

ハムスター膵癌の発癌に及ぼす合成プロテアーゼ インヒビターの影響 —膵内分泌細胞およびフリーラジカルよりの検討—

京都大学医学部外科学教室第1講座

浅野 昇, 真辺 忠夫, 吉村 玄浩, 今西 勝大, 戸部 隆吉

〔原稿受付: 平成3年8月30日〕

Effect of Synthetic Protease Inhibitor on the Oncogenesis of Pancreatic Cancer in Hamsters: Study on Pancreatic Endocrine Cells and Free Radicals

NOBORU ASANO, TADAO MANABE, TSUNEHIRO YOSHIMURA,
KATSUHIRO IMANISHI and TAKAYOSHI TOBE

First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University

In order to study the effect of synthetic trypsin inhibitor on the oncogenesis of pancreatic cancer, the histology, the kinetics of the B, A and D cells in the islets of Langerhans and activities of free radical scavengers, superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxide (GSH-Px) and malon dialdehyde (MDA) in the tumor bearing tissues were measured in hamsters with pancreatic cancer induced by di-iso-propanol nitrosamine (DIPN) with or without camostat (FOY-305). In DIPN group (DIPN alone), the tubular adenocarcinoma was found in 80%, however, in FOY group (DIPN+FOY-305), papillary adenocarcinoma was found in 91%. In both DIPN and FOY groups, the number of B cells was decreased at 8 weeks and the number of A and D cells was decreased at 16 weeks. Activities of SOD in the tumor and borderzone in DIPN group were significantly lower than those in non-tumor region and normal tissue. However, activities of SOD in the tumor and borderzone in FOY group were higher than those in DIPN group. GSH-Px and MDH levels were significantly higher in FOY group suggesting the involvement in the reaction of free radicals.

These results suggest that trypsin inhibitors have a prophylactic effect on the development of pancreatic cancer.

Key words: Hamster, Pancreatic cancer, Protease inhibitor, Islet cell, Free radical.

索引語: ハムスター、膵癌、蛋白分解酵素阻害剤、島細胞、フリーラジカル。

Correspondence: Tadao Manabe, MD, First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin-kawaracho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

はじめに

肝癌は、わが国においても肺癌、乳癌、大腸癌とともに増加傾向の著しい癌で¹³⁾、年間の死亡数は10,000人を越えている。最近の診断機器の発達により比較的小さな肝癌も発見されるようになり、また、拡大手術の導入により切除率も向上してきたが、その予後は、他の消化器癌と比べると極めて不良であり、全国肝癌登録調査においても5年生存率は、17%にすぎない。肝癌の発生要因については不明な点が少なくないが、疫学的には、とくにタバコ、動物性脂肪、膵内分泌ホルモンとの関連性が指摘されている⁴⁰⁾。

ニトロソアミンのような化学物質^{8,14,15)}、あるいは脂肪により小腸粘膜から分泌されるコレシストキニンによる膵栄養効果^{10,22,23)}が発癌の遠因になると考えられている。また、肝癌の発生過程には膵内分泌ホルモンであるインスリン、グルカゴンの関与も示唆される^{2,23,47)}。

一方、発癌機序については、フリーラジカルの関与が示唆されている⁴⁶⁾。いわゆる発癌剤は活性酸素、過酸化脂質のようなフリーラジカルを生成することによって発癌を促進するといわれている。われわれのハムスターによる実験肝癌では膵組織内においてフリーラジカル消去系である superoxide dismutase 活性、catalase 活性が癌部、癌周辺部で低下しているのがみられた³⁾。

プロテアーゼインヒビターは膵液中のプロテアーゼ活性を抑制し、膵炎の治療薬として用いられているが、合成プロテアーゼインヒビターには、フリーラジカル消去作用のあることが明らかにされており⁴⁴⁾、他方、経口的に投与された場合には上部小腸において膵液中のトリプシン活性を抑制し、ネガティブフィードバックにより、コレシストキニンを分泌することにより発癌促進因子として作用する可能性のあることが知られている⁴⁾が、その詳細については不明な点が少なくない。

本研究では肝癌に対する合成トリプシンインヒビターの作用をより明確にするために、ハムスターに di-iso-propanol nitrosamine を用いて肝癌を発生せしめ^{3,16)}、合成トリプシンインヒビター、camostat (FOY-305) を投与した時の組織学的変化、膵組織中フリーラジカルの指標としてのフリーラジカル消去系の動態、膵内分泌の指標としての B, A, D 細胞動態を観察した。

対象および方法

生後8週齢の雄性 Syrian Golden Hamster (体重 80-100 g) 360匹を用い、コントロール群、DIPN 群、FOY 群 (DIPN および camostat (FOY-305) 投与群) に分け、各群とも固形飼料 MF (オリエンタルフード) および水を自由摂取させ、一定環境下 (室温 23±2°C) にて飼育した。DIPN 群 (200匹) では di-iso-propanol nitrosamine (DIPN, 半井化学) をハムスター腰部に 500 mg/kg 体重、週1回、24週間皮下注射投与した。

FOY 群 (100匹) では camostat (FOY-305) 0.5 mg/ml を飲料水に溶かして24週間経口投与をした。コントロール群 (60匹) では、DIPN の代わりに同量の生理食塩水を注射した。実験は以下の2つの実験モデルについて行った。

組織内フリーラジカルスキャベンジャー動態

DIPN, DIPN+FOY または生理食塩水投与24週間後にハムスターを屠殺、開腹し、図1に示すように癌部、境界部、非癌部より 50~200 mg の組織を採取した。10 W/V% になるように生理食塩水を加えてホモジネートし、その上清を -40°C にて凍結保存し、SOD (superoxide dismutase), GSH-Px (glutathion peroxidase), MDA (malon dialdehyde) の測定に供した。同時に組織検索用切片を作製し、ホルマリン固定後、hematoxylin-eosin (HE) 染色を行い組織診断に供した。

