

N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine によるラット消化管 (胃・上部小腸) の発癌過程における細胞動態に関する研究

群馬大学医学部第2外科学教室 (指導: 泉雄 勝教授)

蒔田 富士雄

N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG) ラット消化管発癌過程において, 抗 Bromodeoxyuridine (BrdU) モノクローナル抗体を用いて ENNG 非投与ラットの正常粘膜上皮, ENNG 投与ラットの非癌部粘膜上皮および発癌病巣の細胞動態解析を行い次の結果を得た. 1) 発癌過程に伴い非癌部粘膜上皮においては BrdU 標識率の上昇がみられ, 発癌物質による粘膜上皮の S 期細胞の増加が認められた. 2) 正常粘膜上皮では上部小腸8.7%, 腺胃幽門域6.6%に対し, 腺胃胃底域1.9%と発癌の好発部位で比較的高い BrdU 標識率を示した. 3) 発癌病巣における BrdU 標識率 (16.8~23.7%) は正常粘膜上皮や非癌部粘膜上皮のそれよりも有意に高値を示した ($p < 0.001$). 4) 発癌病巣の組織型・分化度と BrdU 標識率には関連を認めなかったが, 深達度が pm 以上の癌は m, sm の癌に比べて標識率がやや高値を示した. 以上のように発癌と消化管粘膜上皮の S 期細胞出現率の変化には深い関連が示唆された.

Key words: ENNG induced carcinoma in rat, bromodeoxyuridine, cell kinetics

I. 緒言

癌細胞の動態解析は, 癌の増殖性を知らるうえの重要なパラメーターとして, ^3H -thymidine による Autoradiography 法¹⁾²⁾などによって行われてきた. 1982年 Gratzner³⁾により thymidine の analogue である bromodeoxyuridine (BrdU) に対するモノクローナル抗体が開発されたことで, DNA 合成期細胞内に取り込まれた BrdU を免疫組織化学的に染色して, 組織標本上で DNA 合成細胞を標識することができるようになった^{4)~6)}. そこで, この BrdU を用いて N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG) によるラット消化管の発癌過程における消化管粘膜上皮細胞の DNA 合成に関する経時的変化について検討を行った.

II. 研究目的

今回の ENNG 発癌ではラット腺胃幽門腺領域, 胃底腺領域および上部小腸にのみ発癌がみられるというのが従来の報告であり, 今回その3領域に分けて細胞動態の解析を行ったが, 目的の第1は発癌過程においてみられる発癌率および発癌個数, 腫瘍径などの上昇

が発癌物質 ENNG の作用を受けた非癌部の粘膜上皮細胞の S 期細胞出現率の増加と関連し, 発癌が消化管粘膜上皮の S 期細胞出現率の変化と関連があるかみることにある. そして前述の3領域においては発癌の時期が異なり, また ENNG の作用を受けていない正常粘膜上皮においての S 期細胞の割合・分布が異なっている点から分けて細胞動態の検討を行った. 目的の第2は発癌病巣と非癌部粘膜上皮とでは標識率に差があり腫瘍における S 期細胞の出現率の増加を確かめた. 目的の第3は発癌病巣において組織型や深達度と標識率との関係がどうなっているかを検討した.

III. 対象および方法

1. 発癌方法

Wistar 系雄ラット (10週齢) を用いて ENNG (米国 Aldrich Chemical 社製) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 水溶液を4か月間連日飲料水として経口投与した. それ以後は水道水のみを飲料水として投与し発癌させた.

2. 実験スケジュール

ENNG 投与開始後 2, 4, 6, 8, 10, 12か月目にラットを屠殺剖検して発癌の病理学的検索および BrdU 標識率測定を行った. それぞれを2M群, 4M群, 6M群, 8M群, 10M群, 12M群として ENNG 非投与群 (N群) と比較検討した. 各群の総ラット数は, そ

それぞれ10匹ずつとした (Fig. 1).

