 単に streptozotocin の催糖尿病作用の抑制のみでないことも考慮せねばならないが, 今後の研究にまちたい。

Streptozotocin が腎臓, および肝臓にも集積することが知られているが⁽¹²⁾, streptozotocin 単独, あるいは nicotinamide との併用投与で Holtzman 系ラットに腎臓腫瘍が発生することが報告されている⁽¹⁾. さらに Rakieten らは streptozotocin のこの催腫瘍作用は nicotinamide との併用投与で阻害されることを認めている⁽²¹⁾.

これらの報告とは逆に, 今回の検索では, 腎臓腫瘍は streptozotocin と nicotinamide の併用投与群にのみ認められ streptozotocin 単独投与群にはまったく認められなかった。これら相反する事実の説明としては両研究に用いられたラットの系のちがいがひとつ考えられるが, 現在, 著者らは streptozotocin の単独投与群についてさらに検索を進めている。Sibay⁽²⁴⁾ らはチャイニーズハムスターに streptozotocin を投与し, 肝臓腫瘍が 37% に発見されたと報告しているが, 今回の検索ではすべてのラットに肝臓腫瘍は発見されなかった。

2. 担腫瘍ラットの代謝と膵内分泌について:

著者らはすでに streptozotocin と nicotinamide, streptozotocin と picolinamide, streptozotocin 単独および streptozotocin の単独少量投与にて発生した腫瘍を持つ動物の病態について報告してきたが, さらに今回は各処置群の例数を増し, 各群の糖代謝特性を比較検討してみた。処置方法のいかんにかかわらず, ほとんどの担腫瘍ラットはブドウ糖負荷に対して過剰なインスリン反応を示したが, 逆にまったく無反応のラ

ットも、S30とS40群の14匹中4例見られた。ラ島腫瘍を持つラットの糖代謝特性に関してはDixitとBauerの報告がある⁽⁶⁾。彼等は経静脈性ブドウ糖負荷試験にて担腫瘍ラット15例中3例のインスリンが無反応であったと報告しているが、個々のラットにおける、インスリン反応と血糖との関係については残念ながら記載が無い。著者等の成績では、インスリンが低反応を示した4例の血糖曲線はいずれも軽度の糖尿病型を示した。Babaら⁽²⁾はすでに、これらの腫瘍を経口ブドウ糖負荷に対する、担腫瘍ラットのインスリン反応により、2群に分類している。すなわち高反応群を‘high insulin responding tumor’低反応群を‘low insulin responding tumor’としている。前者のみならず後者にも高濃度のインスリンがふくまれており本腫瘍がインスリン産生腫瘍であることは確認されている。さらに、本腫瘍中には免疫学的にインスリンのみならずグルカゴン⁽¹³⁾さらにソマトスタチンの存在も認められ⁽²⁾⁽¹⁴⁾、B細胞以外の細胞が本腫瘍中に存在し、とくにソマトスタチンによるインスリン分泌の抑制の可能性が考えられ、これらの結果、OGTTにおける血糖反応、血中へのインスリン放出能に差違があるものと考えられる。

結 論

Wistar系雄性ラットに種々の投与量のstreptozotocinの単独投与、およびnicotinamideないしpicolinamideとの併用投与を行い、streptozotocinの催腫瘍作用を観察し、以下の結論を得た。

- 1) Streptozotocinは30mg/kg体重でも膵内分泌に強力な催腫瘍作用を示した。
- 2) Streptozotocinの腎臓に対する催腫瘍作用は膵内分泌に対するそれ程、顕著ではなかった。
- 3) Streptozotocinの肝臓に対する催腫瘍作用は確認されなかった。
- 4) 膵ラ島腫瘍を持つラットはその作成方法のいかんにかかわらず、そのほとんどが経口ブドウ糖負荷に対して過剰なインスリン反応を示したが、逆にインスリン反応のまったく認められなかったラットも少数ながら存在した。

稿を終るにあたり、本研究に御協力頂いた神戸大学第2解剖学教室 溝口史郎教授 菊井悠允先生、同第2病理学教室 杉山武敏教授、宮地病院院長 宮地知男博士、赤倉一良氏、ならびに本教室 吉田泰昭、藤井繁樹両先生に深謝致します。

