

岡山医学会雑誌

才89巻11, 12合併号 (才996, 997号)

昭和52年12月30日発行

MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)

誘発ラット胃癌の発癌初期胃粘膜の増殖動態について

—— ラジオオートグラムによる検討 ——

岡山大学医学部第一外科教室 (主任: 田中早苗教授)

寺 田 紘 一

(昭和52年5月24日受稿)

目 次

第1章 緒 言

第2章 実験材料および実験方法

第1節 実験材料

第1項 実験動物

第2項 発癌物質

第2節 実験方法

第1項 発癌物質投与方法

第2項 観察期間

第3項 組織標本作製法およびラジオオートグラム作製法

第3章 実験結果

第1節 実験動物群におけるラット腺胃幽門腺領域の形態学的変化

第1項 対 照 群

第2項 実験群 (MNNG 投与群)

1) 発育形式による分類

2) 組織学的分類

3) 諸病巣の発生頻度および MNNG 投与日数

4) 諸病巣のラジオオートグラムによる組織学的検索

4-1, regenerative glandular hyperplasia

4-2, adenomatous glandular hyperplasia

4-3, adenocarcinoma

4-4, dark cell と red cell について

第4章 考 按

第5章 結 語

第1章 緒 言

1967年杉村らは N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) をラットに経口投与し、腺胃

に高率にヒト胃癌に組織学的に類似した癌腫を発生させることができることを報告した。これは胃癌の実験モデルとして有意義に広く用いられるようになったが、その組織発生に関してはいまだ明らかでない点も多く、組織発生についての研究はすくないようである。

本研究は、MNNG 投与後30週前後の癌腫発生の高頻度な時期を中心にして、胃粘膜の組織学的な変化と ^3H -thymidine を用いてラジオオートグラムを作製して胃粘膜の腫瘍性増殖動態を観察して胃癌の組織発生について検討した。

第2章 実験材料および実験方法

第1節 実験材料

第1項 実験動物

生後6週令の Wistar 系雄性ラット34匹を使用し、対照群にも同系雄性ラット10匹を用いた（藤井医化学試験動物取扱所）。

第2項 発癌物質

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (Aldrich Chemical Co. 製) (以下 MNNG と略す) を用いた。

第2節 実験方法

第1項 発癌物質の投与方法

MNNG を濃度83 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の水溶液とし、これに tween 60 を0.4%の割合に加えて飲料水とし、アルミ箔で遮光した給水びんに入れて、240日間自由に飲ませた。この MNNG 水溶液は2日ごとに調整した。241日以降は水道水のみを飲ませた。対照群には水道水のみを与えた。飼料は CE-2 固型飼料（日本クレア社製）を用いた。

第2項 観察期間

MNNG 投与後、191日から378日までの期間に経

表1 MNNG 投与日数と実験動物数

-Days of Administration of MNNG									
185	210	240	270	300	330	360	390		
3(3)	6(6)	6(6)	6(4)	3(0)	7(5)	3(3)		total	34(27)
-No. of Animals () Served for Radioautogram									

時的に34匹のラットを屠殺した（表1）。このうち27匹をラジオオートグラムの検索に供した。対照群は1ヶ月目から6ヶ月までは各月に、それ以降は2ヶ月毎に計10匹を屠殺し検索した。

第3項 組織標本作製法およびラジオオートグラム作製法

ネンブタール麻酔下に2.0 $\mu\text{Ci}/\text{g}$ の ^3H -thymidine を経静脈的に投与し、1時間後に断頭屠殺した。全胃を胃の縦軸に沿う5mm巾の step section としたのちパラフィン包埋を行なった。各ブロックをすべて厚さ5 μ の完全連続切片とし、薄切薄片は交互に Hematoxyline-Eosin 重染色 (H. E. と略す)、Alcianblue 染色, Periodic Acid Schiff 反応, (PAS と略す) およびラジオオートグラムの順序で連続的に染色し検鏡した。なお ^3H -thymidine 投与後1時間以内に死亡した7匹のラットは病巣の組織学的検索のみに供した。

ラジオオートグラムは、dipping 法により作製した。すなわち薄切薄片のパラフィンを充分に除去したのち、45℃の感光乳剤 (SAKURA NR-M₂) に浸漬し、温度28℃、湿度80%の孵卵器内で約60分乾燥させ、30日間5℃の暗室で露光し、Konidol (Konishiroku Photo. IND. Co. Ltd.) で20℃4分間現像したのち H. E. 染色を施した。

同様な操作を対照群にも行なった。

第3章 実験結果

第1節 実験動物群におけるラット腺胃幽門腺窩の形態学的変化

第1項 対照群

対照群は生後1ヶ月より14ヶ月まで経時的に観察したが、びらん、潰瘍、胃炎あるいは腫瘍は認めていない。正常幽門腺窩の構成細胞は、被蓋上皮細胞、腺窩上皮細胞、腺頸部細胞および幽門固有腺細胞であり、その形態と粘液の特徴は表2のごとく観察された。すなわち、被蓋上皮細胞と腺窩上皮細胞の胞体は好酸性で、細胞遊離縁直下に多量の粘液顆粒の貯溜が認められ、粘液は PAS 強陽性であった。腺頸部細胞の胞体は好塩基性で核胞体比は高く、PAS と Alcian blue 染色中等度陽性の微細な粘液顆粒を極く少量有するのが特徴であった。 ^3H -thymidine ラジオオートグラフィーでは、附図1に示すように腺頸部細胞が標識される像が認められ、標識帯は細い帯状に認められた (neck cell layer)。

第2項 実験群 (MNNG 投与群)

MNNG 投与191日から378日までの間に経時的に総計34匹のラットを屠殺し、腺胃に94病巣を認めた。これら94病巣はすべて腺胃幽門腺領域に存在した。これらの病巣について、1) 発育形式による分類、2) 組織学的分類を行なった。

1) 発育形式による分類

表2 正常幽門腺腺窩の構成細胞

	略 図	形態学的特徴	PAS	Alcian blue	³ H-Tdr
被蓋上皮細胞		細胞は円柱状 核は棍棒状で基底側に位置し、核小体は不明瞭であるものが多い。胞体は好酸性である。	(+)	(±) { (-)	(-)
腺窩上皮細胞		細胞は立方状ないし扁平状 核は扁平状で基底側に位置し、核小体は明らかでない。胞体は好酸性である	(+)	(±) { (-)	(-)
腺頸部細胞		細胞は円柱状 核は長紡錘形で、核小体が1~2ヶみられる。胞体は好塩基性である。	(+)	(+)	(+)
幽門固有腺細胞		細胞は類円形。 核は基底側に位置し扁平状、胞体は淡明である。	(-) { (±)	(+)	(-)

病巣の肉眼的性状を基本にし、さらにその組織学的所見を参考にして発育形式を下記のように3型に分類した。

1 Surface type : 軽度なびらんまたは胃炎性変化を認める場合もあるが、肉眼的には病巣を認めなく、組織学的にのみ判定された病巣である。

2 Upward type : 肉眼的に胃内腔に向かう隆起性の病巣であるが、組織学的には一部に胃壁深層に発育するものもある。

3 Downward type : 肉眼的には陥凹性病変を認めるものであるが、小さな病巣では肉眼的に病巣を認めることは困難であるので、主として組織学的所見で判定した。なお upward と downward の両方向に発育をしめす病巣では、優勢像を示す所見をとった。

2) 組織学的分類

これら病巣の腺性増生の程度、増生腺管の異型性の程度および間質の態度により次の3型に分類した。

1 Regenerative glandular hyperplasia : 軽度の細胞異型と構造異型をもつ腺管の増生した病巣で、表層は再生上皮に被われていた。この病巣は癒痕組織の有無によりさらに2つに分類された。癒痕の無いものでは腺管構造は保たれており、腺頸部細胞類似細胞の増生と腺窩上皮細胞の過形成をみるもので細胞および構造の異型性はよい。癒痕組織をもつものでは、癒痕部に出現する腺管に構造異型が認められ表層はびらんあるいは再生上皮で被われるものが多くみられた。

2 Adenomatous glandular hyperplasia : 比較的強い細胞異型や構造異型をもつ腺管の増殖であ

る。腺窩上皮の増生を認めることもあった。

3 Adenocarcinoma : 腺管の細胞異型や構造異型の強いものである。リンパ節や他臓器への転移は認めなかったが、リンパ管侵襲を認めた病巣もあった。

3) 諸病巣の発生頻度および MNNG 投与日数

MNNG 投与群の94病巣を前項で述べた発育形式で見ると、surface type 18病巣、upward type 19病巣、downward type 57病巣であり、downward type の発生頻度が高い。また組織学的分類では、regenerative glandular hyperplasia 34病巣、adenomatous glandular hyperplasia 44病巣、adenocarcinoma 16病巣であり、adenomatous glandular hyperplasia の発生頻度が高く、とりわけ adenomatous glandular hyperplasia の downward type は41病巣(43.6%)と高頻度であった(表3)。

つぎに病巣の発生時期と MNNG 投与期間との関係について検討した。発育形式で見ると、surface type、upward type および downward type は、MNNG 投与後191日より378日の観察期間中に、いずれもほぼ均等な発生分布が認められた。また組織学的分類でも、同様にほぼ均等な発生分布が認められた(表4)。