SOD assay はチトクローム C 還元法によった²⁷⁾。すなわち、sample に等張生食 1% TritonX100 を加えてホモジネートし、7000 g 10分遠心し、上清 0.1 ml に 125 mM phosphate buffer 2 ml, 50 mM EDTA-2N 50 μ l, hypoxanthine 13.5 mg/50 ml, 100 μ l, 1 mM KCN 23 μ l, チトクローム C 12.4 mg/1.5 ml 50 μ l, xanthine oxidase 22 μ l/4 ml 100 μ l を加えた。その際の O₂⁻ の産生量は、チトクローム C の還元を spectrophotometer (Beckman, UV5260) による 550 nm での吸光度変化としてとらえることによって測定した。SOD 単位 (CU) は O₂⁻ 産生を 50% 阻害する量として表わした。膵組織の SOD 測定においては、O₂⁻ 産生と関係なくチトクローム C と反応してしまう可能性もあるため、Asada¹⁾ による計算式により補正を行った。

$$\text{SOD 量 } U (\text{unit}) = \frac{a - (b - c)}{a/2}$$

a = XO のみ加えて得られた Δ OD

b = XO と sample を同時に加えた Δ OD

c = sample のみを加えた Δ OD

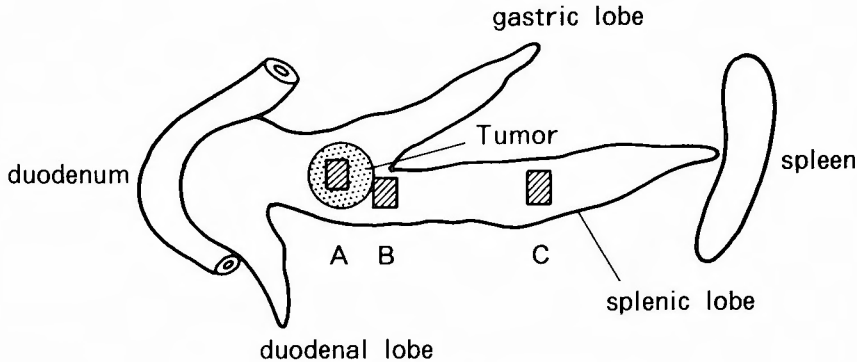


図1 ハムスター膵組織採取部位
A: 癌部, B: 境界部, C: 非癌部

GSH-Px 活性測定は NADPH の消費による吸光度変化から測定した。すなわち等張生食でホモジネートし, 15,000 g 20分間遠心後, 上清 100 μ l を取り, 試薬 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 500 μ l, 40 mM EDTA 100 μ l, 2 mM NADPH 100 μ l, 40 mM GSH 100 μ l, 40 mM Na₂S₂O₃ 100 μ l, 1,000 U/4 ml glutathion reductase 4 μ l を加え, 37°C で 5 分間 incubation し, 10 mM t-butylhydroperoxide 10 μ l を加えた時の吸光度 (340 nm) 変化から求めた。

MDA は TBA 法^{26,28)} にて測定した。

ラ氏島における B, A, D 細胞の変化

0 週 (DIPN, DIPN+FOY または生理食塩水投与前) および投与後, 4, 8, 16, 24 週後に 6 匹ずつ屠殺, 開腹し, 膵組織を採取した。膵組織を Bouin 氏液にて 2 時間固定後, 5%ホルマリンにて 2 時間固定した。膵を splenic lobe, duodenal lobe, gastric lobe⁴³⁾ を含めて主膵管に並行に切片を作成し, パラフィン固定を行い, 無染色標本および hematoxylin-eosin (HE) 染色標本を作成した。膵ラ氏島構成細胞であるインスリンを産生する B 細胞, グルカゴンを産生する A 細胞, ソマトスタチンを産生する D 細胞を免疫組織学的に酵素抗体法 (PAP 法) により 3, 3-diaminobenzidin を chromogen として染色 (DAKO PAP Kit, Dako Corporation) した。光学顕微鏡下にラ氏島内有核細胞数における各内分泌細胞数, 構成比を算定した。

有意差検定は analysis of variance (ANOVA) により行い, $P < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した。

実験結果

実験開始後 24 週まで生存し得た有効なハムスター数は DIPN 群 96 匹 (48%), FOY 群 64 匹 (64%) で, FOY 群の生存率が DIPN 群よりも高かった。

DIPN 群, FOY 群における体重あたりの膵重量の変化をみると, FOY 群では DIPN+FOY 投与後徐々に膵重量の増加がみられ, 24 週後には DIPN 群の 1.4 ± 0.2 倍, 32 週では 1.6 ± 0.3 倍に増加した (図 2)。

DIPN 群, FOY 群における腫瘍の発生状況を経時的にみると, 組織学的腫瘍は DIPN または DIPN+FOY 投与後 4 週ではみられなかったが, 8 週後には DIPN 群に一部腺腫がみられるようになった。明らかな膵管腺癌の発生は両群とも, 12 週頃からみられるようになった。24 週まで生存し得た有効実験動物には全例に発癌がみられた。このうち肉眼的な癌を認めたものは DIPN 群では 42 匹 (43%), FOY 群では 36 匹 (55%) であった。腫瘍は灰白色, 結節状を呈し, 肉眼的に計測可能な腫瘍の大きさは $16 \times 16 \times 10$ mm $\sim$ $2 \times 2 \times 2$ mm であり, DIPN 群, FOY 群で差はみられなかった。腫瘍の発生部位は duodenal lobe, gastric lobe, pyloric lobe のいずれにもみられたが, 膵頭部に多い傾向がみられた。

DIPN 群における DIPN 投与 24 週後の膵組織像は, 図 3 に示す如くで, 線維組織の増生, リンパ球の浸潤をはじめとする間質反応が非常に強く, 一部基底膜が消失し, 核異型性を伴う高円柱上皮ならなる高分化型管状腺癌が主体を占めた。

FOY 群における DIPN+FOY 投与 24 週後の膵組織像は図 4 に示すように DIPN 群に較べて間質反応に

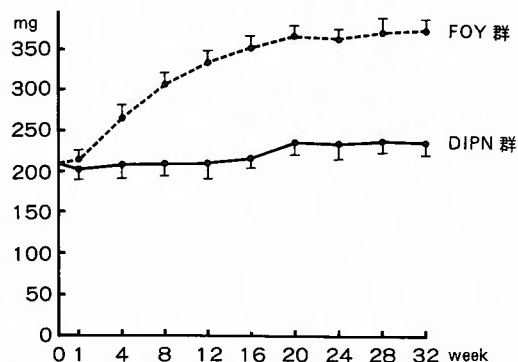


図2 DIPN 群, FOY 群における脾重量の経時的変化. mean±SEM

乏しく, 全体に乳頭状増生を伴う乳頭腺癌が主であった。

膀胱癌の組織型を DIPN 群と FOY についてみると, DIPN 群では管状腺癌が80% (77/96), 乳頭腺癌が20% (19/96), FOY 群では管状腺癌が9% (6/64), 乳頭腺癌が91% (58/64) で, DIPN 群では管状腺癌が, FOY 群では乳頭腺癌が有意に多かった (表1)。

