

小腸の発癌抵抗性に関する実験的研究

金沢大学第2外科

黒 阪 慶 幸

小腸癌の発生に関し、その臓器特異性を解明する目的で、回腸を遠位結腸間に間置した Wistar 系雄性ラットを作製し、術後2週目より MNNG を2.5mg/day, 14日間注腸投与した後、10週、20週、30週、40週目に犠牲死させ腫瘍発生率および粘膜の細胞動態を検索した。同様な方法で生食注腸群を設けた。細胞動態の解析は double labeling method により行った。癌腫発生率は生食注腸群0%, MNNG注腸群では10週0%, 20週54.5%, 30週35.0%, 40週52.6%であった。部位別に癌腫発生率をみると、間置回腸は3.3%と遠位結腸の38.3%に比べ有意に低く、また1匹あたりの発生した癌腫個数も間置回腸が0.03個と遠位結腸の0.70個に比べ有意に低率であった。MNNG注腸群の細胞脱落時間は遠位結腸の91.4±21.1時間に対し、間置回腸では40.6±8.2時間と有意に短縮していた。以上より小腸粘膜上皮の速い更新性が、小腸が持つ強い発癌抵抗性の主な因子である可能性が示唆された。

Key words: cacinogen-resistance mechanism in the small intestinal tracts, interposed intestinal segment, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, double labeling method, migration time of the intestinal epithelial cells

はじめに

原発性小腸悪性腫瘍はまれな疾患であり、他の消化管の癌に比べその発生頻度は極めて低く、剖検例の0.05~0.5%、全消化管悪性腫瘍の0.5~6.0%を占めるに過ぎない¹⁾²⁾。また、小腸は大腸に比べ大きな表面積を有しているのに、悪性腫瘍の発生頻度は小腸が大腸の1/20~1/40と極めて低い³⁾。このように原発性小腸悪性腫瘍が少ない理由として、小腸の内的環境因子の特性が推察されてきた⁴⁾⁵⁾。

今回、小腸は他の消化管に比べなぜ癌の発生が少ないのかという小腸の臓器特異性を解明する目的で以下の実験的研究を行った。小腸を大腸と同一の環境下に置き内的環境因子を揃えるためラットを用い回腸を遠位結腸間に間置したモデルを作製した後、経肛門的に N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) を投与し間置回腸粘膜と遠位結腸粘膜の MNNG に対する感受性、すなわち腫瘍誘発性を経時的に比較検討した。さらに腸粘膜上皮細胞の細胞動態の相違を検索するため、Iododeoxyuridine (IdU), Bromodeoxyuridine (BrdU) による double labeling method を用い間置回腸と遠位結腸の細胞動態を免疫組織学的に解析

した。

実験方法

1. 実験動物

7週齢、体重約200gr. の Wistar 系雄性ラットを使用した。ラットの飼育は、室温23℃、湿度60%、11時間照明の条件下で行い、ラット用固形飼料 Charles River Formula-1 (日本 Charles River 社製) と水道水を自由に摂取できるようにした。

2. 実験モデルの作製法

ラットを手術前24時間絶食にした後、ジエチルエーテルを用い全身麻酔下に以下の手術を行った。約7cmの下腹部正中切開で開腹し、遠位結腸(結腸屈曲部~肛門)⁶⁾を肛門側より5cmで離断し、その間に回腸末端より口側10cmの部位より切離した3~4cmの回腸を遊離し有茎移植した。回腸と遠位結腸、離断回腸間の腸管吻合は7-0絹糸を用い、全層連続一層縫合にて端々吻合を行った。生食で十分に腹腔内を洗浄後、4-0絹糸で閉腹した。術後は術当日より水道水を与え、抗生物質などの投与は行わず24時間後より固形飼料を自由に摂取させた (Fig. 1)。

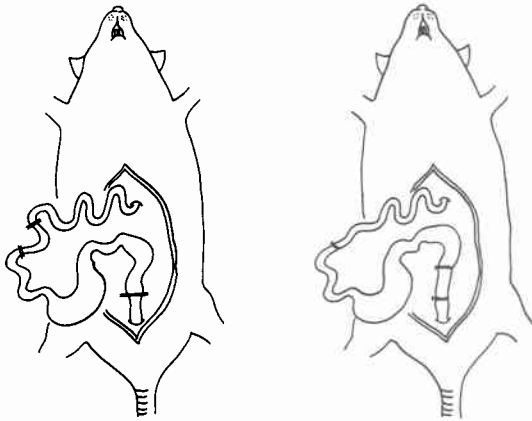
3. 実験モデル群

以下の実験モデル群を設けた。

I群; 生食注腸群 有効動物数16匹

術後40週目に屠殺した。

Fig. 1 Operative procedure. A segment of the ileum was interposed in the distal colon.



II群；MNNG注腸群 有効動物数60匹
術後10, 20, 30, 40週目に屠殺し下記の4群を作った。

- ① 10週群 有効動物数10匹
- ② 20週群 有効動物数11匹
- ③ 30週群 有効動物数20匹
- ④ 40週群 有効動物数19匹

4. MNNGの投与方法

MNNG (Aldrich Chemical Co. Inc. Milwaukee 社製) は、投与1時間前に遮光瓶中で蒸留水に溶解し0.25% (MNNG 2.5mg/ml) 水溶液とし、II群のラットに術後2週目より14日間1日1回1mlを6Fr. アトムチューブを用いチューブの先端が確実に回腸間置部を越え結腸屈曲部の近くに達するよう肛門縁より10cmまで挿入しゆっくり注腸投与した。MNNGの総投与量は1匹当り35mgである。

I群のラットには上記と同様な方法で生食を注腸投与した。

5. 形態学的検索方法

I群、II群のラットは、前述したごとく経時的に屠殺した後、剖検し全腸管を摘出した。腸管は腸間膜側に沿い切開を加えて肉眼的に観察し腫瘍の発生個数、占居部位および肉眼形態を記録した。その後、間置回腸を含む遠位結腸と回腸端々吻合部より5cm口側の回腸を切り出しホルマリンで固定しパラフィン包埋後H-E染色にて病理組織学的に検索した。発生腫瘍の形態分類および組織学的判定は、大腸癌取扱い規約⁷⁾に準じて行った。