MNNG 投与平均日数を発育形式で検討すると、surface type 300.1日、upward type 292.5日、downward type 304.1日であり、これら3型の病巣には有意の差を認めなかった。このことを組織型で見ると、regenerative glandular hyperplasia 295.5日、adenomatous glandular hyperplasia 283.5日、adenocarcinoma 307.5日であり、これら3型の病巣にはとくに有意の差は認めなかった。しかし adenoc-

表3 腫瘍の組織型と発育形式(頻度)

Growth pattern \ Glandular hyperplasia	Regenerative	Adenomatous	Adenocarcinoma		Total
			Type A	Type B	
Upward	10	3	6	—	19
Surface	16	—	2	—	18
Downward	8	41	6	2	57
Total	34	44	14	2	94

表4 MNNG 投与日数と腫瘍の組織型と発育形式

Glandular hyperplasia	Growth pattern	Depth	Days of Administration of MNNG								
Regenerative			180	210	240	270	300	330	360	390	
	Upward	m			***	**	**			***	(10)
	Surface	m			***	**	**		**	*****	(16)
	Downward	m			**	**	**			**	(8)
Adenomatous	Upward	m			*	*	*				(3)
		sm									
		pm									
	Downward	m									
		sm			*****	****	***	*****		*****	(41)
		pm									
Adenocarcinoma	Upward	m									
		sm			*	*		**			(4)
		pm				**					(2)
		ss									
	Surface	m	*						*		(2)
		m									
		sm	*		*						(2)
		pm				*	*		*		(3)
		ss		*							(1)
Downward	s				*			*		(2)	
				(2)	(21)	(13)	(15)	(8)	(4)	(31)	(94)

表5 腫瘍の組織型と発育形式別実験日数(平均日数)

Growth pattern \ Glandular hyperplasia	Regenerative	Adenomatous	Adenocarcinoma		Total
			Type A	Type B	
Upward	288.3	256.3	341	—	295.2
Surface	314.6	—	285.5	—	300.1
Downward	284.9	310.7	283.1	337.5	304.1
Total	295.5	283.5	303.2	337.5	303.7

arcinoma を腫瘍の浸潤が漿膜に達しないもの (type A) と漿膜に達するもの (type B) に分けてみると、前者は303.2日で後者は337.5日となり、type B がやや長期である傾向が認められた (表5)。

4) 諸病巣のラジオオートグラムによる組織学的検索

MNNG 投与により幽門腺領域に発生した94病巣をラジオオートグラムの所見を中心にして組織学的に検討した。

1. Regenerative glandular hyperplasia

この病巣は、軽度の細胞および構造異型を示す好塩基性の胞体を有する異型細胞と好酸性の胞体を有する異型細胞腺管の増生と腺窩上皮細胞の過形成が軽度に認められた (附図3)。ラジオオートグラムでは、好塩基性の胞体を有する異型細胞が標識された。すなわち標識細胞は、病巣部で腺窩部および腺底部の両方向に巾をまして病巣周辺のneck cell layer にゆるやかな移行をしめしていた。一方、瘢痕のあるものでは、病巣の表層は再生上皮に被われており、好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管は瘢痕部の下方に位置していた。瘢痕部では間質の線維化と中等度の炎症細胞浸潤がみられ、細胞浸潤は主としてリンパ球と多核白血球からなるが好酸球も混在しており一部ではその間質に硝子化を伴っていた。この瘢痕部には好酸性の胞体を有する異型細胞腺管の増生が認められた。ラジオオートグラムでは、標識細胞は好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管に認められた。すなわち病巣部では瘢痕部下方と瘢痕部の好酸性の胞体を有する異型細胞腺管の一部に標識細胞がみられるため標識帯の上下へのひろがり認められ、ラジオオートグラムによる標識細胞の分布が、病巣の発育方向のupward かdownwardかを明確に示していた。

1-1 Surface type : 瘢痕の有無によってさらに2つに分類した。瘢痕のない病巣では、表層は再生上皮に被われ、腺底部には好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管の増生が認められた。病巣周辺部の標識細胞は腺窩部より腺底部の両方向に巾をましてゆるやかにneck cell layer に移行していた (附図2)。

1-2 Upward type

瘢痕の有無により2つに分類した。瘢痕のない病巣では、好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管が胃内腔にむけて増生しており、その表層は再生上皮で被われていた。ラジオオートグラムでは、標識細胞

は好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管に認められ、病巣部では腺窩および腺底部の両方向に巾をまして病巣周辺のneck cell layer にゆるやかな移行を示していた (附図4)。一方、瘢痕のあるものでは、組織学的所見は前項のsurface typeの瘢痕のあるものとはほぼ同様であるが、やや胃内腔への発育傾向の強いものであった。すなわち病巣の表層は再生上皮に被われており、好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管は瘢痕部の下方に位置し、瘢痕部では好酸性の胞体を有する異型細胞腺管が認められた。ラジオオートグラムでは、標識細胞は好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管に認められた。すなわち病巣部では瘢痕下方に標識細胞がみられたが、瘢痕部の好酸性の胞体を有する異型細胞腺管にもわずかに標識細胞がみられたため標識帯のひろがり認められた。病巣周辺部の標識細胞は腺窩部から腺底部の両方向に巾をまして、ゆるやかにneck cell layer に移行する所見が認められた。

この病巣は、組織学的には粘膜層に局限していたが標識細胞は胃内腔に向かう増生傾向を示していた。

1-3 Downward type : この病巣も瘢痕の有無により2つに分類した。瘢痕のない病巣では、その表層は再生上皮で被われており、好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管は、粘膜底部で粘膜筋板を圧排するように認められた。ラジオオートグラムでは、標識細胞は好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管に認められ、病巣部では粘膜筋板側に巾をまして病巣周辺部との移行が認められた (附図5)。また瘢痕のあるもの (1病巣にしか認めなかったが) では、粘膜表層は比較的分化した再生上皮で被われていたが、その直下に瘢痕があり、その中央部には好酸性の胞体を有する異型細胞腺管が認められ、これより粘膜筋板側には好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管が粘膜筋板を圧排するように増生していた。ラジオオートグラムでは、標識細胞は好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管に認められた。すなわち、病巣部では、標識細胞は粘膜筋板側の腺底部に認められたが、瘢痕部下方の好酸性の胞体を有する異型細胞腺管にも少数認められたので、標識帯は上下にひろがっていた。病巣周辺部でも標識細胞は腺窩部より腺底部に巾をまし、neck cell layer にゆるやかに移行していた (附図6)。

この病巣も組織学的には粘膜層内に局限していたが、標識細胞は粘膜筋板を下方に圧排するように存在していた。

上述した regenerative glandular hyperplasia の標識細胞の変化は、附図24に示した。

2. Adenomatous glandular hyperplasia

細胞異型と構造異型を示す好塩基性の胞体を有する異型細胞と好酸性の胞体を有する異型細胞腺管の増殖が認められ、胃内腔に向かうものを upward type 胃壁深層に向かうものを downward type として検索した。

2-1 Upward type

隆起の中心部では、腺管の増殖は好塩基性の胞体を有する異型細胞により構成されており、それらの腺管は樹枝状分岐を示していた。その周辺部では好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管の軽度の増殖と腺窩上皮細胞の過形成が認められ、表層は再生上皮細胞に被われていた。同時に粘膜筋板の挙上を伴っていた(附図7)。この病巣では、好塩基性の胞体を有する異型細胞と腺窩上皮細胞の移行部に好酸性の胞体を有する異型細胞よりなる腺管が認められた(附図20)。ラジオオートグラムでは、標識細胞は好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管に一致して認められ、病巣部では粘膜表層まで巾をひろげており(附図8)、病巣周辺部へゆるやかに移行をしめしていた。

2-2 Downward type

小さな病巣では好塩基性の胞体を有する異型細胞腺管で構成される数個の腺管が粘膜筋板をつらぬき、連続的に粘膜下層に増殖する特徴的所見が認められた(附図9)。やや大きな病巣になると、この病巣は粘膜下層で嚢胞状に拡張した腺管が認められた。この嚢胞壁を構成する細胞は強い扁平状であるが、一部には好塩基性の胞体を有する異型細胞が散見された。さらに大きな病巣になると、嚢胞壁に腺窩上皮細胞や被蓋上皮細胞が乳頭状に増殖し、これらの増殖の基部には好塩基性の胞体を有する異型細胞を認めた(附図10)。さらに大きな病巣では、ほぼ正常な胃粘膜の増生が粘膜筋板を介して上下に対称性に認められた(附図11)。ラジオオートグラムでは、好塩基性の胞体を有する異型細胞に標識細胞が認められた。すなわち、粘膜下層に増殖する腺管(附図9)、粘膜下層に嚢胞状に拡張した嚢胞壁腔細胞の一部、嚢胞壁腔に乳頭状に腺窩上皮細胞の増殖が認められる部分ではその基部に標識細胞が認められた。また粘膜筋板下に発育し、しかも正常な胃粘膜構造をもつものでは、腺底部に標識細胞を認めた(附図11)。これら downward type では、小さな病巣でも大き