組織内フリースカベンジャー動態

DIPN 群, FOY 群における24週後の脾組織内 SOD 活性をみると, 癌部については DIPN 群 6.0 ± 0.6

U/mg protein (mean±SEM) FOY 群 7.5 ± 0.2 U/mg protein, 境界部では DIPN 群 5.6 ± 0.7 U/mg protein, FOY 群 7.9 ± 0.5 U/mg protein, 非癌部では DIPN 群 11.6 ± 1.5 U/mg protein, FOY 群 9.9 ± 2.1 U/mg protein, 正常対照群では 10.6 ± 0.7 U/mg protein であった。FOY 群においては癌部と境界部の SOD 活性が DIPN 群に比べ有意に高かった (図5)。

GSH-Px 活性は癌部においては DIPN 群 0.05 ± 0.01 U/mg protein, FOY 群 0.048 ± 0.002 U/mg protein, 境界部では DIPN 群 0.037 ± 0.007 U/mg protein, FOY 群 0.053 ± 0.003 U/mg protein, 非癌部では DIPN 群 0.025 ± 0.002 U/mg protein, FOY 群 0.043 ± 0.003 U/mg protein, 対照群では 0.017 ± 0.002 U/mg protein で, FOY 群においては, 境界部非癌部の GSH-Px 活性が, DIPN 群に比べ有意に高かった (図6)。

MDA 活性は DIPN 群では癌部で, 11.3 ± 5.3 nmol/g protein, 境界部で 6.0 ± 2.0 nmol/g protein, 非癌部で 4.3 ± 2.4 nmol/g protein, 対照群は 4.1 ± 1.7 nmol/g protein であったが, FOY 群では癌部で 11.5 ± 2.5 nmol/g protein, 境界部で 20.6 ± 2.9 nmol/g protein, 非癌部で 9.6 ± 2.0 nmol/g protein を示し, DIPN 群と比べ, 境界部で有意に高値を示した (図7)。

ラ氏島における B, A, D 細胞の変化

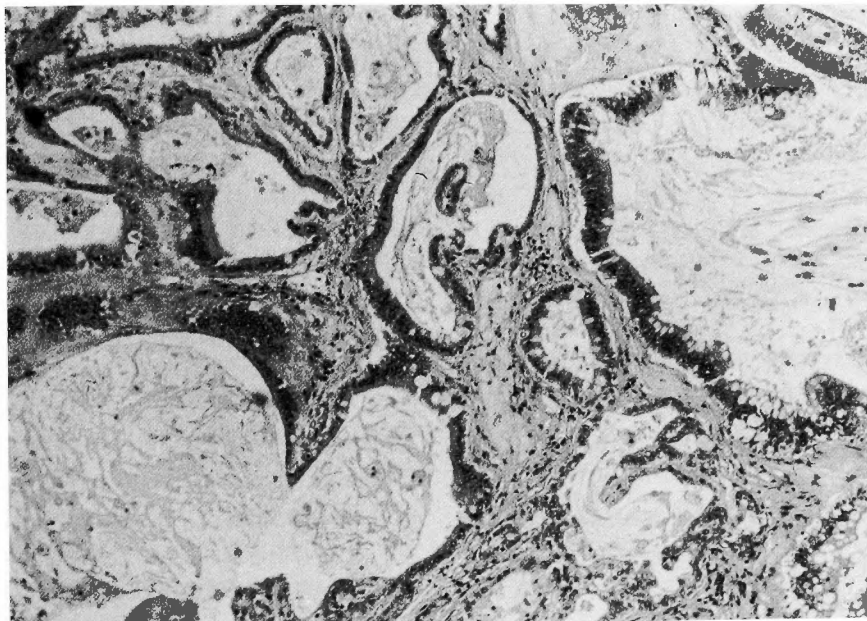


図3 DIPN 群における膀胱組織像 HE 染色 ×150

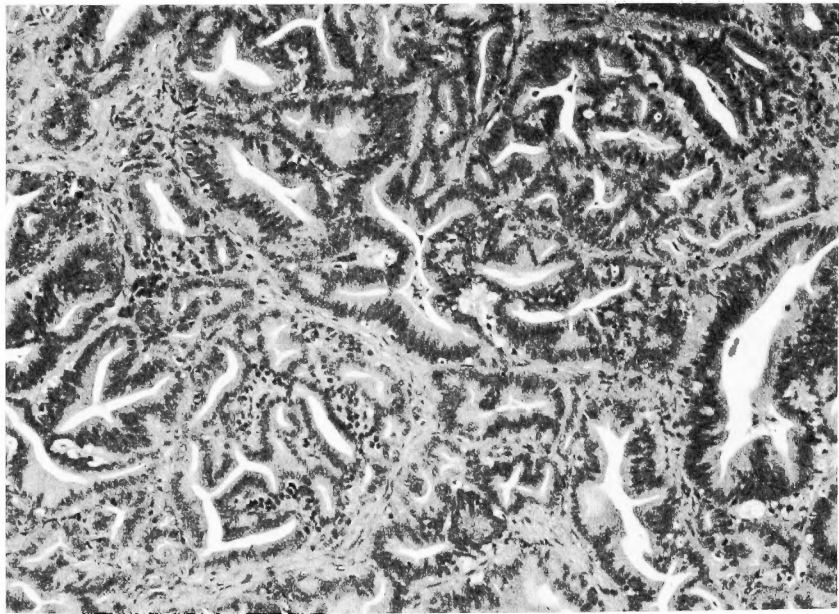


図 4 FOY 群における膵組織像 HE 染色 ×150

インスリン産生細胞である B 細胞数は前値 159 ± 30 (mean $\pm$ SEM) 個/ラ氏島であったが DIPN 群, FOY 群とも DIPN 投与後減少傾向を示し, 8 週後には前値の約半数に有意に減少し, 時間の経過とともに一層の減少を示した.

グルカゴン産生細胞である A 細胞数は前値 21.6 ± 3.3 個/ラ氏島であったが, DIPN 群, FOY 群ともに16週後より有意な減少がみられた.