3. 実験方法

実験スケジュールに従って各時期において、まず BrdU 20mg/kg をラット腹腔内に投与し60分後に屠殺、摘出したラットの胃および上部小腸を胃大弯側で長軸に沿って切開し全粘膜を露出させ腫瘍の有無、占居部位、肉眼形態、大きさ(長径, 短径)を観察測定後発癌率, 1匹あたりの発癌個数, 平均腫瘍最大径および1個あたりの腫瘍重量を測定した。摘出標本は10%ホルマリンにて24時間固定し⁷⁾。ラット腺胃では小弯線に平行に腺胃幽門腺領域と腺胃胃底腺領域の切片を、小腸では、水口⁸⁾の報告による癌好発部位である幽門輪より約15cm までの上部小腸の長軸方向の連続切片を作成した。腫瘍のある場合はその部位の中央の切片を作成した。切片はパラフィン包埋後約4 μ に薄切し脱パラフィン後2N-HClで室温にて30分間処理しDNA単鎖化を行った後、Table 1に示すごとく抗BrdUモノクローナル抗体(Becton Dickinson社製)を用いたPAP法(Peroxidase-Anti-Peroxidase法)による免疫組織化学染色を行った^{4)~6)}。Fig. 2, 3, 4は、それぞれ上部小腸における正常上皮, 非癌部粘膜上皮, 発癌病巣のBrdU染色標本を示す。各群において切片

Fig. 2 Light microscopic appearance of normal epithelium in small intestine (Group N). BrdU immunohistochemical stain. ($\times 125$)

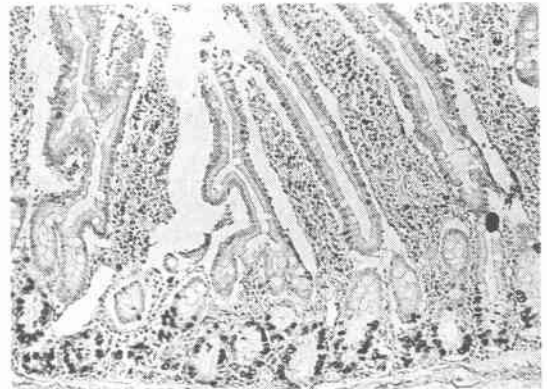


Fig. 3 Light microscopic appearance of mucosa without cancer in small intestine at 8th month after ENNG administration (Group 8M). BrdU immunohistochemical stain. ($\times 125$)

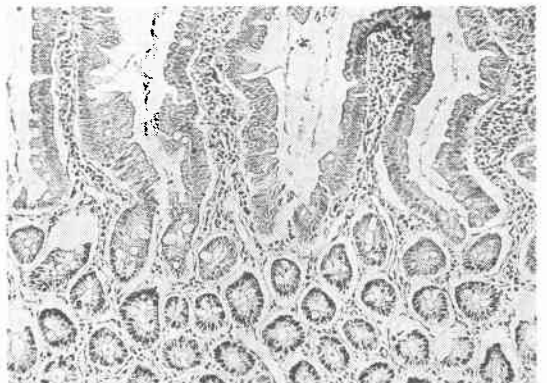
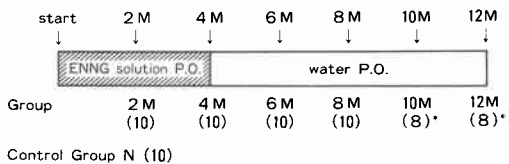


Fig. 1 Experimental schedule



↓ : Time of examination * : Two rats died during the experimental period were excluded.
() : No. of sacrificed rats

Table 1 BrdU immunohistochemical staining by PAP method

After about 4 μ tissue sections were cleared of paraffin

- ① DNA denaturation : 2N-HCl 37C 30min, neutralization
- ② Inhibition of inner peroxidase activity : 3% H₂O₂ methanol solution 15min, PBS washing 15min
- ③ Digestion with proteinase : 0.1% Protease 5min, PBS washing 10min
- ④ 10% normal pig serum 37C 20min
- ⑤ Primary antibody (mouse anti-BrdU monoclonal antibody(Becton Dickinson)) 1:50 diluted solution 37C 30min, PBS washing 15min
- ⑥ Secondary antibody 37C 20min, PBS washing 15min
- ⑦ PAP complex 37C 20min, PBS washing 15min
- ⑧ DAB reaction : (PBS 150mM +3, 3'-Diaminobenzidine 30mg +0.3%H₂O₂ 10drips) 37C 15min, PBS 15min
- ⑨ Counterstained with Hematoxylin, water washing
- ⑩ dehydrated, mounted