6. IdU, BrdUを用いた double labeling methodに

よる細胞動態の解析

Shibui ら⁹⁾の方法に準じ、IdUとBrdUを用い腸粘膜上皮細胞の細胞動態を解析した。屠殺3時間前にIdU (20mg/kg)を、さらに2時間後にBrdU (20mg/kg)をラット腹腔内に注入し double labelingを行った。ホルマリン固定後の摘出標本を用いて第1日目にBrdUのみを認識するBr-3を用いAvidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC)法⁹⁾により、さらに第2日目にBrdUとIdUの両者を認識するanti-BrdU Mabを用いてAlkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase (APAAP)法¹⁰⁾により免疫組織学的二重染色を施行した (Fig. 2)。

BrdUを取り込んだ細胞核は1日目のABC法により淡褐色に染められ、IdUまたはBrdUを取り込んだ細胞核は2日目にAPAAP法により青く染色される。したがって細胞核が青色のみで染色された細胞はIdU投与後BrdUが投与されるまでの2時間の間にIdUを取り込んだ単独標識細胞 (Nuclei stained blue only)であり、細胞核が青褐色に染色された細胞はBrdU投与後にIdUまたはBrdUを取り込んだ標識細胞 (Nuclei stained blue)と考えられ両者を識別することが可能であった (Fig. 3)。

細胞動態に関する各因子は以下のように求めた。腺窩底より腺窩最上部までの距離を腺窩の深さ (Crypt depth)、腺窩底より最高位にあるBrdU標識細胞の腺窩底よりの距離を増殖帯の高さとし腺窩の深さとの比

Fig. 2 Double labeling method

1. intraperitoneal injection(ip) of 20mg/kg 3 hours before sacrifice
2. ip of 20mg/kg BrdU 1 hour before sacrifice
3. fixed in 10% formaline
4. deparaffinized
5. denatured with 2N HCL for 30 minutes
6. rinsed with 0.1M Na₂B₄O₇(pH 8.5) for 10 minutes
7. immersed in methanol containing 0.3% H₂O₂
8. rinsed in PBS
9. 1:50 normal goat serum for 30 minutes
10. 1:200 BR-3(CALTAG Lab. San Francisco,CA) for 2 hours
11. rinsed in PBS
12. 1:50 biotinylated goat anti-mouse IgG(TAGO,Burlingame,CA)
13. rinsed in PBS
14. ABC solution(Vector,Burlingame,CA) for 30 minutes
15. rinsed in TBS
16. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DOTTIE,Tokyo,Japan)
17. rinsed in TBS
18. left overnight in 5.0% acetic acid to inactivate Br-3
19. rinsed in TBS
20. 1:50 anti-BrdU Mab.(Becton Dickinson,Mountain View,CA) for 2 hours
21. rinsed in TBS
22. 1:50 rabbit anti-mouse IgG(DAKOPATTS,Denmark) for 1 hour
23. rinsed in TBS
24. 1:10 APAAP complex(DAKOPATTS,Denmark) for 30 minutes
25. rinsed in TBS
26. substrate solution

| | |
|--------------------------|--------|
| 0.1M Tris buffer(pH 8.6) | 10ml |
| Naphtol-AS/MX phosphate* | 2mg |
| Fast blue BB salt* | 10mg |
| Levamisole* | 0.24mg |
- (* Sigma Chemical Co.,London,England)
27. embedded in glycerol geratin

Fig. 3 Double labeling stain. (Interposed ileum, $\times 150$)

Labeled cells were observed in the lower third of the crypt. Nuclei looked light tone, actually stained blue, were labeled by IdU only. Nuclei looked dark tone, actually stained blue and brown, were labeled by BrdU or IdU.



(G-zone ratio)を求めた。腸粘膜上皮細胞の腺窩底より腺窩最上部までの遊走時間 Migration time (MIG.)は、IdU と BrdU の投与間隔 Δt (本実験では2時間)の間に細胞が遊走したと考えられる距離 d ($= \text{IdU top} - \text{BrdU top}$)を計測し、腺窩の深さを d で割り Δt をかけ算定した。Labeling index (L.I)は、BrdU の標識率により求めた。また DNA 合成時間 S-phase transit time (T_s), 細胞世代時間 Turnover time (T_o)は、 Δt 間の IdU と BrdU の標識率の差をもとに算定し求めた。上記6種のパラメーターを、ラット1匹ごとに回腸、間置回腸、遠位結腸の3部位で完全な形で観察できる10腺窩につき鏡検にて求めその平均値で表わした (Fig. 4).

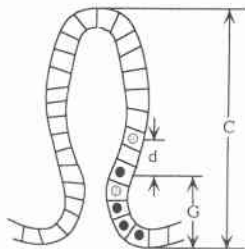
7. 体重測定法

体重測定は各群とともに術後4週間は1週ごとに、その後の4週間は2週ごとに、以後は4週ごとに行い、数値は平均値で示した。

8. 統計学的検定法

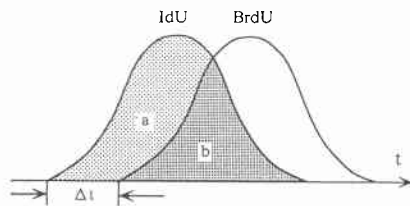
成績は Mean \pm S.D. で表わし、百分率の検定は χ^2 test を、また平均値の検定は Student' t-test を行い、

Fig. 4 The parameters of epithelial cell kinetics.



Cells stained for IdU only. (Nuclei stained Blue only.)

Cells stained for IdU. (Nuclei stained Blue.)



a : Cells stained for IdU only. (Nuclei stained Blue only.)

b : Cells stained for IdU. (Nuclei stained Blue.)