ソマトスタチン産生細胞である D 細胞数は前値 16.8 ± 2.6 個/ラ氏島であったが, A 細胞と同様, DIPN 群, FOY 群ともに, 16週以後に有意に減少した (表 2).

ラ氏島における有核細胞数に対する B, A, D 細胞構

成比の経時的変化をみると, B 細胞は前値 $86.3 \pm 3.1\%$ であるのに対し, DIPN 群では16週後 $75.7 \pm 3.5\%$ に低下したが, FOY 群では16週後 $86.0 \pm 4.0\%$, 24週後 $85.4 \pm 3.2\%$ で前値との間に有意差はみられず, 16, 24週とも DIPN 群よりは有意に高値を示した. A 細胞は前値 $23.4 \pm 1.7\%$ であったが, DIPN 群では16週以後, 有意な低下がみられ, 24週後には $12.3 \pm 2.2\%$ を示した. FOY 群においても16週後, 低下を示したが, その程度は DIPN 群よりも著明であり, 24週後は $1.0 \pm 0.05\%$ を示し, DIPN 群よりも有意に低値を示した. D 細胞は前値 $18.0 \pm 2.2\%$ であるのに対し, 24週後, DIPN 群は $5.7 \pm 1.2\%$, FOY 群は $9.2 \pm 2.0\%$ へと低下したが, この時期の FOY 群の値は DIPN 群より有意に高かった (図 8).

表 1 DIPN 群, FOY 群における組織型

	tubular adenocarcinoma	papillary adenocarcinoma
DIPN 群	80 % (77/96)	20 % (19/96)
FOY 群	9 % (6/64)	91 % (58/64)

考 察

ニトロソ化合物によるハムスター膵癌は, ヒトの膵管癌に極めて類似した実験モデルとして Pour ら^{30,31,33,34,35)} によって, 広く研究されてきた. ハムスターに膵癌を惹起すると考えられるニトロソ化合物には, 本実験で用いた DIPN の他に N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine (BHP)^{18,20)}, N-nitroso-bis (2-oxopropyl) amine (BOP)³⁶⁾, N-nitroso (2-hydroxypropyl)-(2

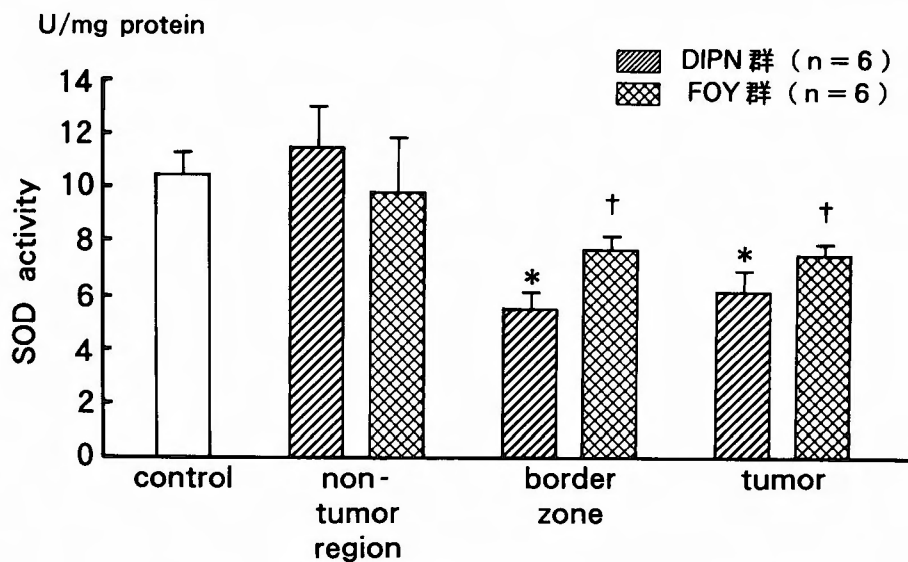


図5 DIPN 群, FOY 群における膀胱組織内 SOD 活性

* $p < 0.05$ vs control 群

† $p < 0.05$ vs DIPN 群

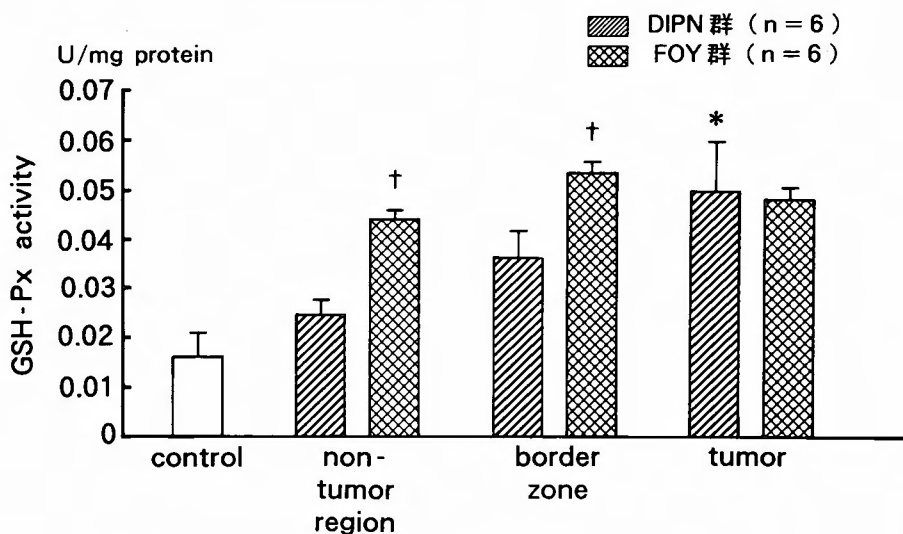


図6 DIPN 群, FOY 群における膀胱組織内 GSH-Px 活性

* $p < 0.05$ vs control 群

† $p < 0.05$ vs DIPN 群

oxopropyl) amine (HPOP)^{25,37)}, N-nitroso-methyl (2-oxopropyl) amine (MOP)²¹⁾ などが報告されており、いずれの化合物も発癌効果には多少の差異がみられるものの、発癌機序は互にはほぼ類似している。このようなニトロソ化合物はそれ自体に carcinogen としての作用

はなく, carcinogen となるにはチトクローム P-450-dependent monooxygenase system あるいは他の酵素系などの mixed function oxidase (MFO) が必要とされているが、膀胱の腺房細胞、導管細胞には豊富にこのような MFO が分布しているため、ニトロソ化合物はここ