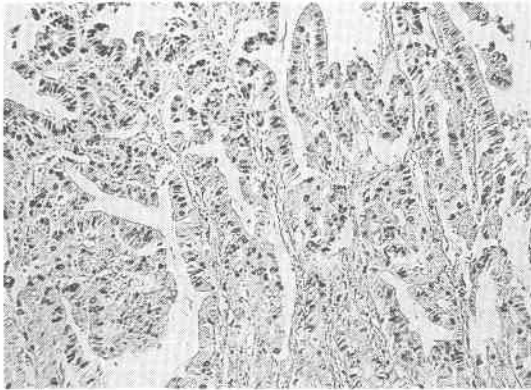
↓
microscopic examination

の中央まで明瞭に標識されているものを選び腺胃幽門腺領域, 胃底腺領域および幽門輪から約15cm までの上部小腸の2,000個以上の粘膜上皮細胞につき BrdU染色陽性細胞数をカウントし標識率(Labeling Index)を算出した。発癌病巣においては腫瘍辺縁部と中心部を平均して2,000個以上の癌細胞につき標識率を求めた。さらに同一切片における H.E. 標本も作成して、腫瘍の肉眼型, 組織度, 分化度, 深達度は胃癌取扱い規約⁹⁾により検討を行った。

4. 統計学的検討

BrdU 標識率 (L.I.) の比較検討には、t-検定を用いて検討を行った。

Fig. 4 Light microscopic appearance of cancer in small intestine [well differentiated adenocarcinoma, ss] at 12th month after ENNG administration (Group 12M). BrdU immunohistochemical stain. (×125)



IV. 結 果

1. 発癌率 (発癌匹数/屠殺匹数)

10M および12M 群の実験途中で死亡して病理検索のできなかつた2匹ずつを除外して各群の発癌率を検討すると2M 群0% (0/10匹), 4M 群0% (0/10匹), 6M 群30% (3/10匹), 8M 群70% (7/10匹), 10M 群75% (6/8匹), 12M 群88% (7/8匹)と ENNG 投与開始6か月目から経過とともに発癌率の上昇が認められた。

2. 発癌個数 (総発癌個数/発癌匹数)

2M 群と4M 群には発癌はみられなかつたがそれ以

後の群の1匹あたりの発癌個数は6M 群1.0個, 8M 群1.9個, 10M 群2.8個, 12M 群2.4個と経過とともに発癌個数の増加が認められた。

3. 腫瘍径

平均腫瘍最大径 (腫瘍各個の最大径の和/総発癌個数) は6M 群3.7mm, 8M 群6.9mm, 10M 群9.9mm, 12M 群12.6mm と経過とともに大きさの増大をみた。

4. 腫瘍重量

1個あたりの腫瘍重量 (腫瘍各個の重量の和/総発癌個数) は, 6M 群0.02g, 8M 群0.21g, 10M 群2.37g, 12M 群3.61g と発癌過程とともに重量の増大を認めた。

5. 発癌部位と肉眼分類

発癌部位と癌の肉眼分類を **Table 2** に示した。まず発生した全癌の発生部位を腺胃幽門腺領域 (幽門域), 腺胃胃底腺領域 (胃底域), 上部小腸の3領域に分けると上部小腸が64%, 幽門域が32%とこの2領域に多数の発癌が認められ, ENNG 発癌による好発部位と思われた。そして経過とともに幽門域の発癌が増加する傾向が認められた。一方, ほかの消化管 (食道, 前胃, 下部小腸, 大腸など) には発癌はみられなかつた。肉眼分類は腫瘍が粘膜下組織以内にとどまる早期癌では肉眼的で I 型, IIa 型の隆起型が40%と, また固有筋層 (pm) を越える進行癌でも Borrmann 1 型など限局隆起型のものが26%と多かつた。

6. 組織学的所見

組織学的深達度を検討すると発癌経過とともに pm

Table 2 Location and macroscopic types

Group	No. of rats	No. of rats with tumors	No. of tumors	location					macroscopic types						
				grandular stomach		small intestine (from P-ring)			early cancer*			advanced cancer** (Borrmann classification)			
				antral port.	fundic port.	~5 cm	~10 cm	10cm ~	I	II a	II c	1	2	3	
2M	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4M	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6M	10	3	3	0	0	0	1	2	3	0	0	0	0	0	0
8M	10	7	13	2	0	6	2	3	5	1	1	4	1	1	
10M	8	6	17	4	0	5	3	5	3	3	3	4	4	0	
12M	8	7	17	10	2	1	3	1	0	5	1	5	3	3	
Tctal (%)	56	23	50	16 (32)	2 (4)	32 (64)			11 (22)	9 (18)	5 (10)	13 (26)	8 (16)	4 (8)	

* I : protruded type
 II a : superficial protruded type
 II c : superficial depressed type