C = Crypt depth (μm)

G = G - zone depth (μm)

d = IdU top - BrdU top (μm)

Mig. : Migration time

$$\text{Mig.} = C / d \times \Delta t$$

($\Delta t = 2 \text{ hr.}$)

L.I. : Labeling index

$$L.I = \frac{\text{cells stained for BrdU}}{\text{crypt cells}} \times 100$$

Ts. : S - phase transit time

$$T_s = \frac{a + b}{a} \times \Delta t$$

($\Delta t = 2 \text{ hr.}$)

To. : Turn over time

$$T_o = T_s / L.I$$

($T_o \hat{=} \text{cell generation time.}$)

p<0.05を有意差ありと判定した。

結果

1. 体重変化

手術時から生食注腸群と MNNG 注腸群の各群間の体重の推移は、最長40週の屠殺時まで全経過を通じ有

意の差を認めなかった (Fig. 5).

2. 腫瘍発生率

すべてのラットで近位結腸(盲腸~結腸屈曲部)に腫瘍の発生はみられなかった。

生食注腸40週群の16匹と MNNG 注腸10週群の10匹には腫瘍の発生はみられなかった。腫瘍の発生は MNNG 注腸20週群以降でみられ、20週群で11匹中6匹(54.5%)、30週群で20匹中12匹(60.0%)、40週群で19匹中13匹(68.4%)に認めた。癌腫の発生は20週群で11匹中6匹(54.5%)、30週群で20匹中7匹(35.0%)、40週群で19匹中10匹(52.6%)に認めた。腺腫の発生は20週群で11匹中3匹(27.3%)、30週群で20匹中9匹(45.0%)、40週群で19匹中7匹(36.8%)であった。また肉腫の発生は40週群19匹中2匹(10.5%)に認めた (Table 1).

MNNG 注腸群で間置回腸と遠位結腸の部位別に腫瘍、癌腫の発生率を比較すると、全体で遠位結腸の腫瘍発生率が60匹中31匹(51.7%)であったのに対し、間置回腸では60匹中2匹(3.3%)と間置回腸の腫瘍発生率は有意に低率であった(p<0.01)。また、癌腫の発生率においても遠位結腸の60匹中23匹(38.3%)に対し、間置回腸では60匹中2匹(3.3%)と間置回腸の癌腫発生率は有意に低率であった(p<0.01)。20週、30週、40週の各群別にみても遠位結腸に比べ間置回腸

Fig. 5 Effect of MNNG instillation on body weight. There is no significant difference in weight change between both groups.

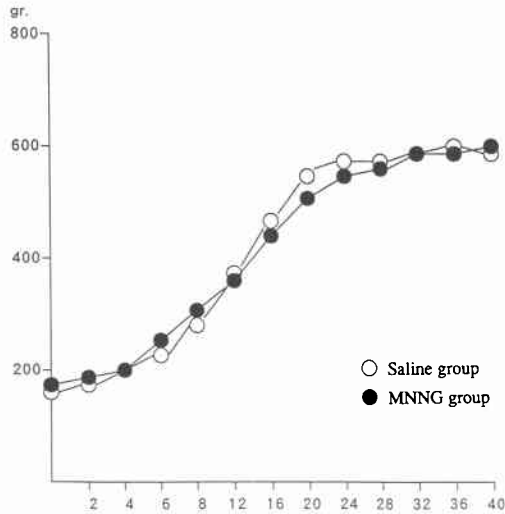


Table 1 Tumor incidences in this study

| Groups | NO. of rats | NO.(%) of rats with neoplasms | NO.(%) of rats with carcinomas | NO.(%) of rats with adenomas | NO.(%) of rats with sarcomas |
|------------|-------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Saline 40w | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MNNG 10w | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20w | 11 | 6(54.5) | 6(54.5) | 3(27.3) | 0 |
| 30w | 20 | 12(60.0) | 7(35.0) | 9(45.0) | 0 |
| 40w | 19 | 13(68.4) | 10(52.6) | 7(36.8) | 2(10.5) |

Table 2 Tumor incidences in MNNG treated group (comparison between Interposed Ileum and Distal Colon)

| Groups | NO. of rats | NO.(%) of rats with neoplasms | | NO.(%) of rats with carcinomas | |
|----------|-------------|-------------------------------|--------------|--------------------------------|--------------|
| | | Interposed Ileum | Distal Colon | Interposed Ileum | Distal Colon |
| MNNG 10w | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20w | 11 | 1(9.1) | 6(54.5) | 1(9.1) | 6(54.5) |
| 30w | 20 | 0 | 12(60.0) | 0 | 7(35.5) |
| 40w | 19 | 1(5.3) | 13(68.4) | 1(5.3) | 10(52.6) |
| Total | 60 | 2(3.3) | 31(51.7) | 2(3.3) | 23(38.3) |

☆ p<0.05 ★ p<0.01

では腫瘍、癌腫の発生率は有意に低率であった(Table 2).

3. 腫瘍発生個数

MNNG 注腸群において発生した1匹あたりの腫瘍個数は10週群0個, 20週群11個(1.00個/匹), 30週群18個(0.90個/匹), 40週群34個(1.79個/匹)の計63個(1.05個/匹)であった。癌腫個数は20週群9個(0.82個/匹), 30週群12個(0.60個/匹), 40週群23個(1.21個/匹)の計44個(0.73個/匹)であった。腺腫個数は20週群3個(0.27個/匹), 30週群10個(0.50個/匹), 40週群12個(0.63個/匹)の計25個(0.42個/匹)であった。肉腫個数は40週群で2個(0.11個/匹)であった(Table 3).

MNNG 注腸群において間置回腸と遠位結腸で1匹あたりの腫瘍個数を比較すると、遠位結腸で1.02個/匹であったのに対し、間置回腸では0.03個/匹と間置回腸で有意に少なかった(p<0.01)。また癌腫個数においても、遠位結腸で0.70個/匹であったのに対し、間置回腸では0.03個/匹と間置回腸で有意に低値であった(p<0.01)。20週, 30週, 40週の各群別にみても1匹あたりの発生した腫瘍および癌腫個数は遠位結腸に比べ、間置回腸では有意に少なかった(p<0.01)(Table 4).

