

ホルマリンによる慢性胃潰瘍の作成

九州大学医学部第2外科

松口 宰邦 斎藤 貴生 佐々木 攻
岩松 正義 井口 潔

PRODUCTION OF CHRONIC GASTRIC ULCER BY FORMALIN

Tadakuni MATSUKUCHI, Takao SAITO, Osamu SASAKI,
Masayoshi IWAMATSU and Kiyoshi INOKUCHI

Second Department of Surgery, Kyushu University School of Medicine

ラットを用いて長期間開放性を持続できる胃潰瘍モデルの作成を目的とし、100%および50%ホルマリン0.025~0.1mlを胃漿膜下に局注したところ、25匹中1匹を除き4週後に全例にU1 4の開放性潰瘍を作成しえた。また局注54週後においても、33匹中7匹(21.2%)に開放性潰瘍を認め、本法は慢性胃潰瘍モデルの作成法として有用と思われた。

開放部面積は作成後12週まで次第に減少し、20週後に一旦拡大して再燃するが、34週後には経過中最小となった。組織学的には20週までの34匹はすべてU1 4であり、54週までの48匹中15匹はU1 3, 33匹はU1 4の潰瘍であった。

索引用語：ホルマリン潰瘍、慢性胃潰瘍モデル、実験胃潰瘍癌

はじめに

実験動物に胃潰瘍を作成する方法は数多くの先人による報告されているが、作成された潰瘍の大部分は急性胃潰瘍もしくはびらんである。また作成された目的は主として潰瘍の発生、治癒、再燃因子の検討、薬剤の効果判定等のための実験モデルとして使用するためであった¹⁾。長期間にわたり高率に開放性を持続する慢性胃潰瘍を作成しうる方法の報告は少なく、次の数種が挙げられるのみである²⁾。すなわち、1) 胃壁に薬物を局注するもの、2) 粘膜下層に異物を挿入するもの、3) 胃壁に外傷性に欠損をつくるもの、4) 外傷性欠損にコーチゾン全身投与を加味したものなどである。著者らは胃潰瘍癌の実験的研究を進めるために、慢性胃潰瘍の良いモデルを得たいと考えた。そのためには次の条件が必要と考えられる。1) 長期間開放性(活動性)を持続する潰瘍である。2) 高率に、再現性をもって作成できる。3) 一定の大きさの潰瘍を作成できる。4) 任意の部位、とくに胃底腺領域に作成できる。5) 安全に、容易に作成でき、複雑な操作を要しない。

6) 作成法自体に発癌性がないなどである。これらの条件を満たす慢性胃潰瘍のモデルとしては、これまでのところ酢酸潰瘍³⁾が知られているにすぎない。ただその開放性の持続は作成後250日で、開放率77.8%と高いが、穿孔による死亡が15~20%の高率にみられている。

最近、慢性胃潰瘍の作成が困難とされるイヌにホルマリンを動注することにより、ヒト慢性胃潰瘍によく類似し、2年以上持続する慢性開放性胃潰瘍を作成できることが報告された⁴⁾。著者は酢酸潰瘍を含むいくつかの試みを行った後⁵⁾、ホルマリンをラットの胃漿膜下に局注することにより、開放性を長期間持続でき、かつ開放率も十分に高いなど、上記の条件をほぼ満足する慢性胃潰瘍の作成に成功したので報告する。

I. 実験的慢性胃潰瘍の作成

実験材料ならびに方法

1. 実験動物

ウィスター系雌性ラット(5週齢、九動、熊本)25匹を用い、CE-2固型飼料(日本クレア、東京)および水道水を自由に摂取させながら、当教室動物飼育室で空調設備の下に飼育した。対照群として無処置のラット20匹を用いた。

2. 胃潰瘍作成法

ラットを12~24時間絶食後、エーテル麻酔下で上腹部を正中切開して胃を露出させ、腺胃の胃体部前壁漿膜下に、ホルマリンをツベルクリン針で丘疹ができるように局注した。針穴からのホルマリンの漏出を指で押えて防止した後、閉腹した。当日は水道水のみ与え、翌日より通常飼育に戻した。実験群を1群5匹の5群に分け、100%ホルマリン0.025ml(I群), 0.05ml(II群), 0.1ml(III群), 50%ホルマリン0.05ml(IV群), 0.1ml(V群)をそれぞれ局注した。毎週体重測定を行い、ホルマリン局注後4週目に屠殺剖検した。胃を大弯側で開き、10%ホルマリンで固定、肉眼的に病変を観察した後、小弯線およびこれに平行な線で病変部を含む切片を切り出し、パラフィン包埋後、HE染色、1部で Alcian blue-PAS 重染色、Azan-Mallory 染色、Elastika-Vangieson 染色を行って組織学的に検索した。