** 1 : local protruded type
 2 : local depressed type
 3 : invasive depressed type

Table 3 Histological findings

Group	total No. of tumors	histological depth of invasion					histological types			
		m	sm	pm	ss	s	differentiated type		undifferentiated type	
							granular stomach	small intestine	granular stomach	small intestine
2M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6M	3	3	0	0	0	0	3	0	0	0
8M	13	6	1	2	0	4	2	11	0	0
10M	17	7	2	2	2	4	1	13	3	0
12M	17	4	2	6	4	1	9	5	3	0
Total (%)	50	20 (40)	5 (10)	10 (20)	6 (12)	9 (18)	12 (24)	32 (64)	6 (12)	0 (0)

m : mucosal layer
 sm : submucosal layer
 pm : proper muscle layer
 ss : subserosal layer
 s : serosal layer (exposed)

以上の癌の頻度は、6M 群 0% (0/50)、8M 群 12% (6/50)、10M 群 16% (8/50)、そして 12M 群で 22% (11/50) と進行癌の占める割合が増大した。組織型では各領域にわたり分化型腺癌が 88% (44/50) を占めるのに対して、低分化型腺癌の発生は腺胃でのみ 10M、12M 群の後期にわずか 12% (6/50) を占めるにすぎなかった (Table 3)。

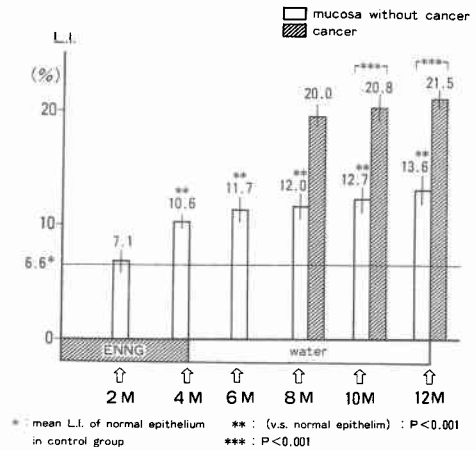
7. BrdU による細胞動態学的検討

① ENNG 発癌過程における DNA 合成期 (S 期) 細胞の標識率 (L.I.)

癌の好発部位である幽門域における標識率をみると N 群すなわち正常粘膜上皮では $6.6 \pm 1.0\%$ であるのに対して、ENNG 投与群では 2M 群、4M 群、6M 群の非癌部はそれぞれ $7.1 \pm 1.1\%$ 、 $10.6 \pm 0.2\%$ 、 $11.7 \pm 1.2\%$ であった。8M 群では非癌部は $12.0 \pm 1.1\%$ で、発癌部は $20.0 \pm 1.0\%$ 、10M 群の非癌部は $12.7 \pm 1.1\%$ 、発癌部は $20.8 \pm 1.1\%$ 、そして 12M 群の非癌部は $13.6 \pm 1.4\%$ 、発癌部は $21.5 \pm 1.0\%$ と正常粘膜や同時期の非癌部に比較して、発癌部では高い L.I. 値を示した ($p < 0.001$)。また、非癌部においても経時的な L.I. の上昇がみられ 4M 以後の群では正常粘膜に比較して高い L.I. 値を示した ($p < 0.001$) (Fig. 5)。

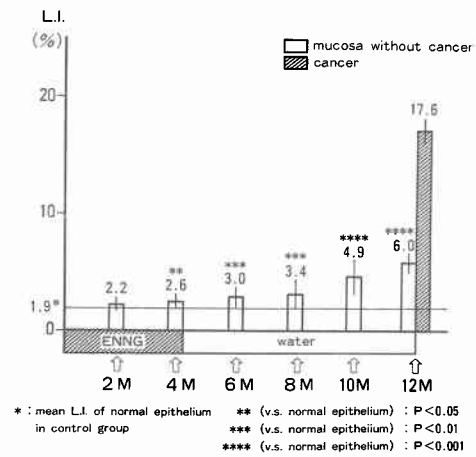
癌の発生の少なかった胃底域では、正常粘膜上皮の L.I. が $1.9 \pm 0.3\%$ であるのに対し、2M 群、4M 群、6M 群、8M 群、10M 群の非癌部はそれぞれ $2.2 \pm 0.3\%$ 、 $2.6 \pm 0.4\%$ 、 $3.0 \pm 0.8\%$ 、 $3.4 \pm 1.4\%$ 、 $4.9 \pm 1.7\%$ であった。12M 群の非癌部は $6.0 \pm 0.9\%$ で発癌部は