MNNG 注腸群において部位別、組織型別に腫瘍個数を比較すると、腺癌の発生は遠位結腸で42個であっ

たのに対し間置回腸では2個と間置回腸で有意に少なかった(p<0.01)。腺腫と肉腫は間置回腸には発生せずすべて遠位結腸で発生していた。全組織型の腫瘍個数をみても、遠位結腸では69個であったのに対し間置回腸では2個と間置回腸で有意に少なかった(p<0.01)。遠位結腸に発生した腫瘍個数を部位別にみると、間置回腸の口側で39個、肛門側で30個であり、各組織型別にみても間置回腸の口側と肛門側の遠位結腸で有意の差はみられなかった(Table 5).

4. IdU, BrdUを用いた Double labeling 法による細胞動態の解析結果

有茎移植した間置回腸、回腸端々吻合部より5cm口側の回腸および遠位結腸の腸粘膜上皮細胞の細胞動態を生食注腸40週群を対照群としてMNNG注腸各群と比較し以下の結果を得た。

回腸端々吻合部より5cm口側の回腸(以下、回腸)と有茎移植した間置回腸の比較では、腺窩の深さ(Crypt depth)がすべての群で回腸より間置回腸で有意に増大し粘膜上皮の過形成性変化を認めた。最も早く癌腫の発生を見たMNNG注腸20週群において、間置回腸で回腸に比べ増殖帯比(G-zone ratio), L.Iの有意な増加が見られ、また腸粘膜上皮細胞の腺窩底より移動し腺窩最上部から脱落するまでの遊走時間(MIG.)では回腸の57.7±13.4時間に対し間置回腸で35.5±4.3時間と有意に間置回腸のMIG.は短縮して

Table 3 Number of tumors per rats in MNNG treated group

| Groups | NO. of rats | NO. of neoplasms (per rat) | NO. of carcinomas (per rat) | NO. of adenomas (per rat) | NO. of sarcomas (per rat) |
|----------|-------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| MNNG 10w | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20w | 11 | 11(1.00) | 9(0.82) | 3(0.27) | 0 |
| 30w | 20 | 18(0.90) | 12(0.60) | 10(0.50) | 0 |
| 40w | 19 | 34(1.79) | 23(1.21) | 12(0.63) | 2(0.11) |

Table 4 Number of tumors per rats in MNNG treated group (comparison between Interposed Ileum and Distal Colon)

| Groups | NO. of neoplasms | NO of neoplasms(per rat) | | NO. of carcinomas | NO. of carcinomas(per rat) | |
|----------|------------------|--------------------------|----------------|-------------------|----------------------------|----------------|
| | | Interposed Ileum | Distal Colon | | Interposed Ileum | Distal Colon |
| MNNG 10w | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20w | 11(1.00) | 1(0.09) | ← ★ → 10(0.91) | 9(0.82) | 1(0.09) | ← ★ → 8(0.73) |
| 30w | 18(1.90) | 0 | 18(0.90) | 12(0.60) | 0 | 12(0.60) |
| 40w | 34(1.79) | 1(0.05) | ← ★ → 33(1.74) | 23(1.21) | 1(0.05) | ← ★ → 22(1.16) |
| Total | 63(1.05) | 2(0.03) | ← ★ → 61(1.02) | 44(0.73) | 2(0.03) | ← ★ → 42(0.70) |

★ p<0.01

Table 5 Number of neoplastic tumors according to histological type (comparison between Interposed Ileum and Distal Colon)

| Locate | histological type | | | Total |
|------------------|-------------------|----------|----------|-------|
| | adenocarcinomas | adenomas | sarcomas | |
| Interposed Ileum | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Distal Colon | 42★ | 25 | 2 | 69★ |
| Oral side | 24 | 14 | 1 | 39 |
| anal side | 18 | 11 | 1 | 30 |

★ p<0.01

いた(p<0.01). MNNG 注腸30週群では、増殖帯比が回腸に比べ間置回腸で有意に高値であった。MNNG 注腸群全体と比較すると、回腸に対し間置回腸では腺

窩の深さ、増殖帯比と L.I の有意な増加、MIG. と細胞の世代時間である To. の有意な短縮を認めた (Table 6).

間置回腸と遠位結腸の比較では、腺窩の深さはいずれの群も間置回腸が遠位結腸より高値であったが、MNNG 注腸20週群を除き各群で両部位の増殖帯比に有意の差は認めなかった。各群ともに間置回腸の MIG. は遠位結腸に比べ有意に短く、特に MNNG 注腸群では両部位の MIG. の差は生食注腸群の差に対しさらに有意となった(p<0.01). MNNG 注腸群全体の MIG. をみると、遠位結腸の91.4±21.1時間に対し間置回腸では40.6±8.2時間と間置回腸の MIG. は極めて速いものであった(p<0.01). MNNG 注腸群全体で DNA 合成時間(Ts.)をみると、間置回腸の10.2±1.0