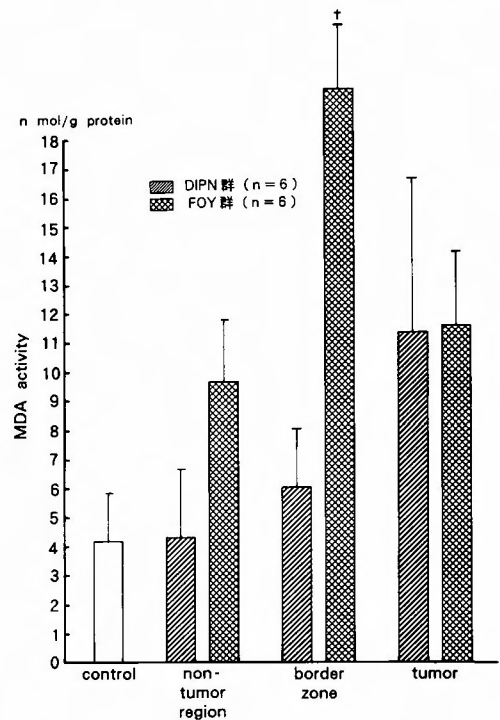


図7 DIPN 群, FOY 群における膵組織内 MDA 活性
+ p<0.05 vs DIPN 群

で, MFO enzyme により metabolize され mutagen を持つ carcinogenic form に変換されるものと思われる。Lavitt ら²¹⁾ は ³H-TdR を用いたオートラジオグラフィを用い N-nitroso 2-6 dimethyl morpholine を label し, その分布をみているが, acinar cell の labeling が多いことから acinar cell が metabolic activator の principal site であると述べている。いずれにせよ活性化された carcinogen が target cell である導管上皮に作用するものと考えられる。

発癌物質の膵組織への到達路については, 胆管および膵管結紮による発癌実験で腫瘍の発生に偏在性がなく, 全体に及ぶことから発癌物質は胆汁への排泄を介するのではなく血中を介して作用すると考えられる³⁹⁾。

我々の DIPN によるハムスター膵癌モデルでは DIPN 投与後 8 週後より腺腫が現れ始め, 12 週頃より膵管腺癌が発生するようになり, 24 週まで生存し得たハムスターの全例に組織学的に明らかな膵管腺癌の発生がみられた。組織学的には腫瘍のすべてが管状腺癌ないしは乳頭腺癌で腺房細胞癌は 1 例もみられなかった。

プロテアーゼインヒビターは以前よりラットに経口投与すると, 膵の肥大と膵外分泌の亢進を起すことが知られており, その機序としては CCK を介する膵外分泌が腸管内のトリプシンによって抑制されるネガティブフィードバック機構がプロテアーゼインヒビター

表2 DIPN 群, FOY 群における B, A, D 細胞数の経時的変化

	Group	Time after DIPN or DIPN + FOY administration				
		0	4	8	16	24
B cell	CONTROL	159 ± 30	160 ± 35	155 ± 31	158 ± 21	161 ± 32
	DIPN	—	130 ± 36	78 ± 9*	56 ± 6*	49 ± 10**
	FOY	—	131 ± 25	77 ± 9*	54 ± 7*	45 ± 10**
A cell	CONTROL	21.6 ± 3.3	20.5 ± 3.0	19.3 ± 2.8	18.3 ± 3.2	18.0 ± 2.9
	DIPN	—	17.7 ± 1.6	19.9 ± 1.4	7.0 ± 1.6*	2.8 ± 0.9**
	FOY	—	19.5 ± 1.7	19.3 ± 1.2	8.0 ± 1.7*	4.5 ± 0.4**
D cell	CONTROL	16.8 ± 2.6	17.1 ± 2.2	16.9 ± 2.0	16.5 ± 1.5	15.6 ± 2.1
	DIPN	—	13.8 ± 1.3	13.7 ± 1.4	9.1 ± 1.9*	1.3 ± 0.4**
	FOY	—	16.8 ± 2.5	15.0 ± 3.0	11.2 ± 2.4*	2.6 ± 0.5**

*P<0.05, **P<0.01 vs. control

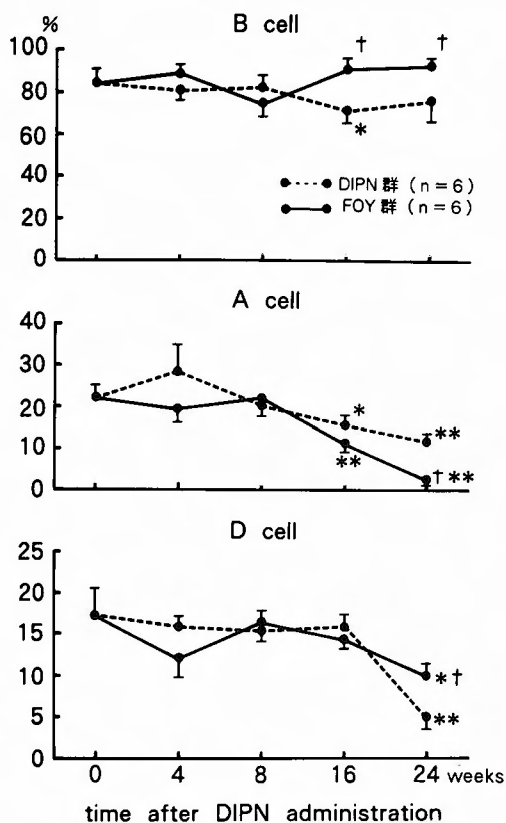


図8 DIPN 群, FOY 群におけるラ氏島の有核細胞数に対する B, A, D 細胞構成比の経時的変化

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$ vs 前値 (time 0)

† $p < 0.05$ vs DIPN 群, mean $\pm$ SEM

によって遮断されることにあるとされている。この機構が遮断されると、CCK の過分泌が起り、この CCK が膵に栄養効果を及ぼすとされている¹²⁾。実験膵癌との関係では BHP や azaserine による膵腫瘍の発生が大豆のトリプシンインヒビターを含んだ食事により促進されると報告されている²⁴⁾。

本研究においては合成プロテアーゼインヒビター (camostat, FOY-305) を DIPN 投与開始時期に一致して経口投与した。FOY 投与群において膵重量は有意に増加するものの、投与24週後の組織学的な腫瘍の発生率には DIPN 単独投与群との間に差はなかったが、肉眼的な腫瘍の発生率では FOY 群55%, DIPN 群43%と FOY 群が高かった。特徴的なことは組織型であり、DIPN 群は24週の時点で腫瘍における管状腺癌の比率が乳頭腺癌より明らかに多いのに対し、