Fig. 5 L.I. at antral portion of granular stomach



* : mean L.I. of normal epithelium in control group
 ** : (v.s. normal epithelium) : $P < 0.001$
 *** : $P < 0.001$

Fig. 6 L.I. at fundic portion of granular stomach



* : mean L.I. of normal epithelium in control group
 ** (v.s. normal epithelium) : $P < 0.05$
 *** (v.s. normal epithelium) : $P < 0.01$
 **** (v.s. normal epithelium) : $P < 0.001$

$17.6 \pm 0.8\%$ と高値であった (Fig. 6)。

次に癌の最も好発部位である上部小腸では正常粘膜上皮の L.I. は $8.7 \pm 0.9\%$ と胃底域の正常粘膜上皮のそれに比較して高値を示した ($p < 0.001$)。2M 群と 4M 群の非癌部はそれぞれ $10.3 \pm 0.8\%$ 、 $11.5 \pm 0.7\%$ を示した。6M 群の非癌部は $12.5 \pm 1.2\%$ 、発癌部は $18.4 \pm 0.4\%$ 、8M 群の非癌部は $12.7 \pm 1.5\%$ 、発癌部は $20.2 \pm 1.5\%$ であった。10M 群の非癌部は $13.2 \pm 1.3\%$ 、発癌部は $20.8 \pm 1.3\%$ 、12M 群の非癌部は $13.8 \pm 0.8\%$ 、発癌部は $21.7 \pm 1.1\%$ と発癌部は他の 2 領域と同様に正常粘膜や同時期の非癌部に比較して高い L.I. 値を示した ($p < 0.001$)。また非癌部は早期より高値を示し経時的な L.I. の上昇も認められた (Fig. 7)。

② 発癌病巣の組織型と L.I.

Fig. 7 L.I. at small intestine

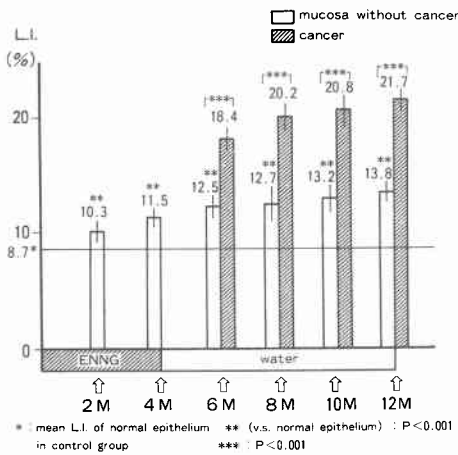


Table 4 Histological types and L.I.

histological types	6M group	8M group	10M group	12M group
differentiated type	18.4±0.3 (n=3)	20.2±1.4 (n=13)	20.7±1.3 (n=14)	21.1±1.8 (n=14)
undifferentiated type	—	—	21.2±0.6 (n=3)	21.1±0.9 (n=3)

Table 5 Depth of invasion and L.I.

depth of invasion	6M group	8M group	10M group	12M group
m,sm	18.4±0.3 (n=3)	19.8±0.8 (n=7)	20.0±1.0 (n=9)	20.7±1.2 (n=6)
≥pm	—	20.6±1.7 (n=6)	21.7±0.8 (n=8)	21.3±1.8 (n=11)

m : mucosal layer
 sm : submucosal layer
 pm : proper muscle layer

* : p<0.01

分化型と低分化型で各群ともに高値を示したがL.I.に差は認めなかった (Table 4).

③ 発癌病巣の深達度とL.I.

粘膜内 (m) と粘膜下組織内 (sm) に比較して固有筋層 (pm) 以上の癌のL.I.は10M群においてはpm以上で有意に高値を示したが (p<0.01) 他の群では有意差は認めなかった (Table 5).