な病巣でも、病巣周辺部では標識細胞は腺窩部より腺底部にかけて巾をまして病巣部に移行していた(附図9, 11)。

上述した adenomatous glandular hyperplasia の標識細胞の変化は附図25に示した。

2-3 Adenocarcinoma

強い細胞異型と構造異型をしめす好塩基性の胞体を有する異型細胞と好酸性の胞体を有する異型細胞よりなる腺管の増殖が認められ、胃内腔に向かうものを upward type、胃壁深層に向かうものを downward type とし粘膜内に限局するものを surface type に分類した。

3-1 Surface type

病巣深部では、好塩基性の胞体を有する異型細胞よりなる腺管が粘膜筋板を圧排するように増殖しており、病巣中心部では、好塩基性の胞体を有する異型細胞よりなる腺管、好酸性の胞体を有する異型細胞よりなる腺管あるいはこの両者が混在する異型細胞腺管の増殖より構成されていた。ラジオオートグラムでは、標識細胞は好塩基性の胞体を有する異型細胞に認められたが、好酸性の胞体を有する異型細胞にも両者の移行部で標識細胞が認められることもあり、病巣部では標識細胞はびまん性であった。病巣周辺部では標識細胞は腺窩部より腺底部に巾をまし neck cell layer にゆるやかな移行をしめした(附図12)。

3-2 Upward type

病巣中心部では、やはり増殖している腺管の構成細胞は、好塩基性の胞体を有する異型細胞、好酸性の胞体を有する異型細胞あるいは両者の混在よりなっていた。著明な間質の増生がみられ、粘膜筋板の挙上を伴い、病巣の表面はびらんまたは再生上皮に被われていた。ラジオオートグラムでは、標識細胞は好塩基性の胞体を有する異型細胞に認められたが、好酸性の胞体を有する異型細胞も両者の移行部で標識細胞の認められる所見もあり、病巣部では標識細胞はびまん性に増殖する所見が認められた。病巣周辺部で標識細胞は腺窩部より腺底部に巾をまし neck cell layer にゆるやかに移行していた(附図13)。

3-3 Downward type

病巣中心部では、前項と同様に、増殖している腺管は、好塩基性の胞体を有する異型細胞、好酸性の胞体を有する異型細胞あるいはその両者の混在により構成されていた。ラジオオートグラムでは、組織学的に腫瘍増殖の深達度が粘膜下層にとどまる病巣

では、標識細胞は病巣周辺の粘膜層では腺窩部より腺底部に巾をまし、病巣中心部では標識細胞はびまん性であった(附図14)。腫瘍増殖の深達度が固有筋層より漿膜におよぶものでは、潰瘍形成が著明であり周辺粘膜層との関係は検索し得なかった(附図15)が、病巣部では、標識細胞はびまん性であった。

上述した Adenocarcinoma の標識細胞の変化は附図26に示した。

3-4 Dark cell と Red cell について。

上述した好塩基性の胞体を有する異型細胞と好酸性の胞体を有する異型細胞よりなる腺管について詳述してみたい。MNNG 投与により生じた病巣には、正常幽門腺腺窩に存在しない細胞で、標識細胞の多い細胞と極めて少ない細胞が認められた。前者は正常幽門腺腺窩の腺頸部細胞と形態的に類似性が認められる。これらの細胞は胞体为好塩基性であるので dark cell と仮称し、後者は未熟な再生上皮細胞に類似し、胞体为好酸性であるので red cell と仮称する。この両者の細胞は、形態学的に異型性のとばしいものより異型性に富むものまで種々であるが、正常幽門腺領域や他の部の消化管上皮細胞とは形態学的にことなり容易に区別できた。これら標識細胞の多少により区別された dark cell と red cell の形態的特徴について前項でのべた各病巣に分けて詳述する。

まず regenerative glandular hyperplasia の病巣に認めた好塩基性の胞体を有する異型細胞は dark cell にあたる。胞体は円柱状で、核は大型で類円形ないし楕円形でクロマチンに富み、基底側に扁在し、核小体は正常の腺頸部細胞のそれよりやや大型で1個有するものが多い(附図16)。また癒痕部に認められた好酸性の胞体を有する異型細胞は red cell にあたる。胞体は低円柱状ないし扁平で、核はやや大型で類円形より類楕円形で淡明化しており、基底側に扁在し、核小体を1個有するものが多い(附図17)。この病巣の dark cell の異型性は軽度で、正常幽門腺腺窩の腺頸部細胞にきわめて類似性が求められ、また red cell は未熟な再生上皮細胞に類似していた。つぎに adenomatous glandular hyperplasia に認めた好塩基性の胞体を有する異型細胞は dark cell に相当する。胞体は円柱状のものが多く核胞体比がたかく好塩基性が増強している点の特徴である。核は大型で類楕円形ないし棍棒状でクロマチンに富み、多くは基底側に扁在する(附図18)。また red cell は dark cell と腺窩上皮細胞

ないし再生上皮細胞の中間に dark cell と移行を示しながら認められ、dark cell よりも胞体は大型で円柱状もしくは扁平状のものが多く好酸性であるのが特徴である。核も大型であるが核胞体比は低く淡明化しており、基底側に扁在し、通常1個の核小体が認められる(附図19)。粘液顆粒の量や染色性も変化に富み、ときに杯細胞様のものも認められた(附図20)が、一般には腺窩上皮細胞のそれに類似性が認められた。

adenocarcinoma に認められた好塩基性の胞体を有する異型細胞は dark cell に相当する。dark cell の胞体は高円柱状ないし低円柱状を示すものが多く、胞体の好塩基性はさらに増強し、核は大型で類円形ないし楕円形不整形で、核胞体比はたかく、核小体は通常1個であるがときに数個を有するものもある。核の位置は一定せず基底側に扁在するものはむしろ少ない(附図21)。また、好酸性の胞体を有する異型細胞は red cell にあたり、胞体は高円柱状から扁平なものまで多様であるが好酸性であるのが特徴である。核は大型で不整楕円形ないし棍棒状で淡明化しており、基底側に扁在するものが多く、核小体が通常1個認められる。dark cell にくらべると核分裂像はすくない。両者の形態は異型性に富み多彩であるが、上述した胞体および核の染色性と核胞体比の相違より形態学的にも鑑別された。ラジオオートグラムでは、 ^3H -thymidine のとりこみは dark cell にみられ、red cell は dark cell と red cell の移行部の red cell にとりこみがまれに認められた(附図22)。

第4章 考 按

発癌剤を用いて実験的に腺胃に癌腫を発生させる試みは、Nitrosamide²⁾、2,7-F. A. A. (N, N'-2, 7-Fluorenylenebisacetamide)³⁾ などの方法が行なわれてきた。本邦において2,7-F. A. A., 4-NQO (4-nitrosoquinoline)⁵⁾、4-HAQO (4-hydroxyaminoquinoline)⁷⁾ MNNG¹⁾ X線照射⁸⁾、2,7-F. A. A. にX線照射を併用する方法⁹⁾などが行なわれてきた。とりわけ杉村らの MNNG を用いる方法は、実験方法が簡便でしかも腺胃に高率に癌腫を発生できる方法なので本実験に用いて研究を行った。

MNNG 投与後の胃粘膜の経時的变化については、杉村ら¹¹⁾によると、投与後3日目から浅い欠損が多発し、ついで10週頃からびらん辺縁に腺性増生が旺盛となり(regenerative glandular hyperplasia)

20週頃からびらんの周辺において、構造異型はあるが細胞異型のとばしい腺管が、粘膜下層に増生する腺性増生 (downward adenomatous hyperplasia) と、胃内腔に隆起する腺性増生 (upward adenomatous hyperplasia) がみられ、約30週をすぎると adenocarcinoma が発生し、その頻度は31.2%であると記載している。本実験では、34匹のラットを MNNG 投与後191日より378日の間に経時的に屠殺し、94病巣を認めた。このうち癌腫と判定したものは16病巣で発癌率は16/34匹 (47.1%)、16/94病巣 (17.6%) であった。また癌腫と判定した16病巣の組織型はすべて分化型で、杉村ら^{11,10)}の報告と同じくすべて幽門腺領域に発生していた。

しかし、本実験の MNNG 投与後191日より378日の観察では、regenerative glandular hyperplasia, adenomatous glandular hyperplasia および adenocarcinoma の発生分布はほぼ均等に認められた。このことは、全胃の完全連続切片による検索のために病巣の発現頻度が高度となり、杉村ら¹¹⁾の報告とやや異なるが regenerative glandular hyperplasia, adenomatous glandular hyperplasia として adenocarcinoma の発生という MNNG 投与後の胃粘膜病巣の経時変化は、MNNG 投与後期の腺胃においても繰り返して発生しているものとして理解された。