Table 6 Cell kinetic results by Double labeling method (Comparison between Ileum and Interposed Ileum)

| | locate | Crypt depth | G-zone ratio | MIG. | L.I | Ts. | To. |
|------------|--------|-------------|--------------|-----------|----------|----------|------------|
| Saline 40w | I | 562.3± 87.8 | 0.21±0.03 | 63.5± 8.0 | 9.1±1.4 | 9.4±1.1 | 107.4±18.1 |
| | II | 627.8± 81.9 | 0.23±0.03 | 52.4± 9.8 | 10.5±2.5 | 9.9±1.1 | 100.4±25.1 |
| MNNG 10w | I | 496.8± 40.8 | 0.20±0.01 | 45.1± 5.2 | 8.0±0.6 | 10.8±2.2 | 141.8±20.5 |
| | II | 599.2± 62.0 | 0.21±0.02 | 45.1±11.2 | 7.9±0.6 | 9.8±0.8 | 122.1± 9.2 |
| 20w | I | 481.9± 79.4 | 0.19±0.02 | 57.7±13.4 | 7.8±0.9 | 10.3±1.2 | 135.2±27.0 |
| | II | 590.1±108.3 | 0.22±0.03 | 35.5± 4.3 | 8.8±0.8 | 10.3±1.1 | 117.5±13.5 |
| 30w | I | 455.3± 31.8 | 0.17±0.04 | 46.1± 9.6 | 8.7±1.7 | 10.6±0.9 | 127.7±33.7 |
| | II | 525.3± 40.6 | 0.21±0.02 | 42.2± 8.2 | 9.0±1.7 | 10.0±0.8 | 113.9±16.9 |
| 40w | I | 430.4± 37.0 | 0.18±0.03 | 43.0± 9.2 | 7.1±2.2 | 9.9±1.2 | 149.9±33.8 |
| | II | 573.3± 79.2 | 0.21±0.01 | 42.2± 4.2 | 8.3±1.6 | 10.7±0.7 | 131.9±20.7 |
| 10~40w | I | 465.6± 59.2 | 0.18±0.03 | 48.9±12.2 | 8.0±1.6 | 10.4±1.4 | 137.1±31.4 |
| | II | 568.1± 85.2 | 0.21±0.02 | 40.6± 8.2 | 8.6±1.4 | 10.2±1.0 | 120.1±17.4 |

I; Ileum from oral side, II; Interposed Ileum ★ p<0.05 ☆ p<0.01

Table 7 Cell kinetic results by Double labeling method (Comparison between Interposed Ileum and Distal Colon)

| | locate | Crypt depth | G-zone ratio | MIG. | L.I | Ts. | To. |
|------------|--------|-------------|--------------|------------|----------|----------|------------|
| Saline 40w | II | 627.8± 81.9 | 0.23±0.03 | 52.4± 9.8 | 10.5±2.5 | 9.9±1.1 | 100.4±25.1 |
| | DC | 317.1± 89.6 | 0.21±0.04 | 103.8±16.9 | 7.9±0.9 | 9.4±0.6 | 123.5±16.0 |
| MNNG 10w | II | 599.2± 62.0 | 0.21±0.02 | 45.1±11.2 | 7.9±0.6 | 9.8±0.8 | 122.1± 9.2 |
| | DC | 312.0± 23.2 | 0.24±0.02 | 83.1±17.9 | 8.5±2.8 | 9.1±0.9 | 121.3±25.8 |
| 20w | II | 590.1±108.3 | 0.22±0.03 | 35.5± 4.3 | 8.8±0.8 | 10.3±1.1 | 117.5±13.5 |
| | DC | 284.9± 30.0 | 0.18±0.03 | 95.9±24.1 | 7.9±1.0 | 9.0±0.6 | 116.9±14.0 |
| 30w | II | 525.3± 40.6 | 0.21±0.02 | 42.2± 8.2 | 9.0±1.7 | 10.0±0.8 | 113.9±16.9 |
| | DC | 270.9± 23.7 | 0.19±0.05 | 91.7±20.9 | 8.1±1.1 | 9.3±0.7 | 116.3±11.6 |
| 40w | II | 573.3± 79.2 | 0.21±0.01 | 42.2± 4.2 | 8.3±1.6 | 10.7±0.7 | 131.9±20.7 |
| | DC | 279.7± 48.5 | 0.22±0.07 | 91.1±13.8 | 7.6±0.9 | 8.5±1.2 | 112.6±19.8 |
| 10~40w | II | 573.3± 86.8 | 0.21±0.02 | 40.6± 8.2 | 8.6±1.4 | 10.2±1.0 | 120.1±17.4 |
| | DC | 279.7± 53.1 | 0.20±0.05 | 91.4±21.1 | 8.0±1.5 | 9.0±0.9 | 116.6±17.8 |

II; Interposed Ileum, DC; Distal Colon ★ p<0.05 ☆ p<0.01

Table 8 Transitional changes of the Migration time (MIG.) (Comparison between Interposed Ileum and Distal Colon)

| | Interposed Ileum | Distal Colon |
|------------|------------------|--------------|
| Saline 40w | 52.4±9.8 | 103.8±16.9 |
| MNNG 10w | 45.1±11.2 | 83.1±17.9 |
| 20w | 35.5±4.3 | 95.9±24.1 |
| 30w | 42.2±8.2 | 91.7±20.9 |
| 40w | 42.2±4.2 | 91.1±13.8 |

★ p<0.05 ☆ p<0.01

時間に対し遠位結腸では9.0±0.9時間と有意に短縮していた (p<0.01).

L.I., To. では、間置回腸と遠位結腸に有意差は認めなかった (Table 7).

間置回腸と遠位結腸で MIG. の推移を経時的に比較してみると、間置回腸では対照群である生食注腸40週群の52.4±9.8時間に対しMNNG注腸20週群で35.5±4.3時間 (p<0.01), 30週群で42.2±8.2時間 (p<0.05), 40週群で42.2±4.2時間 (p<0.05)と10週群を除き20週群以降で MIG. は有意に短縮していた。それに対し、遠位結腸の MIG. は経時的に有意の差は認めなかった (Table 8).