V. 考 察

近年、化学物質を用いた動物実験による発癌方法¹⁰⁾¹¹⁾の開発が目ざましく、種々の動物実験モデルによる癌研究が広く行われるようになった。消化管、特に実験胃癌においては1967年に杉村ら¹²⁾¹³⁾がN-

Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG)を用いてラットやハムスターに高率に胃癌を発生させた。また1972年には栗原ら¹⁴⁾がENNGを用いて短期間でイヌの胃癌発生を成功させている。その後1980年には荻田¹⁵⁾がラットを用いてENNGの濃度と投与期間の検討を行い安定した消化管発癌の実験モデルを確立させるに至った。化学物質による発癌には initiation と promotion の少なくとも2種類の段階が必要とされている¹⁰⁾¹¹⁾。すなわち、正常細胞が発癌物質である initiator により核内の遺伝子の変化を受けそれがDNAの一次構造の変化として固定される段階 (initiation) と、その変化した細胞が長期間種々の要因の影響を受ける段階 (promotion) の2段階を経てはじめて癌細胞と認識されるようになるとされている。

今回、発癌物質 ENNG を用いてラットに消化管癌を発生させ、その発癌過程における細胞動態の検討を行った。ENNG発癌実験は、荻田ら¹⁵⁾の Wistar 系ラットに ENNG 100μg/ml 水溶液を4か月間飲水として連日投与し、その後は水道水にて飼育し、安定した発癌が腺胃および小腸にみられたとの報告に基づいて行った。

細胞動態の解析は bromodeoxyuridine (BrdU) に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色法にて行った。この新しい細胞動態解析法は従来の³H-thymidine による Autoradiography に比べアイソトープを使用せず短期間でDNA合成期細胞を標識でき⁶⁾¹⁶⁾。しかも BrdU と³H-thymidine の双方の標識率はよく相関するという実験的報告も行われている¹⁷⁾。それゆえに最近では腫瘍の増殖活性つまり悪性度を表現する一指標としての BrdU 標識率を用いた解析法が、癌研究を中心として多方面において用いられるようになってきた^{18)~22)}。

今回の ENNG 発癌実験においては、ENNG 投与開始後6か月目で30%、8か月目で70%、10か月目で75%、12か月目では88%と、経過とともに発癌率の上昇を認めた。これは中村ら²³⁾の発癌実験と同様な成績であった。また1匹あたりの発癌個数も経過とともに増加し、平均腫瘍最大径や1個あたりの腫瘍重量でも発癌過程とともに増大が認められた。ENNG 発癌による癌発生部位について諸家の報告をみると、荻田¹⁵⁾は、投与開始後8か月目までにラット腺胃に10例中8例 (80%)、小腸に10例中10例 (100%) の発生をみたと報告し、水口⁸⁾は同様の実験にてラットの幽門輪から10cm 以内の上部小腸にできたものが発生した

全腫瘍の88%を占めていたと報告している。今回の実験でも上部小腸が全体の64%を占め、次いで腺胃の中でも幽門腺領域に32%発生したが胃底腺領域はわずかに4%であり、食道や前胃にはみられなかった。ラットENNG発癌において発生する腫瘍の組織型、分化度について荻田¹⁵⁾は発生腫瘍の90%が未分化型腺癌であったとしているが、中村ら²⁴⁾はENNG高濃度経口投与により上部小腸癌を高率に発生させた結果、そのほとんどが分化型腺癌であったとしている。今回の上部小腸癌もすべて分化型腺癌で低分化型腺癌は発癌過程の後期に腺胃幽門腺領域に発生したのみであった。今回の実験のようにENNGを飲料水として投与した場合、発癌部位が腺胃および上部小腸に限られていたということは、これらの部位でENNGが吸収されやすいことによるのか、胆汁などの影響によるのか、あるいは物理的に食道や前胃に比べ腺胃や小腸の方がENNG溶液の貯留時間が長く、したがってこれらの粘膜上皮が発癌物質の作用を受けやすいということによるのか明らかなことはこれからの研究を待たなければならない。このような発癌部位の特異性に関して、生化学的な面から研究を行った小堀ら²⁵⁾は、ラットにMNNGを投与した実験でラットの腺胃以下の細胞内に多く存在するthiolがMNNGを活性化し、この部位に腺癌を発生させると報告している。発癌物質を投与していない正常ラットにおいて、腺胃幽門腺領域と胃底腺領域さらに上部小腸の3領域に分けて正常粘膜上皮のBrdU標識率(L.I.)を比較すると、好発部位である幽門腺領域と上部小腸においては、胃底腺領域におけるL.I.よりも有意に高いL.I.を示した。さらに、ENNGを投与し経時的にこの3領域の非癌部の粘膜上皮のL.I.をみると各領域とも経時的なL.I.の上昇がみられ、発癌物質ENNGは粘膜上皮細胞のS期細胞の増加に影響を及ぼしていることがわかる。このように、ENNG発癌において腺胃幽門腺と上部小腸に発癌が多くみられるのは、これらの粘膜上皮のDNA合成能が、発癌物質にさらされる以前より活発であることも一因と考えられる。そして発癌の時期においてもより高いDNA合成能を示す上部小腸の方が腺胃幽門腺領域よりも比較的早い時期から発癌が認められていることから、発癌過程における粘膜上皮細胞のDNA合成能の変化が発癌に深く関わっていると思われる。