実験胃癌の組織学的診断基準は報告者によりことなりいまだ明確でない¹¹⁾ 現在まで組織学的にも明確な癌腫と判定できる実験胃癌モデルの確立が困難であったので、漿膜侵襲のあるものを癌腫とする Stewart ら³⁾ の診断基準が応用されてきたが、この基準は微小癌腫病巣の検索には不適当である。最近の研究では、上皮性の悪性腫瘍であるため、深達度にとらわれずに細胞および構造異型の強いものを動物実験においても組織学的に癌腫と判定する報告が多くみられる¹²⁻¹⁶⁾ 本実験においても、組織学的に細胞および構造異型の強いものを癌腫と判定したが、Stewart らの診断基準を尊重して漿膜への侵襲のあるものを type B とし、同程度の異型性を有しながら病巣が漿膜に達していないものを type A と分類した。しかしラジオオートグラムによる検討では、type A も type B と同様に標識細胞はその病巣内における異型腺管内では、局在性をもつことなくびまん性に分布しており、type A も type B と同じ性格の病巣と考えられた。

正常ラット幽門腺腺窩の構成細胞は、実験結果の

項に記載したように、被蓋上皮細胞、腺窩上皮細胞、腺頸部細胞および幽門個有腺細胞であり、ラジオオートグラムでは、腺頸部細胞に³H-thymidine は標識され、その標識帯は細い帯状に認められる (neck cell layer)。このことは腺頸部細胞は多分化能をもつ増殖細胞であり、腺窩上皮細胞より被蓋上皮細胞への上方へのエスカレーター運動と幽門個有腺への下方のエスカレーター運動も同時に行なわれていることを示しており、しかもこれらの成熟細胞への増殖と分化および成熟細胞の脱落は規則正しく保たれている¹⁷⁾ ことを示している。

neck cell layer の変化について、小池¹⁸⁾ は MNNG 誘発ラット胃癌のラジオオートグラムの検索で、初期異型増殖巣の周辺に近づくにしたがって neck cell layer は粘膜層の上下に拡大し、しかも標識細胞数も著明に増加することを報告している。しかし小池のいう初期異型増殖巣とは、本稿の adenomatous glandular hyperplasia の downward type に一致するものと推察され、諸病巣の組織学的な分類による検討は明らかではないように思われる。本実験においても adenomatous glandular hyperplasia において同様な結果が得られたが adenocarcinoma と判定した病巣部周辺の粘膜層内でも neck cell layer は上下に巾を拡大する所見が認められた (附図25, 26)。これらの所見は、MNNG 投与による幽門腺領域の諸病巣の発生には、増殖細胞の成熟細胞への分化の抑制あるいは異分化という機序が関与していることを示唆するものと考えられた。

つぎに正常腺管腺窩における腺頸部細胞から腺窩上皮細胞と被蓋上皮細胞への増殖と分化の規律性を検討してみる。regenerative glandular hyperplasia では、正常腺管の増殖と分化の規律性は保たれていた。adenomatous glandular hyperplasia の upward type では、標識細胞は隆起粘膜の起部に局在しており、胃内腔への腺窩上皮細胞への発育をうかがわせしたが、downward type では、腺管は粘膜下層に向かって増殖し、粘膜下層で嚢胞状に拡張した嚢胞壁腔より腺窩上皮細胞の乳頭状増殖が認められた。このことは、正常幽門腺腺窩の腺頸部細胞の増殖と分化のエスカレーター運動が逆転したものと考えられる。しかし adenomatous glandular hyperplasia では、腺頸部細胞より腺窩上皮細胞と被蓋上皮細胞への増殖と分化の方向づけは保たれているものと考えられた。しかし、adenocarcinoma においては、upward type でも downward type でも、このような規律性

はまったく認められなかった。

つぎに、上述した3型の病巣を構成する細胞でしかも正常幽門腺管に存在しない細胞は、顕微鏡所見および³H-thymidineの取りこみの多寡によりdark cellとred cellに分類できた。しかもこの両者は病巣部ではたがいに移行を示しながら出現していた。これら2種の細胞の形態学的類似性は、regenerative glandular hyperplasiaでは、dark cellは腺頸部細胞、red cellは未熟な再生上皮に求められた。またadenomatous glandular hyperplasiaのdark cellは腺頸部細胞より細胞異型は強いが構造異型はあまりつよくなく、red cellは再生上皮細胞に近い形態を示すものから腺窩上皮細胞に類似する形態を示すものまで認められた。しかし、adenocarcinomaを構成するdark cellとred cellは、細胞および構造異型が強く腫瘍細胞と考えられた。dark cellは、長与⁹⁾の核胞体比の高く胞体の好塩基性で核小体の明瞭な骰子状細胞に類似するものと考えられた。これらの事実より、腺胃幽門腺粘膜はMNNG投与によってびらんと再生が繰り返され、腺頸部細胞の分化機序に乱れが生じ、細胞分化の過程において、dark cellとred cellという異常細胞への分化を示し、これら2種の細胞により構成される諸病巣が出現するものと考ええる。

発癌の母地を粘膜の萎縮性変化にもとめる研究⁹⁾¹⁴⁾もあるが、この場合には病巣の局在は体部腺領域に多く⁹⁾また未分化癌の発生¹⁴⁾もみられたものであるが、本実験でえられた病巣はすべて幽門腺領域に発生し、また未分化癌はみとめられなかった。また、発癌の母地を慢性潰瘍⁹⁾¹³⁾にもとめた研究もあるが、本実験では粘膜下層におよぶ潰瘍性病変が生じたことを示す病巣はみとめられなかった。

MNNGによる発癌の機構については明らかではないが、杉村ら¹⁰⁾¹⁸⁾はMNNGのメチル基の炭素を¹⁴Cで標識したM³-NGとグアニン基を¹⁴Cで標識したG³-NGを合成して腺窩のDNAヒストンへのとりこみをみた結果、G³-NGはニトロアミジノ化をおこすので発癌を分化の異常で説明できるとのべている。そしてこれらの¹⁴Cのラジオオートグラムでは、MNNGは腺頸部と腺窩部によく標識されている。このことは、MNNGの長期の投与により、幽門腺組織あるいは細胞は反復して障害され、そのturn overのくりかえしがひきかねとなり、腺頸部細胞にdark cellとred cellへのabnormal proliferationがおこり、これら2種の強い異型性を示す

細胞よりなる腺管でadenocarcinomaは構成されている。すなわち、adenocarcinomaを構成するdark cellは腺頸部細胞に近い異分化のものと考えられ、red cellは腺窩上皮細胞に近い異分化のものと推察され、これら分化のことなる細胞によりadenocarcinomaは構成されている。

第5章 結 語

1. 34匹のラットをMNNG投与後191日より378日の間に経時的に屠殺し94病巣を認めた。これらの病巣はすべて腺胃幽門腺領域に発生していた。

2. 94病巣を発育形式でみると、surface type 18病巣、upward type 19病巣およびdownward type 57病巣であった。また組織学的分類では、regenerative glandular hyperplasia 34病巣、adenomatous glandular hyperplasia 44病巣でadenocarcinomaは16病巣(17.6%)みられ、そのうち2病巣は漿膜に浸潤していた。

3. MNNGの平均投与日数は、regenerative glandular hyperplasiaでは295.5日、adenomatous glandular hyperplasiaでは283.5日でadenocarcinomaでは307.5日であった。

4. ラジオオートグラムの検索では、標識細胞の分布は各病巣の周辺部より病巣部にわたり粘膜層で上下にひろがる所見が認められた。

5. 腺頸部細胞から腺窩上皮細胞と被蓋上皮細胞への正常腺管腺窩の増殖と分化の規則性は、regenerative glandular hyperplasiaとadenomatous glandular hyperplasiaにおいては保たれていたが、adenocarcinomaでは喪失していた。

6. adenocarcinomaは、強い細胞および構造異型を示す好塩基性の胞体を有する異型細胞(dark cell)と好酸性の胞体を有する異型細胞(red cell)の2種類の細胞よりなる腺管で構成されていた。これら2種類の異型細胞は、MNNG投与により多分化能を有する腺頸部細胞が繰り返し障害され、その再生がひきかねとなり、その分化の過程にatypical proliferationがおこり生じたものと推察された。

稿を終るに臨み御指導、御校閲を賜った恩師田中早苗教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導下さった岡島邦雄助教授ならびに藤井康宏講師に深謝いたします。