実験成績

1. 体重変化

有効匹数はIII群を除く各群ですべて5匹で、III群では1匹が術後6日目に胃穿孔により死亡した。II, III群で体重増加の抑制傾向がみられたが、他の群では無処置群に比べ、明らかな差は認められなかった(図1)。

2. 肉眼的所見

無処置群を除く実験群のすべてに陥凹性病変が認められ、V群では4匹のそれが円形潰瘍であった。陥凹部面積(縦径×横径× $\frac{\pi}{4}$ mm²)は、ホルマリン濃度が100%と50%とで差がなく、濃度が一定の場合局注量の増加とともにその面積は増大した(表1)。

3. 組織学的所見

陥凹性病変はすべてUI4の潰瘍で、I群の1匹を除きすべて開放性であった。組織学的に確認された開放部の面積は、局注したホルマリン量が増えるにつれて大きくなり、V群で最大であった(表1)。

組織学的には潰瘍部に、成熟した再生腺管に加えて

図1 実験群の体重変化

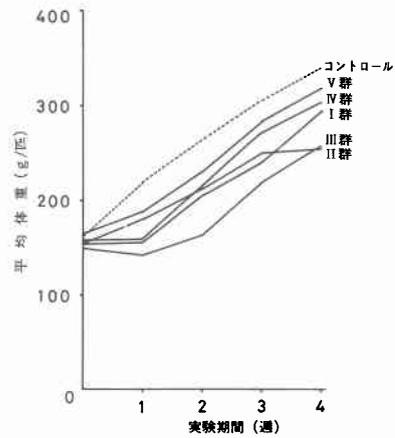


表1 ホルマリンの濃度、量による実験胃潰瘍の慢性化度

実験群	ホルマリン		有効数	円形潰瘍	陥凹部面積	潰瘍率 (%)	開放部面積
	濃度(%)	注入量(ml)					
I	100	0.025	5	2	2.0	80	1.3
II	100	0.05	5	2	6.2	100	5.8
III	100	0.1	4	1	8.5	100	8.0
IV	50	0.05	5	2	5.0	100	4.6
V	50	0.1	5	4	8.5	100	8.8

幼若な再生腺管、偽幽門腺化生腺管、囊腫状拡張腺管、パネート細胞、杯細胞様細胞、下行性腺増生、異所性腺管が認められ、以上のうち潰瘍辺縁では偽幽門腺化生、パネート細胞、囊腫状拡張腺管の出現頻度が高かったが、各群間で明らかな差はなかった(表2)。杯細胞様細胞は1例にみられたのみであった。また慢性胃潰瘍に認められるとされている粘膜筋板と固有筋層との融合像は、1例を除き全例にみられたが、閉塞性動脈内膜炎、断端神経腫は認められなかった。

II. ホルマリン潰瘍の経時的推移

実験材料ならびに方法

前項と同様にウィスター系雄性ラット114匹を用い

表2 ホルマリンの濃度、量による慢性胃潰瘍の組織学的所見の相違

実験群	有効数	幼若な再生腺管	偽幽門腺化生	囊腫状拡張腺管	杯細胞様細胞	パネート細胞	下行性腺増生	異所性腺管
I	5	1	4	2	0	4	2	1
II	5	2	3	4	0	2	0	1
III	4	1	2	1	0	3	2	0
IV	5	2	4	4	1	3	1	1
V	5	2	4	3	0	4	0	2

て、100%ホルマリン0.05mlを局注して潰瘍作成を行い、その後通常飼育した。ホルマリン局注後2, 3, 4, 8, 12, 20, 34, 54週目と経時的に屠殺し、肉眼的および組織学的に検索した。