考 察

臨床的に原発性小腸悪性腫瘍を経験することは極めてまれであり、入院患者の0.002~0.008%¹¹⁾といわれている。欧米では剖検例の0.05~0.5%、全消化管悪性腫瘍の0.5~6.0%を占めるにすぎず¹²⁾、本邦でも剖検例の0.23%¹²⁾、全消化管悪性腫瘍の1.5~3.1%¹³⁾と報告されており、原発性小腸悪性腫瘍の発生頻度は著しく低率である。また本邦における小腸悪性腫瘍は非上皮性腫瘍(肉腫)が多く上皮性腫瘍(癌腫)の発生頻度は低いといわれており、原発性小腸癌の頻度は腸管全体の癌腫の0.84~2.9%と報告されている¹³⁾。小腸が全消化管の約75%の長さを持ち良く発達した絨毛により広大な表面積を有しているにも関わらず、小腸悪性腫瘍の発生頻度は大腸の原発性悪性腫瘍の1/20~1/40と低く³⁾、小腸は悪性腫瘍発生に対する強い抵抗性を持っているものと思われる。このように大腸に比べ小腸に悪性腫瘍の発生頻度が少ない理由として、細菌叢が少ないこと、腸内容が液性、アルカリ性であること、その腸内通過時間が速く物理的、化学的刺激が少ないことなど小腸の内的環境因子の特性が考えられてきたが⁴⁾⁵⁾、いまだ推論の域を出ていない。

そこで小腸が持つ強い発癌抵抗性が単に特異な環境因子のみに起因するのではなく、小腸の粘膜上皮細胞自体にも何らかの発癌防御機構があるのではないかと考え小腸と大腸を比較する実験的研究を行った。

Narisawa ら¹⁴⁾はMNNG注腸による実験大腸癌モデルを作製し、胆汁酸が大腸癌の発生に促進的に作用していると報告しており、さらに片山¹⁵⁾は人工肛門を作り、便流を遮断した大腸を作製後、この空置大腸にMNNGと各種胆汁酸を注腸投与し、2次胆汁酸が癌発生促進作用の主体を成すといっている。また2次胆汁酸は肝で生成された1次胆汁酸が、腸内細菌(主に嫌気性菌)により7α脱水酸化反応を受け作られており、発癌に腸内細菌叢が関与していると考えられている。以上より、大腸と小腸の発癌に関する内的環境因子(特に胆汁酸と腸内細菌叢)を揃えるため、ラットを用い回腸を遠位結腸間に間置したモデルを作製した後、経肛門的にMNNGを投与し間置回腸と遠位結腸のMNNGによる腫瘍誘発性を経時的に比較した。

作製したモデルは回腸を結腸間に有茎移植しており、その血流が変化していると考えられ定常状態に復するまでの期間は定かではなく、小腸と大腸の血流の違いが生じる可能性がある。ゆえに、代謝的活性化を必要とせず血流に関係なく接触することにより直接DNAに作用し小腸と大腸で発癌性を示すMNNGを用いるのが適切と考え注腸投与を行った。また今回コントロール群として用いた生食注腸40週群において腫瘍の発生は見られなかった。したがって、吻合操作あるいは胆汁酸の再吸収の主な部位である回腸切除による発癌作用は無視できるものとする。

MNNG注腸群において、間置回腸に発生した腫瘍は20週群と40週群にそれぞれ見られた2個の癌腫のみであったが、遠位結腸では癌腫42個、腺腫25個、肉腫2個の計69個もの腫瘍の発生を認めた。間置回腸の口側と肛門側の遠位結腸で腫瘍発生に差はなく、間置回腸も遠位結腸と同様に発癌刺激を受けていたと考えられるが、MNNGの間置回腸と遠位結腸に対する腫瘍誘発性には著しい有意差を認めた(p<0.01)。これは、今回とほぼ同様な方法でラットを用い結腸間に小腸を移植し、発癌実験を行ったGennaro ら¹⁶⁾とCelik ら¹⁷⁾が報告している移植小腸の低い発癌性に合致する結果であった。間置回腸にみられた癌腫と遠位結腸にみられた癌腫に肉眼形態、組織型、壁深達度などの病理組織学的因子に差異は認められず、間置回腸においても癌腫が発生し定着すれば遠位結腸と同様な過程で増殖

したものと考えられる。以上より、発癌に関する内的環境因子を揃えた条件下においても、小腸は大腸に比べ強い発癌抵抗性を示すことが明らかとなり、小腸が持つ発癌抵抗性は単に特異な環境因子のみに起因するのではなく小腸の粘膜上皮細胞自体が大腸にはない強力な発癌防御機構が存在すると考えられた。

小腸粘膜上皮細胞の発癌防御機構を明らかにするため、Shibuiら⁸⁾が開発した IdU, BrdU の二導標識法による免疫組織学的検索を行い上皮細胞の細胞動態を小腸と大腸と比較解析した。この方法は、IdU と BrdU を一定の間隔を置き投与し細胞内に取り込ませることにより、細胞動態に関する各種のパラメーターを同一個体、同一標本内で容易に求めることが可能な信頼性のある優れた手段である。この方法を用い Shibuiら⁸⁾は5種の人の glioma cell line の S-phase transit time と Potential doubling time を解析し同 cell line の実際の培養による計測値とほぼ同一であったと報告している。

MNNG 注腸群において、対照とした回腸に比べ移植した間置回腸で腺窩の深さ、増殖帯比と L.I の有意な増加と、世代時間 (To.) と細胞の腺窩よりの脱落時間 (MIG.) の有意な短縮を認めた。生食注腸群においても間置回腸の腺窩の深さは増加していたが増殖帯比や他の因子に差は認めず、MNNG 注腸群の間置回腸でみられた変化は、単に Hansonら¹⁸⁾のいう小腸切除後の intestinal adaptation による粘膜の過形成性変化だけによるものとは考えにくい。Coleら¹⁹⁾、Lipkin²⁰⁾、Wiebeckeら²¹⁾はヒトの腺腫や癌、実験腫瘍における初期の変化を増殖帯の拡大や逆転をともなった粘膜の過形成性変化であり、腫瘍の初期病変が粘膜の表層部で観察されるのは過形成性変化とともに分裂能力のある細胞が粘膜表層部に移動定着し異常増殖するためと報告している。MNNG 注腸群の間置回腸でみられた過形成性変化は、明らかな増殖帯の拡大や増殖能の亢進を認めており上記のような発癌過程の初期変化と考えても矛盾しない。間置回腸においても遠位結腸と同じく MNNG 暴露による発癌初期の変化が起きていたにも関わらず遠位結腸に比べ著しく低い発癌率を示した理由として、細胞の腺窩よりの脱落時間 (MIG.) の有意な短縮が関与している可能性が考えられた。