なお、本論文の催腫瘍作用に関する研究はCancer Researchに投稿中である。

文 献

- 1) Arison, R.N. and Feudale, E.L.; Induction of Renal Tumor by Streptozotocin in Rats. *Nature*, 214: 1254—1255, 1967.
- 2) Baba, S., Yoshino, G., Kazumi, T., Fujii, S., Morita, S., Doi, K. and Utsumi, M.: Correlation between insulin secretion and somatostatin content in pancreatic islet cell tumor induced by streptozotocin and its functional classification (in preparation).
- 3) 馬場茂明, 土井邦紘, 吉田宗儀, 金子滋夫: 実験的膵ラ島腫瘍. *Diabetes Journal*, 3: 1—11, 1975.
- 4) 馬場茂明: 実験的機能性膵ラ島腫瘍. 小坂樹徳編. *糖尿病学*1977年, 診断と治療社, 東京, 1977, p.30—42.
- 5) Boschetti, A.E. and Moloney, W.C.: Observation on pancreatic islet cell and other radiation-induced tumors in the rat. *Lab. Invest.*, 15: 565—575, 1966.
- 6) 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.
- 7) 土井邦紘, 吉田宗儀, 鹿住 敏, 芳野 原, 生野哲雄, 高嶋卓二, 吉田泰昭, 馬場茂明, 金子滋夫, 松本秀敏: ストレプトゾトシンによる実験的膵ラ島腫瘍. *医学のあゆみ*, 94: 334—335, 1975.
- 8) 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 Chemotherapy Rept.*, 48:1-6, 1965.
- 9) Herr, R.R., Jahnke, H.K. and Argoundelis, A.D.: The Structure of Streptozotocin. *J. Am. Chem. Soc.*, 69: 4804-4809, 1967. 10) Hoffman, W.S.: A Rapid Photoelectric Method for the Determination of Glucose in Blood and Urine. *J. Biol. Chem.* 120: 51-55, 1937. 11) Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W. and Renold, A.E.: Diabetogenic Action of Streptozotocin: Relationship of Dose of Metabolic Response. *J. Clin. Invest.*, 48: 2129-2140, 1969. 12) Karunanayake, E.H., Baker, J.R.J., Christian, R.A., Hearse, D.J. and Mellow, G.: Autoradiographic Study of the Distribution and Cellular Uptake of (^{14}C)-Streptozotocin in the Rat. *Diabetologia*, 12: 123-128, 1976.
- 13) Kazumi, T., Yoshino, G., Yoshida, Y., Doi, K., Yoshida, M., Kaneko, S. and Baba, S.: Biochemical Studies on Rats with Insulin-secreting Islet Cell Tumors Induced by Streptozotocin: With Special Reference to Physiologic Response to Oral Glucose Load in the Course of and Following the Tumor Induction. *Endocrinology*, (in press).
- 14) 鹿住 敏, 芳野 原, 藤井繁樹, 内海正文, 森田聡一郎, 吉田泰昭, 馬場茂明: Streptozotocin インスリンノーム中のソマトスタチン, グルカゴン及びインスリン含量. *医学のあゆみ*, 103: 691-692, 1977.
- 15) 鹿住 敏: Streptozotocin によるインスリン分泌性膵島腫瘍の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研究. *日内分泌誌印刷中*. 16) Morgan, C.R. and Lazalow, A.: Immunoassay of Insulin: Two Antibody System: Plasma Insulin Levels of Normal, Subdiabetic and Diabetic Rats. *Diabetes*, 12: 115-116, 1963. 17) Rakieta, N., Rakieta, M.L. and Nadkarni, M.V.: Studies on the Diabetogenic Action of Streptozotocin. *Cancer Chemotherapy Rept.*, 29: 91-98, 1963. 18) Rakieta, N., Gordon, B.S., Cooney, D.A., Davis R.D. and Schein, P.S.: The Renal Tumorigenic Action of Streptozotocin (NSC-85998) in Rats. *Cancer Chemotherapy Rept.*, 52: 563-567, 1968. 19) Rakieta, N., Gordon, B.S., Beaty, A., Cooney, 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. 20) Rakieta, N. and Gordon, B.S.: Metastatic Renal Adenocarcinoma Produced by Streptozotocin (NSC-85998). *Cancer Chemotherapy Rept.*, 59: 891-892, 1975. 21) Rakieta, N., Gordon, B.S., Beaty, A., Cooney, D.A. and Schein, P.S.: Modification of Renal Tumorigenic Effect of Streptozotocin by Nicotinamide: Spontaneous Reversibility of Streptozotocin Diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*: 356-361, 1976. 22) Rowlatt, V.F. and Roe, F.J.C.: Epithelial Tumors of the Rat Pancreas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 39: 17-25, 1967.
- 23) Schoental, R.: Pancreatic Islet-cell and Other Tumors in Rats Given Heliotrine, A Monoester Pyrrolizidine Alkaloid, and Nicotinamide. *Cancer Res.*, 35: 2020-2024, 1975.
- 24) Sibay, T.M. and Hayes, J.A.: Potential Carcinogenic Effect of Streptozotocin. *Lancet*, 2: 912, 1969. 25) 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. 26) 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, 1973. 27) Yoshino, G., Kazumi, T., Morita, S., Yoshida, Y., Fujii, S., Yoshida, M., Kaneko, S. Doi, K. and Baba, S.: Studies on Development of Insulin-secreting Islet Cell Tumor of Rat Pancreas Induced by Small Dose of Streptozotocin. *Acta Endocrinologica, Suppl.*, 212: 193, 1977.