実験成績

1. 作成潰瘍の深達度と治癒度

表3に示すごとく、作成後20週までの潰瘍は、すべてUI 4で粘膜筋板と固有筋層との融合像が認められた。34週, 54週の長期経過例では約2/3がUI 4であったが、ほかはUI 3としか判定できなかった。治癒度をみると4週までは全例H₀の開放性潰瘍であったが、8週目では完全に治癒したH₃が出現し、12週目では1例のみがH₀でその開放部面積も、4週時の1/6に減少した。しかしながら20週目になると、開放性潰瘍が3例中2例に認められ、その開放部面積も拡大した。34週目では再び治癒傾向が強くなり、26.7%が開放性であったがその開放部面積は経過中最小であった。54週目になると開放率は21.2%とさらに減少したが、H₁を含めた治癒度の低い潰瘍は33例中の11例を占めた。また開放部面積も34週時より増大した。

2. 潰瘍辺縁の組織学的所見

潰瘍辺縁の粘膜における上皮成分の組織学的所見

表3 ホルマリン潰瘍の経時的推移

実験期間 (週)	有効数	ホルマリン潰瘍				開放部面積 (mm ²)
		深達度		治癒度		
		UI 3	UI 4	H0-1	H2-3	
2	2	0	2	2	0	14.4
3	2	0	2	2	0	8.8
4	16	0	16	16	0	9.8
8	6	0	6	4	2	3.5
12	5	0	5	1	4	1.6
20	3	0	3	2	1	6.1
34	15	5	10	4	11	0.2
54	33	10	23	11	22	1.3
計	82	15	67	41	41	

を、実験期間を4区分にわけ治癒度別に検討した(表4)。治癒度H₀₋₁の潰瘍において、幼若な再生腺管は8~20週で最も高率にみられ、54週でも64%に認められた。偽幽門腺化生は初期の2~4週では70%に出現したが、以後はほとんどすべてにみられた。これに対し嚢腫状拡張腺管は初期には65%に認められたが、経過とともに減少しその程度も軽度となった。杯細胞様細胞は54週にのみ3例に認められたが、パネート細胞は34週を除き、期間中半数以上にみられた。下行性腺増生は経過とともにその出現が高率となり、54週では73%に認められた。異所性腺管は2~4週と54週の1部のみ出現した。

作成後8週目より出現した治癒度H₂₋₃の潰瘍では、幼若な再生腺管は8~20週の2例にしか認められなかったが、偽幽門腺化生は8~20週の大部分にみられ、以後も約半数にみられた。嚢腫状拡張腺管の出現頻度は、偽幽門腺化生の約1/2に認められたが、杯細胞様細胞は見出しえなかった。一方パネート細胞は8~20週の約半数にみられ、以後次第にその出現頻度は減少した。これに対し下行性腺増生は経過とともにその頻度が増加し、54週では23%に認められた。異所性腺管は54週に2例みられたにすぎなかった。

考察

実験潰瘍の作成法は多数にのぼり、Mannおよび大井により、14群に分類されている¹⁾。このうち慢性潰瘍を作成できる方法は数少なく、かつ著者の挙げた条件に沿うものは、組織に壊死性変化を起こすような薬物の胃壁内注入による方法のみと考えられた。注入薬剤には塩酸⁶⁾、硝酸銀⁶⁾、酢酸³⁾、炭酸ランタンゲル⁷⁾、放射性金コロイド⁸⁾、ホルマリン⁹⁾などが報告されているが、固有筋層内に注入するものが大部分で、手技が安定な漿膜下層に注入するだけで発生するのは、酢酸注入による方法のみであった。酢酸潰瘍は高木により開

表4 ホルマリン潰瘍の治癒度と組織学的所見の経時的推移

実験期間 (週)	治癒度		幼若な 再生腺管	偽幽門 腺化生	嚢腫状 拡張腺管	杯細胞 様細胞	パネート 細胞	下行性 腺増生	異所性腺管
	H0-1	H2-3							
2-4	< 20		6	14	13	0	10	4	2
		0	0	0	0	0	0	0	0
8-20	< 7		6	7	2	0	5	4	0
		7	2	6	3	0	4	1	0
34	< 4		2	4	1	0	0	2	0
		11	0	5	1	0	3	2	0
54	< 11		7	9	4	3	8	8	3
		22	0	11	5	0	4	5	2

発され⁹⁾, 10~30%溶液が用いられる¹⁰⁾. 0.01ml 注入では治癒しやすく, 0.05ml 注入では10~20%が死亡し, 0.14ml 注入では難治性潰瘍ができるが, 20~40%穿孔による死亡が見られる¹¹⁾. また幽門部に比べ, 胃体部に作成したものは治癒しやすく¹²⁾, 前壁に作成したものは, 後壁のそれより治癒しやすいという¹¹⁾. 著者の20%酢酸溶液0.05ml 注入(胃体部, 前壁)の結果では, その開放率は4週後83%, 8週および12週後はともに40%にすぎなかった⁵⁾.