FOY 群では逆に乳頭腺癌の比率が管状腺癌より有意に高かったことであった。本研究においてはハムスターを24週の時点ですべて屠殺しており、その予後に関しては不明であるが、一般的に管状腺癌は乳頭腺癌より悪性度は高いとされており、FOY 群で乳頭腺癌が多いという結果は、合成プロテアーゼインヒビターには膵癌の病態の進行を抑制する可能性のあることを示唆している。

本研究ではこのような合成プロテアーゼインヒビターのハムスター膵癌に及ぼす影響を膵内分泌ホルモンおよびフリーラジカルに注目し検討した。膵癌の発生過程に膵内分泌ホルモンが関与することは古くから知られており、インスリンはそれ自体であるい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の作用のあることをから発癌促進作用があるとされている⁴⁾。糖尿病と発癌の関係からみると、実験的に遺伝的糖尿病を有する Chinese hamster と非糖尿病の EP hamster に BOP を皮下投与すると遺伝的糖尿病群には腫瘍の発育はなく、非糖尿病群の EP hamster にのみ膵管腺癌を認めるとされている⁶⁾。Bell ら⁷⁾ は B-cell toxin である streptozotocin (STZ) を発癌剤である N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP) 投与前にハムスターに腹腔内投与することによって発癌を抑制できたとしている。Pour らのグループは^{9, 32, 38)} BOP 同様の B-ketonitro-amine の代謝産物である N-nitroso (2-hydroxypropyl) (2-oxopropyl) amine (HPOP) に STZ を投与し、同様の結果を得ている。Pour ら^{9, 32, 38)} は BOP のようなニトロ化合物による発癌機序に膵ラ氏島が重要な役割を演じているとしている。すなわち、HPOP の cyclic form は STZ と糖質成分の構造上に相似点がみられるため islet cell によく取り込まれるが、その際、islet cell 内において N-nitrosomethyl (2-oxopropyl) amine (MOP) に代謝され、この MOP が postinsular capillary を介して膵細胞に刺激を与えるとしている。

このようにラ氏島は発癌剤の代謝面において膵腺房細胞の発癌に深くかかわっているが、解剖学的には insuloacinar axis にみられるように血流の多くは膵ラ氏島を介するものが多く、組織学的に膵細胞をみると、正常膵ではラ氏島周囲の腺房細胞は insulin による栄養効果により halo effect として認知されている。このようにインスリンは膵腺房細胞に対して trophic effect を持つといわれている。すなわち insulin は腺房細胞と結合したのち internalize され、腺房細胞内で蛋白合

成を刺激する^{11,17,40,41)}。ニトロソ化合物が作用すると、膵ホルモンの栄養効果と相まって、とくに periinsular acinar cell において発癌が起こりやすくなると考えられる。我々の実験における B 細胞は、発癌に先だつ initiation の時期に一致して有意に減少しており、この減少は一つには発癌剤による B 細胞の障害が考えられるが、それによって発癌過程における insulin の internalization の可能性が示唆される。このことは発癌の過程においては A, D 細胞の減少が B 細胞より明らかに遅れてみられることから示唆される²⁾。

DIPN に FOY を投与し、経時的にラ氏島内の B, A, D 細胞動態を観察してみると、細胞数については B 細胞は DIPN 単独投与群と同様に8週後に明らかに低下し、以後その程度が著明となったが、FOY 群と DIPN 群の間に明らかな差はみられなかった。この傾向は A 細胞、D 細胞についても同様であり、FOY 群の細胞数は16週以後前値に比し、有意に低下したが、DIPN 群との間に差はみられなかった。しかしながらラ氏島内の有核細胞数に対する B 細胞の構成比は FOY 群では16週以後 DIPN 群より有意に高く、A 細胞では24週後 FOY 群で有意に低く、また D 細胞では24週後 FOY 群で有意に高かった。このように FOY の投与により膵重量の増加がみられるにもかかわらず、膵ホルモン産生細胞数が減少することは DIPN のようなニトロソ化合物が膵ラ氏島に対しては、かなりの障害を与えているためと考えられる。その際、有核細胞中の B 細胞の構成比が A, D 細胞に対し、高いのは FOY の膵栄養効果の1つの表われとも考えられるが、このことに関しては今後の研究に待たれる。

一方、プロテアーゼインヒビター、とりわけ合成プロテアーゼインヒビターには強力なフリーラジカル消去作用のあることが知られているが、発癌機構においてもフリーラジカルは重要な役割を演じている。そこで本研究では合成プロテアーゼインヒビターのハムスター膵癌に及ぼす影響を、フリーラジカル面から検討するために担癌組織における SOD, GSH-Px および MDA 活性を測定した。

活性酸素の O_2^- のスカベンジャーについては1969年に McCord と Fridovich²⁷⁾ が初めて O_2^- を不均化反応で、特異的に消費せしめる O_2^- の scavenger である SOD を発見し、以来 O_2^- と SOD に関する基礎的な研究が多くみられ、炎症、癌、老化などフリーラジカルと病態との関連が指摘されている。

活性酸素の発癌性を検討する際に、発癌物質投与に

より生じた活性酸素は核の DNA に到達する前に、細胞膜の脂質や細胞質の GSH-Px, catalase, SOD などによって大部分が不活性化されるが、発癌の過程においては、このようなスカベンジャーの低下が示唆される。本実験では SOD とともに GSH-Px, MDA を測定した。DIPN 群では SOD 活性は癌部、境界部で、非癌部あるいは正常組織に比べ有意に低値を示した。SOD 活性の癌組織における低下について Leuthauer ら¹⁹⁾ はミトコンドリアの Mn-SOD 低下によるとしている。Peskin ら²⁵⁾ は各種癌細胞において Mn-SOD (ミトコンドリア) Zn-SOD (細胞質) の両方を測定しているが、両 SOD とも癌では低下していると報告している。一方、GSH-Px は種および臓器特異性、特に肝、腎で高値を示す以外はさまざまなパターンをとるといわれているが¹⁵⁾、今回の結果では DIPN 群では癌部、境界部、非癌部で正常組織より高値を示した。MDA 活性も癌部、境界部で高値を示した。このことはペルオキシゾームに局在する catalase が低値で³⁾ H_2O_2 が増加するために腫瘍組織における脂質過酸化が増加し、その結果過酸化脂質を GSH を介して処理する GSH-Px が増加し、antioxidant effect として作用するのではないかと考えられる。また MDA は過酸化脂質の代謝産物として上昇していると思われる。