文 献

- 1) Takashi Sugimura and Shinji Fujimura: Tumor production in glandular stomach of rat by N-Methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature*, **216**: 943-944, 1967.
- 2) Druckrey, H., Preissmann, R., Schmahl, D. & Muller, M.: Erzeugung von Magenkrebs durch Nitrosamide an Ratten. *Naturwissenschaften*, **48**: 165-, 1961.
- 3) Stewart, H. L., Snell, K. C., Morris, H. P., Wagner, B. P. & Ray, F. E.: Carcinoma of the glandular stomach of rats ingesting N, N'-2, 7-fluorenylenebisacetamide. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, **5**: 105-139, 1961.
- 4) Takeo Nagayo: Effect of Oral Administration of N, N'-2 7-Fluorenylenebisacetamide Combined with Traumatic Ulcers of the Glandular Stomach of Buffalo Rats. *J. Nat. Cancer Inst.*, **35**: 829-840, 1965.
- 5) Kazuo Mori: Carcinoma of the glandular stomach of mice by instillation of 4-Nitroquinoline 1-oxide. *Gann*, **58**: 389-393, 1967.
- 6) Susumu Majima, Toshio Takahashi and Tomio Narisawa: Experimental induction of carcinoma ingastric ulcer in rats. *GANN Monogr.*, **8**: 317-331, 1969.
- 7) Kazuo Mori and Akihiro Ohta: Carcinoma of the glandular stomach of mice by 4-Hydroxy-aminoquinoline 1-oxide. *Gann*, **58**: 551-554, 1967.
- 8) Fumio Hirose: Experimental induction of carcinoma in the glandular stomach by localized X-irradiation of gastric region. *GANN Monogr.*, **8**: 75-93, 1969.
- 9) Takeo Nagayo, Masao Ito and Seiji Yamada: Histogenesis and autoradiography of adenocarcinoma of the glandular stomach in rats induced by oral administration of N, N'-2, 7-Fluorenylenebisacetamide combined with irradiation to the stomach region. *Gann*, **63**: 143-151, 1972.
- 10) 斉藤貴生, 杉村隆: ニトロソグアニジンによる胃癌研究の進歩. *癌の臨床*, **16**: 503-511, 1970.
- 11) Horold L. Stewart, Katherine C. Small and Horold P. Morris: Histologic criteria for the diagnosis of experimentally induced carcinoma and precancerous lesions of the glandular stomach of inbred strains of rats and comparison with transplantability. *GANN Monogr.*, **8**: 353-375, 1969.
- 12) 三輪晃一: 胃癌発生増殖に及ぼす自律神経の影響に関する実験的研究. *十全医会誌*, **78**: 383-402, 1969.
- 13) 大原毅: 胃潰瘍癌の実験的研究—実験的慢性胃潰瘍を有するラットにおける N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NG) 投与の効果について—. *癌の臨床*, **17**: 543-550, 1971.
- 14) 田中宣威: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine による犬の実験胃癌の研究—微小癌よりみた胃癌の組織発生について—. *日消病会誌*, **69**: 583-604, 1972.
- 15) 野口真利: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine によるイヌ胃発癌の初期胃粘膜変化に関する研究. *日消病会誌*, **70**: 542-552, 1973.
- 16) 石川純, 岡島邦雄, 藤井康宏, 荒木京二郎, 寺田紘一, 花房伸: MNNG 誘発ラット胃癌における間質一とくに基底膜の態度とヒト胃癌との対比—. *癌の臨床*, **22**: 312-317, 1976.
- 17) 加来博: 胃粘膜上皮の動態とその解析 ³H-thymidine オートラジオグラフィによる研究. *Arch. Histro. Jap.*, **27**: 223-246, 1966.
- 18) 小池彰久: オートラジオグラフィによる N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 経口投与ラットの胃粘膜の経時的变化に関する研究. *京府医大誌*, **80**: 505-519, 1971.
- 19) Takashi Sugimura, Shinji Fujimura, Kikuko Kogura, Tsuneo Baba, Takao Saito, Minako Nagao, Hiroeki Hosogi, YuKio Shimosato and Tetsuyoshi Yokoshima: Production of adenoca-

rcinomas in glandular stomach of experimental animals by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. GANN Monogr., 8 : 157-208, 1969.

附 図 説 明

- 図1. 対照群のラジオオートグラム：正常幽門腺領域の腺頸部細胞に³H-thymidine のとりこみがみられ、標識帯は粘膜層の下部に細い帯状に認められる (neck cell layer) (H. E. ×100).
- 図2. regenerative glandular hyperplasia, surface type の癒痕のある病巣：粘膜層の中層に癒痕があり、その表層は再生上皮に被われている。標識細胞は、癒痕の下方と周辺にみられるが、癒痕部の腺管にも散見される。ラジオオートグラム (×100).
- 図3. regenerative glandular hyperplasia, surface type の癒痕のない病巣：腺管構造は保たれているが腺頸部細胞類似細胞の軽度な増生と腺窩上皮細胞の過形成が認められ表層は再生上皮で被われている (H. E. ×100).
- 図4. regenerative glandular hyperplasia, upward type の癒痕のない病巣：標識細胞は胃内腔に向けて巾をましており、表層は再生上皮に被われている。ラジオオートグラム (×400).
- 図5. regenerative glandular hyperplasia, downward type の癒痕のない病巣：標識細胞は粘膜筋板側に認められ、病巣周辺で巾をまして neck cell layer に移行している。ラジオオートグラム (×100).
- 図6. regenerative glandular hyperplasia, downward type の癒痕のある病巣：標識細胞は粘膜筋板側にみられるが癒痕部との移行部でも認められる。ラジオオートグラム (×100).
- 図7. adenomatous glandular hyperplasia, upward type：病巣の中心部は、好塩基性の胞体を有する異型細胞よりなる腺管の増生が樹枝状に分岐している。病巣周辺部では、好塩基性の胞体を有する異型細胞よりなる腺管の軽度な増殖と腺窩上皮細胞の過形成が認められる (H. E. ×100).
- 図8. 図7の病巣中心部のラジオオートグラム、：標識細胞は病巣中心部で上下に巾をましている (×200).
- 図9. adenomatous glandular hyperplasia, downward type：dark cell よりなる腺管の増殖は粘膜下層におよび、標識帯は病巣周辺部より巾をまし、病巣部では粘膜下層にまで認められる。ラジオオートグラム (×100).
- 図10. adenomatous glandular hyperplasia, downward type：粘膜下層に増殖した囊胞壁に腺窩上皮細胞や被蓋上皮細胞の乳頭状増殖が認められる (H. E. ×100).
- 図11. adenomatous glandular hyperplasia, downward type：粘膜下層に正常な胃粘膜構造をもつものでは、腺底部に標識細胞を認める、病巣周辺部の粘膜層の標識細胞は上下に巾をましている。ラジオオートグラム (×100).
- 図12. adenocarcinoma, surface type：粘膜層の標識細胞は、病巣周辺部で巾をまし、病巣部ではやや粘膜筋板側に位置しているが、red cell の認められる部分ではびまん性である。表層は再生上皮で被われている。ラジオオートグラム (×100).
- 図13. adenocarcinoma, upward type：標識細胞は病巣部でびまん性である。ラジオオートグラム (×100).
- 図14. adenocarcinoma, downward type：粘膜下層に浸潤した病巣である。標識細胞は病巣周辺部で上下に巾をまして病巣部におよび、ラジオオートグラムでは、粘膜下層で dark cell と red cell はびまん性となっている。ラジオオートグラム (×200).
- 図15. adenocarcinoma, downward type：固有筋層より漿膜への浸潤をしめす type B の病巣。リンパ管侵襲(↑)も認められる (H. E. ×200).
- 図16. regenerative glandular hyperplasia に認められる dark cell：胞体は円柱状。核はやや大型で類円形ないし楕円形でクロマチンに富み、基底側に位置しており、核小体を1個有するものが多い (H. E. 200).
- 図17. regenerative glandular hyperplasia に認められる red cell：胞体は低円柱状ないし扁平状。核はやや大型で類楕円形で淡明化しており、基底側に位置するものも多く、核小体を1個有するものが多い。ラジオ

オオートグラム (×400).

図18. adenomatous glandular hyperplasia に認められる dark cell : 胞体は円柱状で好塩基性を増している。核は大型で類円形ないし棍棒状でクロマチンに富み、基底側に位置し、核小体を1個有するものが多くみられる。核胞体比も高くなっている (H.E. ×400).

図19. adenomatous glandular hyperplasia に認められる red cell : 胞体は円柱状ないし扁平状のものが多くみられ、核は大型で類円形で淡明化しており、基底側に位置し、通常1個の核小体が明瞭に認められる (H.E. ×400).

図20. adenomatous glandular hyperplasia の upward type に認められた red cell : 胞体は高円柱状で杯細胞様のものも認める。核は大型で類円形で淡明化しており、基底側に正しく位置しており、通常1個の核小体が認められる (H.E. ×400).

図21. adenocarcinoma に認められる dark cell : 腺管の構造異型は強い、胞体は高円柱状ないし低円柱状で好塩基性がつよい、核は大型で不整な類円形ないし楕円形でクロマチンにとみ、核小体は通常1個であるが、数個を有するものもある。核の位置も一定しない、また核胞体比は高い (H.E. ×400)

図22. adenocarcinoma に認められた red cell : 胞体は高円柱状より扁平なものまで多彩であり、核は大型で不整楕円形より棍棒状で淡明化しており、基底側に扁平するものが多く、通常1個の核小体を有する。ラジオオートグラム (×400).