今回用いたホルマリンによる試みは古く, 1907年 Payr¹³⁾が動脈内に注入し, 慢性円形潰瘍の発生を報告したことに始まる. Robertら⁹⁾も8%ホルムアルデヒド溶液をラット胃粘膜に局注することにより, 42時間目に壊死巣形成をみている. 高木¹⁰⁾はこれを追試したが, 6日後もなお壊死巣のみで潰瘍性変化を腺胃に見い出せなかった. しかし平井⁴⁾はイヌの左胃動脈最終枝に20%ホルマリン0.5ml を注入することにより, ヒト慢性胃潰瘍によく類似した潰瘍を作成し, 最長2年間にわたり開放性を持続できたという. 中村¹⁴⁾も注入動脈枝を変えることにより, 胃の各部に慢性潰瘍を作成できることを示した.

本研究ではホルマリンをラット胃体部の漿膜下に局注することにより, UI 4の開放性慢性胃潰瘍を発生させることが明らかにされた. 注入量としては, 穿孔を起さない0.05ml が適当と思われ, 100%ホルマリンの方が50%ホルマリンよりも広い開放性潰瘍を発生させる傾向にあった.

これまでに報告された胃潰瘍癌の実験的研究に用いられた実験潰瘍の中で, その慢性化度を明確に記載したものは少ない. 胃底腺領域の外傷性潰瘍¹⁵⁾は14日以上経過例で35%の開放率にすぎない. 酢酸潰瘍¹⁶⁾では8週以上の例で50%に開放性潰瘍を認めているが, 作成部位は胃底腺領域と幽門腺領域の境界部であり, 胃底腺領域での成績はない. 同様に境界部に作成されたランタン潰瘍¹⁷⁾, 焼灼潰瘍¹⁷⁾では1~6カ月では, それぞれ25%, 15%に慢性潰瘍がみられたが, 6カ月以上ではともに開放性潰瘍は認められなかった. 胃底腺領域前壁に作成された Clamping-Ligation (C-L) 潰瘍¹⁹⁾では, 35週以上の例で74%に UI 4が観察されたが開放率は不明である. Iodoacetamide (IAA)潰瘍ではその投与期間により慢性化度に差がみられ, 白井²⁰⁾, 高橋²¹⁾はともに28週以上の経過例で57%に, 福島²²⁾も48週以上の例で14%に開放性慢性潰瘍を認めている. 岩永²³⁾は37日以上連続投与で, 94%の高率に胃底腺領

域の慢性潰瘍を観察しているが, 幽門腺領域を含む広範な周囲粘膜にも高率にびらんがみられ, 著者の挙げた条件に一致しない. その他の実験では, 潰瘍単独群の成績がなく慢性化度は不明である.

先に述べた実験潰瘍の条件からみると, 腺境界部もしくはこれに近い胃底腺領域に作成された潰瘍は, たとえこの潰瘍部に癌が観察されたとしても, これを潰瘍と関係なく単に幽門部に発生した癌と区別するのが困難である. MNNGによる実験胃癌の発生は幽門部や境界部に主として発生するので, 潰瘍癌研究のモデルには適していない. また IAA 潰瘍は前胃直下に堤状縁に沿った胃底腺領域に好発するが, 高濃度または長期間の IAA 投与では胃底腺領域のみならず, 幽門腺領域にも潰瘍性変化を生ずることが知られており²³⁾, 限局された実験潰瘍を任意の場所に作成できる方法とはいえない.

これに対し100%ホルマリン0.05ml を注入後発生した潰瘍は, 死亡もなく4週後に全例 UI 4の開放性慢性潰瘍として認められた. さらに34週以後においても, 全例が UI 4もしくは UI 3の深い潰瘍であり, また54週の長期間経過後にも21.2%の高率で開放性を維持できた. さらに IAA 潰瘍と異なり, 任意の部位に限局された潰瘍を作成することが可能であった. したがって本法は, 潰瘍癌の実験的研究を行うための慢性胃潰瘍のモデルとして好適であると考えられる.