さらに遠位結腸との比較において、間置回腸の MIG. は有意に短く、特に MNNG 注腸群では両部位の MIG. の差は生食注腸群に比べさらに顕著なもの

になった。MNNG 注腸群全体の MIG. では、遠位結腸の 91.4 ± 21.1 時間に対し間置回腸では 40.6 ± 8.2 時間と極めて速いものであった ($p < 0.01$)。遠位結腸の MIG. に関して、オートラジオグラフィにより Rijkeら²²⁾はラットを用い 60~72 時間、Tubouchi²³⁾はマウスを用い $4.48 \mu\text{m/hr}$ (60~70 時間) と報告しており、今回の結果とはほぼ同様なものであった。また MIG. の推移を経時的にみると、間置回腸では対照群である生食注腸群に対し MNNG 群で 20 週群以降の MIG. が有意に短縮していたが、遠位結腸では両群の MIG. に有意な差はみられなかった。以上のように、間置回腸では遠位結腸に比べ、いずれの群あるいは時期においても腺窩よりの細胞脱落時間 MIG. は短縮しており、特に MNNG 群の癌腫発現以降でその差がさらに顕著になるという結果を得た。

藤田²⁴⁾は腸粘膜上皮の細胞交代の形式(運動形式)に関して、腸上皮は発達した細胞間接着装置を持つ密接な細胞群であり、各細胞前後の順序は不変で腺窩底より遊走し、表層部に向かい脱落していく“pipe line system”があり、この性質は非癌粘膜のみならず癌にも認められると述べている。腺窩の増殖帯において異常な分裂能を獲得し腫瘍化した細胞は、腺窩底から表層へ“pipe line system”により移動するがその亢進した増殖力のため脱落することなく定着し腫瘍として発育するものと考えられる。これに関し小野寺ら²⁵⁾はラットを用いた MNNG による大腸の発癌実験を行い、腫瘍の発生過程において隆起の形成は粘膜に新たに産生される細胞と管腔に脱落してゆくものとの間のバランスが崩れた時に生じると報告しており、なんらかの要因で細胞が脱落せずに長期間上皮としてとどまるような細胞動態の変化が発癌の基盤として必要であると述べている。また、Hayashiら²⁶⁾は in vivo のオートラジオグラフィでヒトの過形成ポリープの細胞動態を観察し構成する細胞の腺窩底部から表層部への移動速度の減少と脱落、剝離の遅延があることを発見し細胞が“加熱の状態”にあると報告している。以上のように腸粘膜における腫瘍発生過程の初期において腺管からの細胞の剝離あるいは脱落の遅延が極めて重要な要因であると考えられる。しかし、今回の実験結果で示したように間置回腸の細胞脱落時間は平均40時間と遠位結腸の91時間に比べ有意に短く、小野江²⁷⁾が述べているように、小腸粘膜上皮細胞はその更新が速くたとえ再生の過程で突然変異により腫瘍化した細胞が生じても次から次へと新生してくる正常上皮細胞に押し上げら

れ正常上皮細胞と同じように腸内腔に脱落してゆき組織に定着し悪性細胞として発育することができないものと考えられる。

以上のことより、小腸粘膜上皮の持つ極めて速い更新性が、小腸が示す強い発癌抵抗性、特に内因性発癌防御機構の主な因子である可能性が明らかにされたと考ええる。

さらに興味深いのは、MNNG注腸群において間置回腸の細胞脱落時間が同一個体の回腸より有意に短縮しており、また生食注腸群の間置回腸との経時的比較においても癌腫発現以降で有意に短縮していたことである。しかし遠位結腸の細胞脱落時間には癌腫発現前後で有意の変化を認めなかった。これは、MNNGに暴露された間置回腸の粘膜上皮自体がその発癌刺激を感知し能動的に細胞の更新率を高めた可能性を示唆する結果であった。また生食注腸群では差がないのに、MNNG注腸群では遠位結腸のDNA合成時間が間置回腸に比べ癌腫発現以降で有意に短く、これは結腸の粘膜上皮細胞がMNNGの作用を受け異常な増殖能を獲得した結果と考えられた。間置回腸も同様な発癌作用を受けていたはずだがその増殖能に有意な変化を認めず、MNNGの発癌刺激を相殺したかのような結果であった。

服部²⁸⁾は放射性核種を用いた検索の結果、癌発生の背景として粘膜の細胞回転や粘液回転が著しく変化すると述べている。上述した小腸粘膜の更新率の促進や増殖能の不変性は、短時間で反応する発癌防御機構として粘液回転が関与した可能性を示唆する。

superoxide (O_2^-) は、発癌過程の初期には initiator や promotor として、癌化以降には抗癌剤が示す殺細胞作用のように suppressor として働き、ことなる状況で相反する作用を示す。これらのアラキドン酸カスケードに関連した種々の物質の内では活性酸素 (O_2^-) 産生源として重要である xanthine oxidase (XOD) 活性は大腸に比べ小腸で有意に高く、今回の研究で明らかにされた小腸の持つ細胞回転の発癌防御機構のほかに粘液回転に起因する発癌防御機構として関与している可能性が考えられ、今後の検討を要する課題であると思われる。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を表します。また、直接に御指導を頂いた福井医科大学第1外科山口明夫助教授ならびに金沢大学医学部第1病理学教室の小田恵夫博士に心から感謝致します。