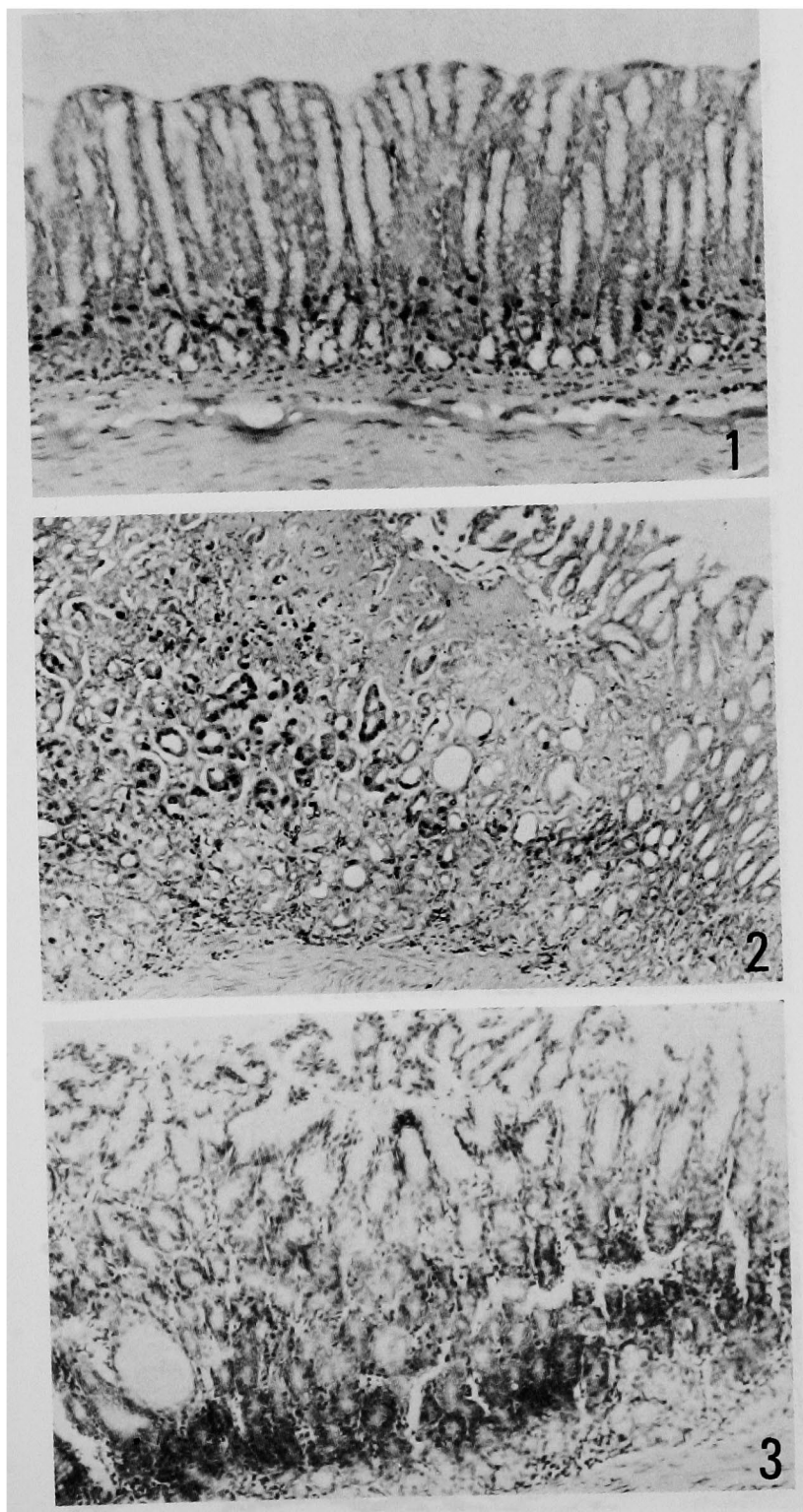
図23. adenocarcinoma (type B) に認められたリンパ管侵襲像 (H.E. ×400).

図24. Regenerative glandular hyperplasia : 病巣部の標識細胞の分布 (略図).

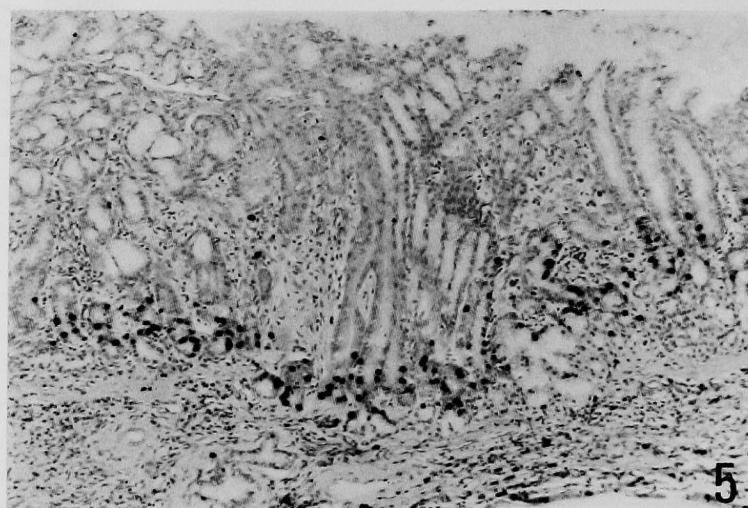
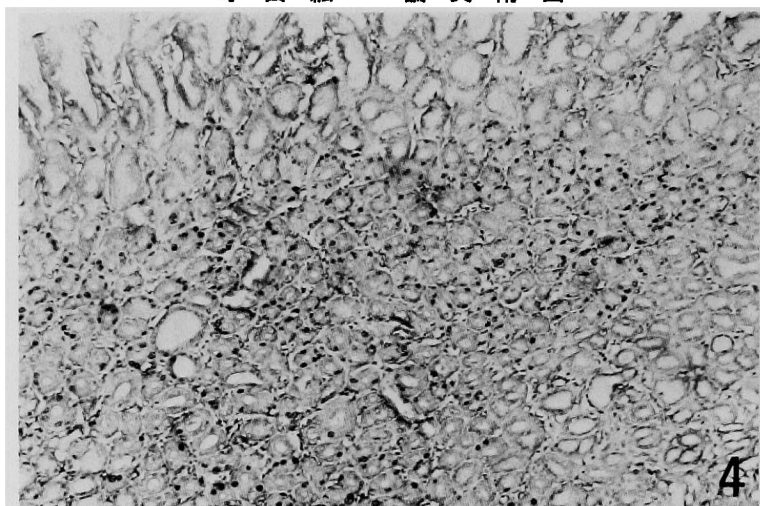
図25. Adenomatous glandular hyperplasia : 病巣部の標識細胞の分布 (略図).

図26. Adenocarcinoma : 病巣部の標識細胞の分布 (略図).