まとめ

ラット腺胃の体部漿膜下に100%ホルマリン0.05ml を局注することにより, 長期間持続する限局性の慢性潰瘍を高率に作成しえた. 本法は胃潰瘍癌の実験的研究に有用な慢性胃潰瘍のモデルとして好適であると考えられた.

文 献

- 1) 大井 実: 胃潰瘍症. 南江堂, 東京, 1957
- 2) 小山靖夫: 実験的胃潰瘍の作製法. 胃がん. 東京, 講談社, 1974, p101-103
- 3) 高木敬次郎, 岡部 進, 佐直隆一: ラット慢性潰瘍の発生ならびに数種薬物の治療効果の検定. 日薬理誌 64: 211, 1968
- 4) 長尾房大, 平井勝也, 中村紀夫: ホルマリン注入潰瘍. 実験潰瘍. 東京, 日本メディカルセンター, 1976, p141-150
- 5) 松口幸邦, 斉藤貴生, 佐々木攻ほか: 胃壁切り取りおよびホルマリン局注による実験潰瘍の作成. 実験潰瘍 4: 1-2, 1977
- 6) 村上忠重, 松田 弘, 大塚欣二: 20-メチールコラントレンの経口投与方法によるラットの胃潰瘍癌発

- 生の為の基礎的研究, GANN 48: 569—571, 1957
- 7) 田中勝次: 胃潰瘍の経過に関する臨床的及び実験的研究. 日消病会誌 56: 71—99, 1959
- 8) 富吉俊三: 実験的胃潰瘍の治癒過程に関する研究. 広島医 16: 271—293, 1968
- 9) Robert A, Selye H: Effect de la cortisone et de la STH sur l'ulcère gastrique expérimental. Ann endocrinol 13: 845—848, 1952
- 10) Takagi K, Okabe S, Saziki R: A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. Jap J Pharmacol 19: 418—426, 1969
- 11) Okabe S, Pfeiffer CJ: Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. Dig Dis Scr 17: 619—629, 1972
- 12) 小林顯彦, 竹田彬一, 服部誠一ほか: 胃粘膜の血管構築に関する研究 (II) —酢酸潰瘍の治癒過程及び微細血管の経時的変化に及ぼす Sulpiride の効果—. 臨と研 54: 589—594, 1977
- 13) Payr E: Ueber Pathogenese, Indikationsstellung und Therapie der runden Magengeschwures. Dtsch Med Wochenschr 9: 1556—1559, 1909
- 14) Nakamura N, Sakaguchi Y, Nagao F: Study on the development and the factor for chronic process in formalin induced ulcer-with a special emphasis on the vascular changes. Progress in peptic ulcer. Parádfürdő (Hungary) 1976, p739—754
- 15) 大原 毅: ラットにおける実験的慢性胃潰瘍. 癌の臨 17: 457—464, 1971
- 16) 下川原宏: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MMNG) 投与による潰瘍癌発生に関する実験的研究. 鹿児島大医誌 26: 341—377, 1974
- 17) Kanahara H: An experimental study on atypical epithelial proliferations associated with chronic ulceration of the stomach with special reference to early carcinogenesis. Acta Medica et Biologica 21: 133—168, 1974
- 18) 間島 進, 高橋俊雄, 藤田佳宏ほか: 胃潰瘍からの発癌についての実験的研究. 京都府医大誌 81: 277—283, 1972
- 19) 猪野陸征: 胃底腺領域における胃潰瘍部再生粘膜と発癌に関する実験的研究. 長崎医学会誌 55: 477—489, 1980
- 20) 白井智之, 花之内基夫, 伊東信之: 胃潰瘍の癌化について—ラットによる実験結果から—. 胃と腸 11: 599—604, 1976
- 21) Takahashi K, Shirai T, Fukushima S, et al: Effect of fundic ulcers induced by Iodoacetamide on development of gastric tumors in rats treated with MNNG. GANN 67: 47—54, 1976
- 22) 福島正信: Iodoacetamide と N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 併用による胃潰瘍からの発癌についての実験的研究. 京都府医大誌 86: 337—350, 1977
- 23) 岩永 剛, 古河 洋, 小山博起ほか: ラットの腺胃における潰瘍癌の実験的研究. 日消病会誌 73: 1070—1078, 1976