なお本論文の要旨は第51回日本癌学会総会(1992, 9, 大阪)にて発表した。

文 献

- 1) Hancock RJ: An 11-year review of primary tumours of the small bowel including duodenum. *Can Med Assoc J* 103: 1177—1179, 1965
- 2) Treadwell TA, White RR: Primary tumors of the small bowel. *Am J Surg* 130: 749—755, 1975
- 3) Mittal VK, Bodzin JH: Primary malignant tumors of the small bowel. *Am J Surg* 140: 396—399, 1980
- 4) Wattenberg LW: Carcinogen-detoxifying mechanisms in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 51: 932—935, 1966
- 5) Lowenfels AB: Why are small-bowel tumours so rare? *Lancet* 1: 24—26, 1973
- 6) 成沢富雄: 大腸癌. 大田邦夫, 杉村 隆, 菅野晴夫編. ヒトの癌と動物モデル. 南江堂, 東京, 1979, p169—184
- 7) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約. 改訂第4版. 金原出版, 東京, 1985
- 8) Shibui S, Hoshino T, Vanderlaan M et al: Double labeling with Iodo- and Bromodeoxyuridine for cell kinetics studies. *J Histochem Cytochem* 37: 1007—1011, 1989
- 9) Su-Ming HSU, Raine L, Fanger H: Use of Avidin-Biotin-Peroxydase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 29: 577—580, 1981
- 10) Hohmann A, Hodgson AJ, Di W et al: Monoclonal Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase (APAAP) complex: production of antibody, optimization of activity, and use in immunostaining. *J Histochem Cytochem* 36: 137—143, 1988
- 11) 澤田俊夫, 武藤徹一郎: 小腸腫瘍. 和田達雄編. 新外科学体系. 小腸・結腸の外科II. 中山書店, 東京, 1991, p191—210
- 12) 川井啓市, 馬場忠雄, 赤坂裕三ほか: わが国における小腸疾患の現況と展望. *胃と腸* 11: 145—155, 1976
- 13) 梶谷 鑽, 高橋 孝: 腸癌. *日臨* 32: 2276—2291, 1974
- 14) Narisawa T, Sato T, Hayakawa M et al: Carcinoma of the colon and rectum of rats by rectal infusion of N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. *GANN* 62: 231—234, 1971
- 15) 片山外一: 大腸癌発生増殖に及ぼす胆汁酸の影響に関する実験的研究. *十全医会誌* 91: 452—472, 1982
- 16) Gennaro AR, Villanueva R, Sukonthaman Y et

- al: Chemical carcinogenesis in transposed intestinal segments. *Cancer Res* 33 : 536—541, 1973
- 17) Celik C, Mittelman A, Paolini NS et al: Effects of 1,2-symmetrical dimethylhydrazine on jejunocolic transposition in Sprague-Dawley rats. *Cancer Res* 41 : 2908—2911, 1981
- 18) Hanson WR, Osborne JW, Sharp JG: Compensation by the residual intestinal resectin in the rat. *Gastroenterology* 72 : 701—705, 1977
- 19) Cole JW, Mckalen A: Studies on the morphogenesis of adenomatous polyps in the human colon. *Cancer* 16 : 998—1002, 1963
- 20) Lipkin M: Phase 1 and phase 2 proliferative lesions of colonic epithelial cells in disease leading to colonic cancer. *Cancer* 34 : 878—888, 1974
- 21) Wiebecke B, Brandts A, Eder M: Epithelial proliferation and morphogenesis of hyperplastic adenomatous and villous polyps of the human colon. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol Pathol* 364 : 35—49, 1974
- 22) Rijke RPC, Plaisier HM, Langendoen NJ: Epithelial cell kinetics in the descending colon of the rat. *Virchows Arch B Cell Pathol* 30 : 85—94, 1979
- 23) Tsubouchi S: Kinetic analysis of epithelial cell migration in the mouse descending colon. *Am. J. Anat* 161 : 234—246, 1981
- 24) 藤田哲也: 細胞動態からみた胃癌の発生と進展. *日病理会誌* 70 : 23—54, 1981
- 25) 小野寺紘一, 早川 勝: ラット実験大腸腫瘍における細胞動態学的研究. *日消病会誌* 74 : 709—719, 1977
- 26) Hayashi T, Yatani R, Apostol J et al: Pathogenesis of hyperplastic polyps of the colon: A hypothesis based on ultrastructure and in vitro cell kinetics. *Gastroenterology* 66 : 347—356, 1974
- 27) 小野江為則: 小腸癌はなぜ少ないか. *医のあゆみ* 48 : 695—696, 1964
- 28) 服部隆則: 大腸癌発生の背景としての粘膜細胞の動態. *日本大腸肛門病会誌* 33 : 79—80, 1980

Carcinogenresistance Mechanism in the Small Intestinal Tracts

Yoshiyuki Kurosaka

The Second Department of Surgery, Kanazawa University of Medicine

The small intestine is unique in its high resistance to tumor formation. To clarify the organ specificity of the carcinogenresistance of the small bowel, a segment of the ileum was interposed in the distal colon in male Wistar rats. The rats were administered MNNG at a dose of 2.5 mg/day via the rectum for 2 weeks from the second postoperative week. The rats were then intraperitoneally injected with IdU and BrdU at a 2-hour interval, and sacrificed 10, 20, 30, and 40 weeks after the operation. Control rats were given saline in a similar manner. Cell kinetic analysis of intestinal epithelium was performed by the double labeling method. The following carcinogenic rates were achieved: 0% for the saline group; 0% for the MNNG-treated group at 10 weeks, 54.5% at 20 weeks, 35.0% at 30 weeks, and 52.6% at 40 weeks. There was a significant difference in the site of cancer occurrence between the MNNG-treated groups. The carcinogenic rate in the interposed ileum was 3.3%, significantly lower than the 38.3% in the distal colon. Also the number of cancers per rat was 0.03 in the interposed ileum, significantly lower than 0.70 in the distal colon. The migration time of the MNNG-treated group was 91.4 ± 21.1 hours in the distal colon and 40.6 ± 8.2 hours in the interposed ileum. The epithelial cell migration time from the bottom of the crypt to the surface in the interposed ileum was significantly shorter than that in the distal colon. From these results, it was concluded that the rapid renewal rates of the small bowel epithelium cells was the principal carcinogenresistance mechanism of the small bowel.

Reprint requests: Yoshiyuki Kurosaka The Second Department of Surgery, Kanazawa University of Medicine
13-1 Takaramachi, Kanazawa, 920 JAPAN