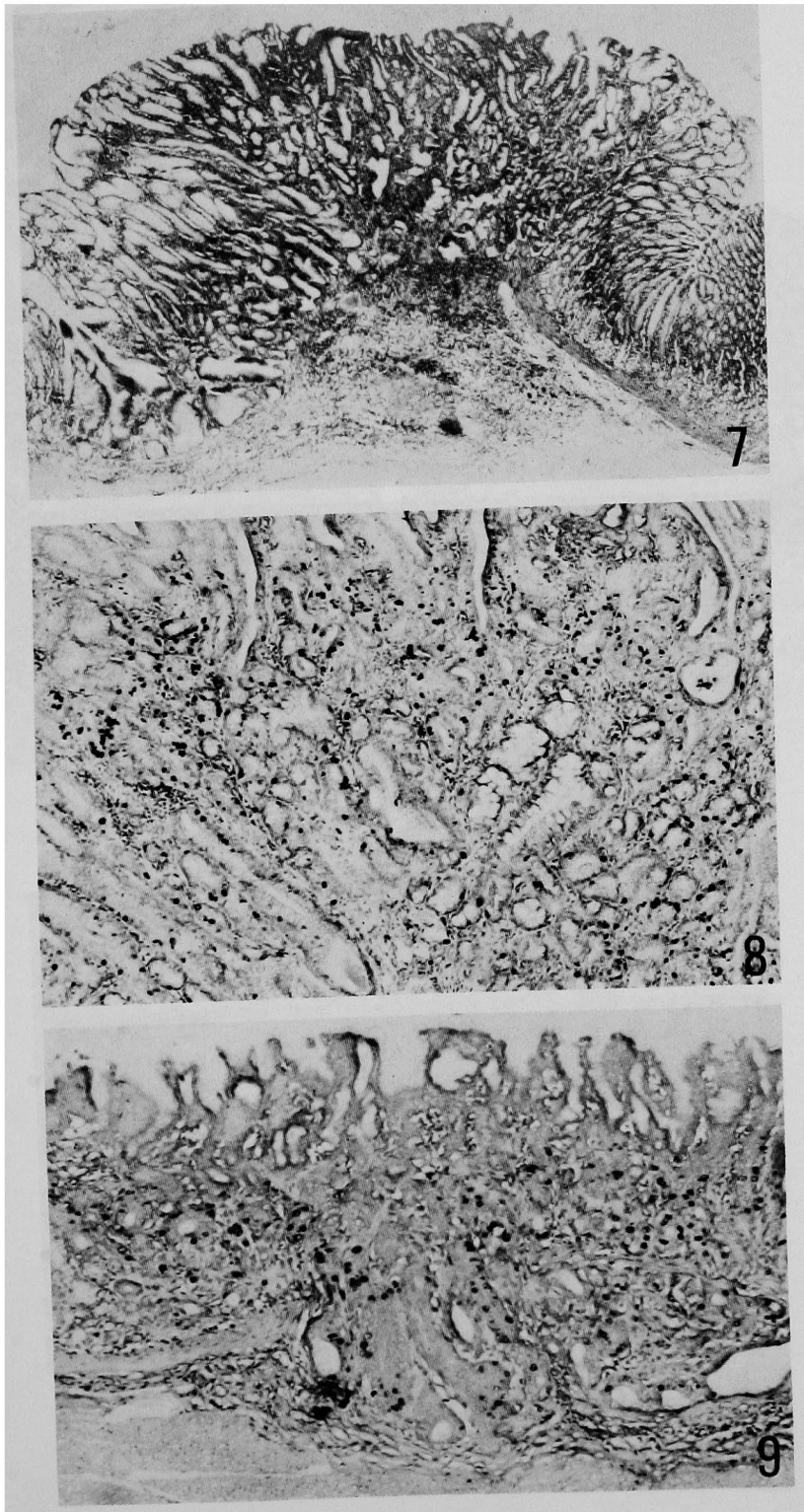
寺田 紘一 論文 附 図



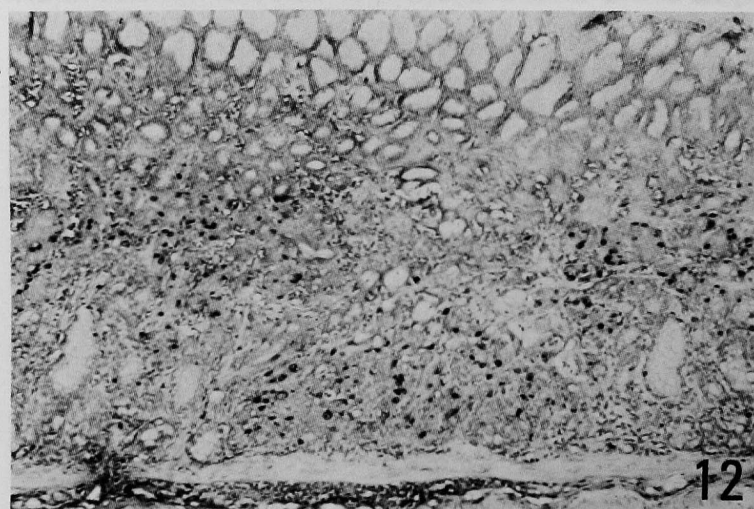
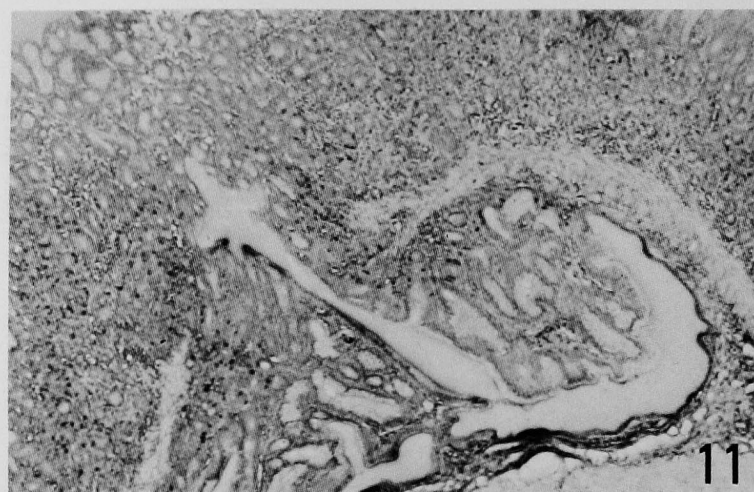
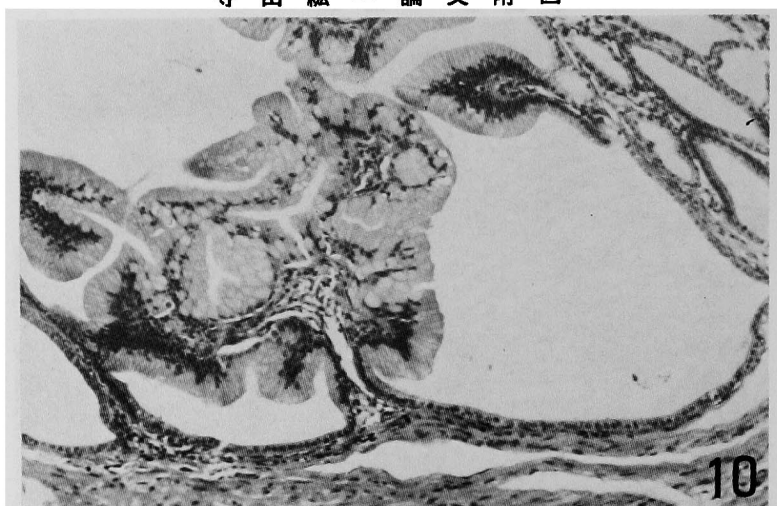
寺 田 紘 一 論 文 附 図



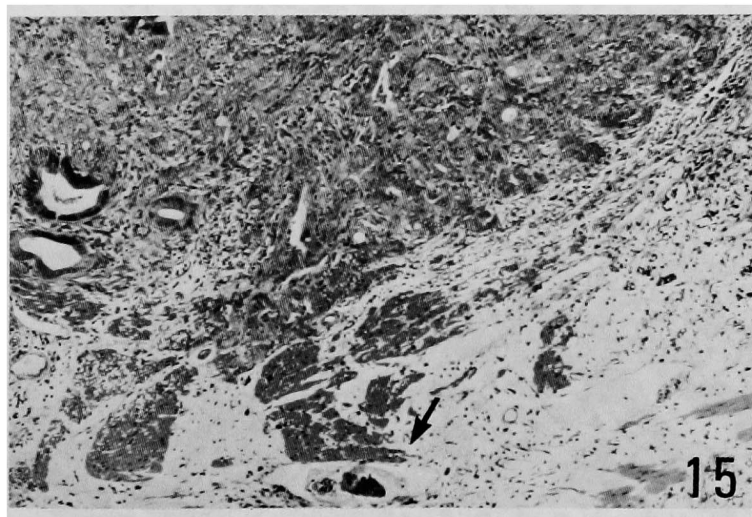
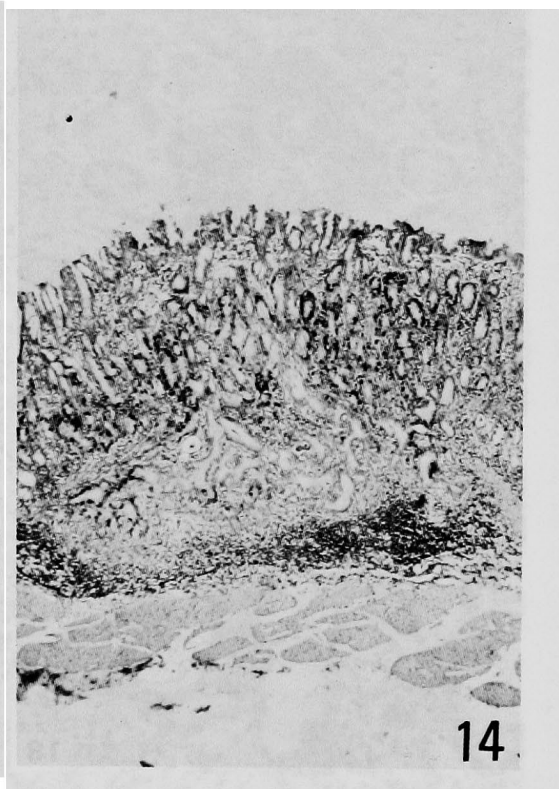
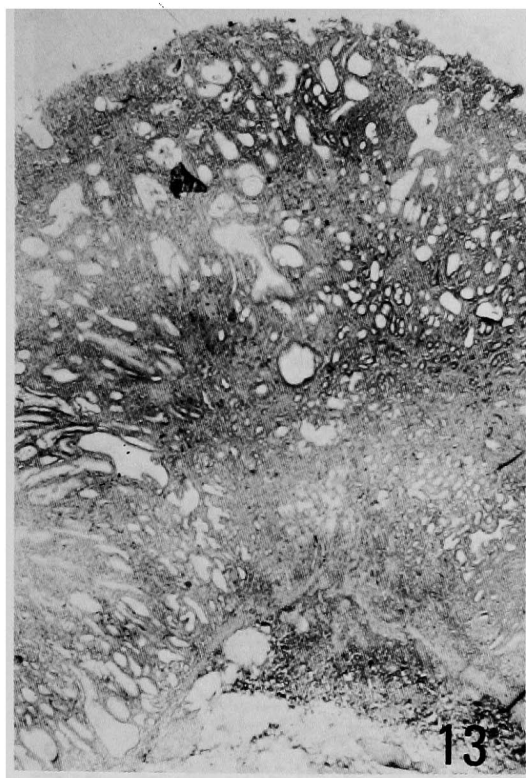
寺田 紘一 論文 附 図