さて発癌病巣のL.I.は、正常上皮や非癌部粘膜上皮のL.I.よりも有意に高く、腺胃幽門腺癌や上部小腸癌

では、経時的なL.I.の上昇傾向もみられた。これは組織学的深達度がpm以上の癌のL.I.はm, smの癌のL.I.よりやや高く、発癌過程後期においてはpm以上の癌が多くなっていくためと考えられる。一方、組織型や分化度とL.I.の間には特に関連を認めなかったが、癌の分化度とL.I.について検討を行っている報告をみても、両者に関連がないとするものもあれば²⁶⁾²⁷⁾、低分化なものの方がL.I.が高いとする報告もあり²⁸⁾、今後さらに検討を重ねていく必要があると思われる。BrdUによる解析法を用いて発癌物質による発癌の過程をDNA合成能のレベルで検討した研究はみられず、今回の実験では発癌の好発部位とされる消化管は発癌物質の作用を受けていない正常粘膜上皮でもはじめからS期細胞の出現率が高いということがわかり、発癌と消化管粘膜上皮のS期細胞出現率の変化に深い関連が示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究に御指導、御校閲を賜った泉雄 勝教授、ならびに終始御指導御協力いただいた群馬大学医療短期大学倉茂達徳教授に深謝いたします。さらに終始研究に御協力いただいた第2外科教室消化器グループ、ならびに群馬大学医療短期大学倉茂研究室の各位に感謝いたします。

本文の要旨は、第47, 48回日本癌学会総会および第27回日本癌治療学会総会において発表した。

文 献

- 1) Bleibeig H, Galand P: In vitro autoradiographic determination of cell kinetic parameters in adenocarcinomas and adjacent healthy mucosa of the human colon and rectum. *Cancer Res* 36: 325-328, 1976
- 2) Sasaki K: Measurement of tritiated thymidine labeling index by incubation in vitro of surgically removed cervical cancer. *Gann* 68: 307-313, 1977
- 3) Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-475, 1982
- 4) 佐々木巧典, 荻野哲郎, 村上知之ほか: モノクローナル抗BrdUrd抗体を利用した人癌組織の標識率測定法. *病理と臨* 3: 565-567, 1985
- 5) 多田利彦, 児玉哲郎, 渡辺 昌ほか: BrdUモノクローナル抗体を用いた細胞動態解析法の基礎的検討とその臨床応用. *医のあゆみ* 135: 510-513, 1985
- 6) 立松正衛, 津田洋幸, 伊東信行: BrdUによるDNAラベリング法. *トキシコロジーフォーラム* 11: 269-278, 1988