FOY 群においては、SOD 活性が癌部、境界部に於いて上昇した。Shinkai ら⁴²⁾ は rat の ascites hepatoma cell を methothelial cell monolayer を培養した系において hypoxanthin xanthinoxidase で superoxide radical (O_2^-) を産生させた群と、その系に SOD と catalase を同時に添加させた場合を比較した結果、SOD+catalase 添加群では methothelial cell monolayer の penetration を抑制することを見だしている。このことから FOY 群の癌部、境界部における SOD 活性の上昇は膵癌に対しては癌組織の進展および周辺組織への浸潤を抑制する要因になる可能性を示唆していると思われる。

FOY 群における GSH-Px 活性、MDA 活性はとくに境界部、非癌部において DIPN 群よりも高値を示したが、このことは過酸化脂質に対する antioxidant effect がより著明に現われていることを示していると思われる。

合成 protease inhibitor とりわけメシル酸ナフモスタットやメシル酸ガベキサートなどのように分子量の小さい合成トリプシンインヒビターはいずれも好中球を用いたザイモザン刺激下 O_2^- , H_2O_2 , OH 産生を抑制あるいは消去することが知られている⁴⁴⁾。

今回の実験結果より FOY 投与群においてハムスター膵癌の組織型に、管状腺癌と比べ予後の良好な乳頭腺癌が多くみられたことの機序の一つに FOY によるフリーラジカルスカベンジャーとしての作用が関与している可能性が示唆された。

ま と め

膵癌に対する合成プロテアーゼインヒビターの影響をみる目的で、Di-iso-propanol nitrosamine (DIPN) 誘発ハムスター実験膵癌に同時に、camostat (FOY-305) を経口投与し、組織学的検索とともに膵ラ氏島の B, A, D 細胞の変化および担癌組織におけるフリーラジカルの動態を superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxide (GSH-Px), malon dialdehyde (MDA) を指標として観察した。

その結果、DIPN 投与を行った DIPN 群および DIPN+FOY-305 を投与した FOY 群では24週まで生存し得たハムスターの全例に発癌が認められたが、組織型では DIPN 群では管状腺癌が80%を、FOY 群では乳頭腺癌が91%を占め、FOY 群より DIPN 群の癌の悪性度が高いと思われた。ラ氏島の B 細胞数は DIPN 群、FOY 群ともに8週より減少し、A, D 細胞数はともに16週より減少し、FOY 群による明らかな変化はみられなかった。DIPN 群における24週後の SOD 活性は癌部、境界部において有意に低下し、膵癌の進展機序にフリーラジカル消去系の低下がみられたが、FOY 群では癌部、境界部の SOD 活性が、DIPN 群より高値を示し、GSH-Px, MDA 活性は反応性に上昇した。FOY によるフリーラジカル消去作用を介する膵癌の進展抑制の可能性が示唆された。

文 献

- Asada K, Takahashi M, Nagata M: Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agr. Biol. Chem.* 38: 471-473, 1974.
- Asano N, Manabe T, Imanishi K, Tobe T: Changes of A, B and D cells in Langerhans islets in pancreatic cancers of hamsters. *Arch. Jpn. Chir.* 60: 233-242, 1991.
- Asano N, Manabe T, Yoshimura T, et al: Role of free radical scavengers in pancreatic carcinomas of hamsters. *Arch. Jpn. Chir.* 1991 (in press)
- Baba N, Aki T, Tsai Y, et al: Trophic effect of a synthetic trypsin inhibitor after truncal vagotomy or sympathectomy on the remnant pancreas after major pancreatectomy in rats. *Biomedical Res.* 10 (Suppl 1): 103-109, 1989.
- Bauer G, Wendel A: The activity of the peroxide-metabolizing system in human colon carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 97: 267-273, 1980.
- Bell RH, Pour PM: Pancreatic carcinogenicity of N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine in diabetic and nondiabetic Chinese hamster. *Cancer Lett.* 34: 221-230, 1987.
- Bell RH Jr, Strayer DS: Streptozotocin prevent development of nitrosoamine-induced pancreatic cancer in the Syrian hamster. *J. Surg. Oncol.* 24: 258-262, 1983.
- Dante G, Scarpell M, Sambasiva R, et al: Activation of nitrosoamine to mutagens by post mitochondrial fraction of hamster pancreas. *Cancer Res.* 40: 67-74, 1980.
- Gingell R, Brunk G, Nagel D, et al: Metabolism and mutagenicity of nitroso-2-methoxy-2,6 dimethylmorpholine in hamsters. *J. Nat. Cancer Inst.* 64: 157-161, 1980.
- Göke B, Printz H, Koop I, et al: Endogenous CCK release and pancreatic growth in rats after feeding a protease inhibitor (camostate). *Pancreas* 1: 509-515, 1986.
- Goldfine ID, Kriz BM, Wong KY, et al: Insulin action in pancreatic acini from streptozotocin-treated rats. III. Electron microscope autoradiography of 125 insulin. *Am. J. Physiol.* 240: G69-75, 1981.
- Green GM, Lyman RL: Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140: 6-12, 1972.
- Hirayama T: Diet and cancer. *Nutr. Cancer* 1: 67-81, 1979.
- Hoffman D, Brunnemann KD, Adams JD, et al: N-nitrosamines in tobacco carcinogenesis. In: Magee PN, ed. Nitrosamines and human cancer: Banbury report, No. 12. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 211-220, 1982.
- Hoffman D, Hecht S, Ornat RM, et al: N-nitrosornicotine in tobacco. *Science* 186: 265-267, 1974.
- Kajikawa M: Studies of DIPN induced pancreatic carcinoma with emphasis on pancreatography. *Jpn. J. Gastroenterol.* 75: 1386-1398, 1978 (in Japanese).
- Kore M, Iwamoto Y, Sankaran H, et al: Insulin action in pancreatic acini from streptozotocin-treated rats. I. Stimulation of protein synthesis. *Am. J. Physiol.* 240: G56-62, 1981.
- Krüger FW, Pour P, Althoff J: Induction of pancreas tumors by di-iso-propanolnitrosamine. *Naturwissenschaften.* 61: 328-329, 1974.
- Leuthauer SWC, Oberley LW: Superoxide dismutase activity in distant organs of tumor bearing mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 72: 1065-1074, 1984.
- Levison DA, Morgan RGH, Brimacombe JS, et al: Carcinogenic effects of di (2-hydroxypropyl)