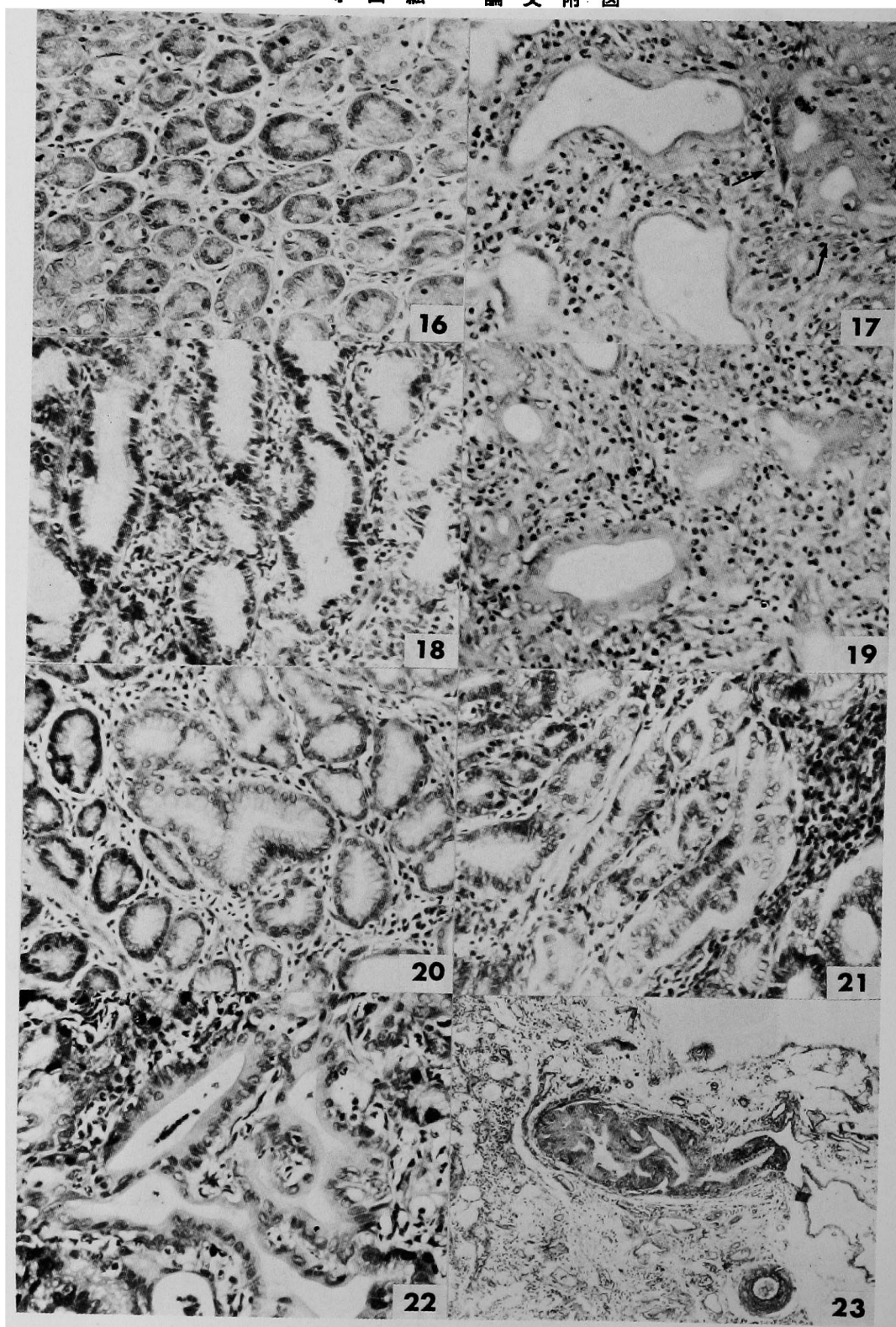
寺 田 紘 一 論 文 附 図



寺 田 紘 一 論 文 附 図



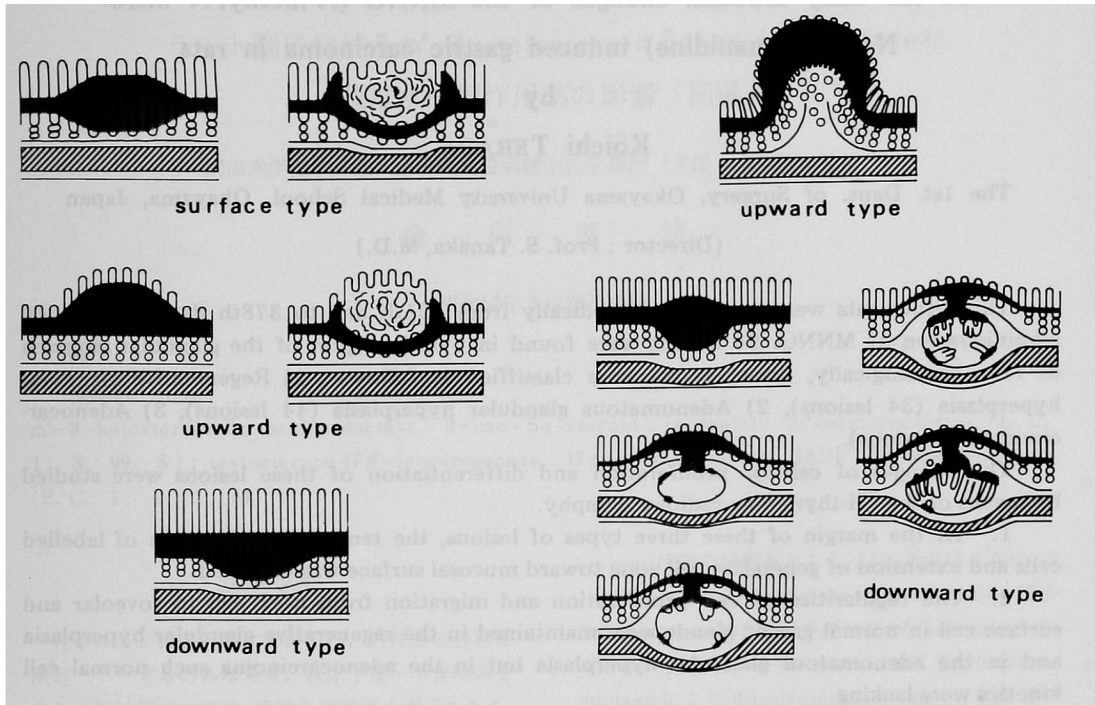
寺 田 紘 一 論 文 附 図



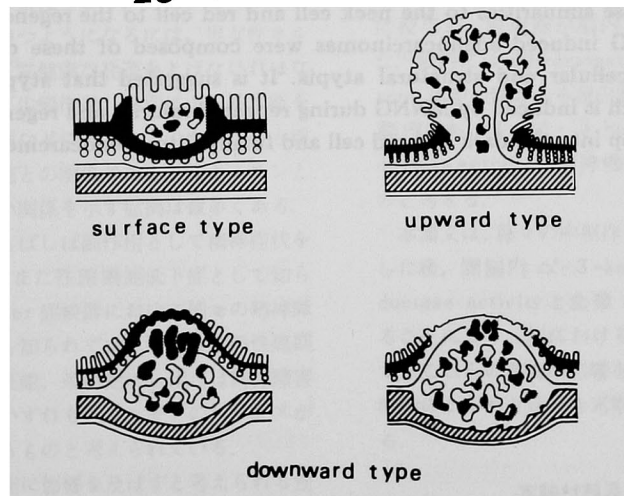
寺田 紘一 論文 附 図

24 regenerative glandular hyperplasia

25 adenomatous glandular hyperplasia



26 adenocarcinoma



**Histopathological and radioautographical studies
on the early mucosal changes of the MNNG (N-methyl-N'-nitro-
N-nitrosoguanidine) induced gastric carcinoma in rats**

by

Kōichi TERADA

The 1st. Dept. of Surgery, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Director : Prof. S. Tanaka, M.D.)

Thirty-four rats were sacrificed periodically from 191th day to 378th day after peroral administration of MNNG. 94 lesions were found in pyloric region of the glandular stomach of rats. Histologically, these lesions were classified as follows : 1) Regenerative glandular hyperplasia (34 lesions), 2) Adenomatous glandular hyperplasia (44 lesions), 3) Adenocarcinoma (16 lesions).

The changes of cellular proliferation and differentiation of these lesions were studied by means of the ^3H -thymidine radioautography.

1. At the margin of these three types of lesions, the tendency of increase of labelled cells and extension of generative cell zone toward mucosal surface was observed.

2. The regularities of cell proliferation and migration from neck cell to foveolar and surface cell in normal gastric glands were maintained in the regenerative glandular hyperplasia and in the adenomatous glandular hyperplasia but in the adenocarcinoma such normal cell kinetics were lacking.

3. In these three types of lesions, two kinds of different atypical cells were found, namely dark and red cell, which can not be found in normal gastric gland. They were distinguished not only morphologically but also according to the degree of ^3H -thymidine uptake. The dark cell has close similarities to the neck cell and red cell to the regenerative or foveolar epithelial cell. MNNG induced adenocarcinomas were composed of these dark and red cells which had marked cellular and structural atypia. It is suggested that atypical proliferation of the neck cell which is induced by MNNG during repeated injuries and regeneration of gastric mucosa, might develop into the dark and red cell and finally into adenocarcinoma.