- 7) Schutte B, Reynders MMJ, Bosman FT et al: Effect of tissue fixation on antibromodeoxyuridine immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 35: 1343-1345, 1987
- 8) 水口滋之: ラット ENNG 発癌に及ぼす各種免疫賦活物質の影響に関する研究. *北関東医* 38: 41-53, 1988
- 9) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約, 改訂第11版, 金原出版, 東京, 1985
- 10) 伊東信行, 立松正衛: 化学的発癌の寄与するもの一癌の疾患モデルとは何か一. *蛋・核・酵* 23: 469-479, 1978
- 11) 伊東信行, 広瀬雅雄: 発癌と動物実験. *実験医* 2: 47-51, 1984
- 12) Sugimura T, Fujimura S: Tumor production in glandular stomach of rat by N-Methyl-N'-Nitro-N-N. trosoguanidine. *Nature* 216: 943-944, 1967
- 13) Sugimura T, Fujimura S, Kogure K et al: Production of adenocarcinomas in glandular stomach of experimental animals by N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. *Gann Monograph* 8: 157-196, 1969
- 14) 栗原 稔, 炭田正孝, 泉 嗣彦ほか: N-Ethyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine によるイヌ実験胃癌の短期発生. *医のあゆみ* 84: 132-133, 1973
- 15) 萩田征美: ENNG による消化管発癌と代謝拮抗剤による発癌抑制効果の実験的研究. *日外会誌* 81: 1437-1446, 1980
- 16) Hoshino T, Nagashima T, Cho KG et al: S-phase fraction of human brain tumors in situ measured by uptake of bromodeoxyuridine. *Int J Cancer* 38: 369-374, 1986
- 17) Kikuyama S, Kubota T, Watanabe M et al: Cell kinetic analysis of human tumor xenografts using antibromodeoxyuridine monoclonal antibody. *Jpn J Surg* 17: 28-32, 1987
- 18) 佐々木功典, 村上知之, 高橋 学: 抗 BrdUrd 抗体を用いた増殖動態の解析. *癌と化療* 16: 2338-2344, 1989
- 19) 宮本 宏, 磯部 宏, 伊東正美ほか: 抗 Bromodeoxyuridine 抗体を用いた制癌剤の細胞動態におよぼす影響. *癌と化療* 13: 3541-3545, 1986
- 20) 竹下正昭, 蒔田富士雄, 泉雄 勝ほか: 胃癌患者のリンパ球幼若化反応, 特に BrdU モノクローナル抗体を用いた検討. *日外会誌* 90: 1283, 1989
- 21) 菊山成博: Bromodeoxyuridine および免疫組織化学的手法を用いたヒト癌細胞動態の基礎的, 臨床的研究. *日外会誌* 90: 355-363, 1989
- 22) 関原 正, 鍋谷欣市, 若岡建夫ほか: 抗 BedU 抗 CEA 抗体を用いた胃癌の動態的および機能的活性の免疫組織化学的評価. *日外会誌* 90: 2051, 1989
- 23) 中村正治, 竹下正昭, 泉雄 勝ほか: RBS (Rice Bran Saccharide) の ENNG 誘発消化管癌ラットに及ぼす効果. *Biotherapy* 3: 343-347, 1989
- 24) 中村隆昭, 松山陸司, 岸本英三: 高濃度 N-エチル-N'-ニトログアニジン (ENNG) 経口投与によるラット上部小腸癌について. *日癌会33回総会記* 33: 55, 1974
- 25) 小堀鷗一郎, 昌子正実, 森岡恭彦ほか: MNNG 経口投与による消化管癌発生部位に関する生化学的研究. *日消病会誌* 81: 277, 1984
- 26) 米村 豊, 杉山和夫, 鎌田 徹ほか: DNA Ploidy Pattern, 増殖活性からみた胃癌の悪性度. *日外会誌* 89: 1175-1179, 1988
- 27) 鎌田 徹, 米村 豊, 杉山和夫ほか: 胃癌における BrdU 標識率の検討. *日外会誌* 90: 1718-1721, 1989
- 28) 赤池 信, 学泉博義, 南出純二ほか: 食道癌における抗 BrdU モノクローナル抗体の臨床的応用. *外科治療* 57: 700-701, 1987

**Cell Kinetic Studies of Gastrointestinal Mucosa in Rats
with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
-induced Carcinoma**

Fujio Makita

Second Department of Surgery, School of Medicine, Gunma University

(Director: Prof. Masaru Izuo)

Cell kinetic analysis on gastrointestinal mucosa in Wistar male rats with ENNG-induced carcinoma was studied using anti-bromodeoxyuridine (BrdU) monoclonal antibody. The normal mucosa in rats without ENNG administration, the mucosa without tumor and carcinogenetic lesion in rats with ENNG administration were studied. The results were as follows: 1) It was found that the BrdU labeling index (L.I.) in the gastrointestinal mucosa was elevated and the number of S-phase cell was increased by the carcinogen ENNG according to the

carcinogenetic process. 2) In the normal mucosa, the L.I. at small intestine was 8.7%, at antral portion of glandular stomach 6.6% and at fundic portion of glandular stomach 1.9%. Thus the L.I. in most carcinogenetic parts was relatively higher. 3) The L.I. in the carcinogenetic lesion (16.8~23.7%) was significantly higher than that in the normal mucosa or mucosa without carcinogenesis ($p<0.001$). 4) The histological types and differentiative grades of the carcinogenetic lesions were not correlated with the L.I. of those tissues. But the L.I. of the tumors with invasion to the proper muscle or deeper was slightly higher than those confined to the mucosal or submucosal layer. The present studies suggest that carcinogenesis was highly correlated with the changes in the rate of S-phase cells in the gastrointestinal mucosa.

Reprint requests: Fujio Makita Second Department of Surgery, School of Medicine, Gunma University
3-39-15 Showamachi, Maebashi, 371 JAPAN