- nitrosamine (DHPN) in male Wistar rats: Promotion of pancreatic cancer by a raw soya flour diet. *Scand. J. Gastroenterol.* 14: 217-224, 1979.
- 21) Levitt MH, Curtis H, Squire R, et al: Experimental pancreatic carcinogenesis. I. Morphogenesis of pancreatic adenocarcinoma in the Syrian golden hamster induced by N-nitroso-bis (2-hydroxypropyl) amine. *Am. J. Pathol.* 88: 5-28, 1977.
 - 22) Liddle RA, Goldfine ID, Williams JA: Bioassay of plasma cholecystokinin in rats: Effects of food, trypsin inhibitor, and alcohol. *Gastroenterology* 27: 542-549, 1984.
 - 23) Logsdon CD: Stimulation of pancreatic acinar cell growth by CCK, epidermal growth factor, and insulin *in vitro*. *Am. J. Physiol.* 251: G487-494, 1986.
 - 24) Longnecker DS, Morgan RG: Diet and cancer of the pancreas: Epidemiological and experimental evidence. In: *Diet, nutrition and cancer: A critical evaluation*, edited by Reddy BS. CRC, New York. 74: 219-222, 1985.
 - 25) Longnecker DS, Roebuck BD, Kuhlmann ET, Currence TJ: Induction of pancreatic carcinomas in rats with N-nitroso (2-hydroxypropyl) (2-oxopropyl) amine: Histopathology. *J. Natl. Cancer Inst.* 74: 209-217, 1985.
 - 26) Masugi F, Nakamura T: Measurement by thiobarbital acid value in liver homogenate solubilized with sodium dodecyl-sulphate and variation of the values affected by vitamin E and drugs. *Vitamines* 51: 21-29, 1977.
 - 27) McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055, 1969.
 - 28) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid. *Anal. Biochem.* 95: 351-358, 1979.
 - 29) Peskin AV, Koen YM, Zbarsky IB: Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumours. *FEBS Letters* 78: 41-45, 1977.
 - 30) Pour P, Althoff J, Gingell R, et al: N-nitrosobis (2-acetoxypentyl) amine as a further pancreatic carcinogen in Syrian golden hamsters. *Cancer Res.* 36: 2877-2884, 1976.
 - 31) Pour P, Althoff J, Krüger FW, et al: A potent pancreatic carcinogen in Syrian hamsters: N-nitrosobis (2-oxopentyl) amine. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 1449-1453, 1977.
 - 32) Pour P, Gingell R, Langenbach R, et al: Carcinogenicity of N-nitrosomethyl (2-oxopentyl) amine in Syrian hamsters. *Cancer Res.* 40: 3585-3590, 1980.
 - 33) Pour P, Krüger FW, Althoff J, et al: Cancer of the pancreas induced in the Syrian golden hamster. *Am. J. Pathol.* 76: 349-358, 1974.
 - 34) Pour P, Krüger FW, Althoff J, et al: A new approach for induction of pancreatic neoplasms in laboratory animals. *Cancer Res.* 35: 2259-2266, 1975.
 - 35) Pour P, Mohr U, Cardesa A, et al: Pancreatic neoplasms in an animal model: Morphological, biological and comparative studies. *Cancer* 35: 379-389, 1975.
 - 36) Pour PM, Runge RG, Birt D, et al: Current knowledge of pancreatic carcinogenesis in the hamster and its relevance to the human disease. *Cancer* 47: 1573-1587, 1981.
 - 37) Pour P, Wallcave L, Gingell R, et al: Carcinogenic effect of N-nitroso (2-hydroxypropyl) (2-oxopentyl) amine, a postulated proximate pancreatic carcinogen in Syrian hamsters. *Cancer Res.* 39: 3828-3833, 1979.
 - 38) Pour PM, Wallcave L, Nagel D: The effect of N-nitroso-2-methoxy-2,6-dimethylmorpholine on endocrine and exocrine pancreas in Syrian hamsters. *Cancer Lett.* 13: 233-240, 1981.
 - 39) Rückert K, Pracht B, Klöppel G: Difference in experimental pancreatic carcinogenesis induced by oral or subcutaneous administration of 2, 2'-dihydroxydi-N-propylnitrosamine in duct ligated hamsters. *Cancer Res.* 41: 4715-4719, 1981.
 - 40) Sankaran H, Iwamoto Y, Korc M, et al: Insulin action in pancreatic acini from streptozotocin-treated rats. II. Binding of ¹²⁵I-insulin to receptors. *Am. J. Physiol.* 240: G63-68, 1981.
 - 41) Schapiro H, Faulconer RJ, Lind JF, et al: The effect of insulin on the exocrine pancreas: a review. *Mt. Sinai. J. Med.* 48: 95-110, 1981.
 - 42) Shinkai K, Mukai M, Akedo H: Superoxide radical potentiates invasive capacity of rat ascites hepatoma cells *in vitro*. *Cancer Lett.* 32: 7-13, 1986.
 - 43) Takahashi M, Pour P, Althoff J, et al: The pancreas in Syrian golden hamsters 1-anatomical study. *Lab. Animals Sci.* 27: 336-342, 1977.
 - 44) Tamura K, Manabe T, Nonaka A, et al: Effect of protease inhibitors on production of active oxygen species in human polymorphonuclear leucocytes. In: *Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals*, ed, Hayaishi O, Niki E, Kondo M, Yoshikawa T, Elsevier Science Publishers, B.V. p 845-848, 1989, Amsterdam.
 - 45) Tisdale MJ, Mahmoud MB: Activities of free radical metabolizing enzymes in tumours. *Br. J. Cancer* 47: 809-812, 1983.
 - 46) Troll W, Witz G, Goldstein B, et al: The role of free radicals in tumor promotion and carcinogenesis. In: *Hecker E, Fusenig NW, Kunz W et al. ed. Carcinogenesis Vol. 7. Cocarcinogenesis and biological effects of tumor promoters*, Raven Press, New York, pp. 593-597, 1982.
 - 47) Wynder EL: An epidemiological evaluation of the causes of cancer of the pancreas. *Cancer Res.* 35: 2228-2233, 1975.