— 原 著 —

N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン によるイヌ実験胃癌の細胞動態

三笠 George 高明

日本医科大学第1外科学教室 (主任: 代田明郎教授)

Labelling index with tritiated thymidine *in vivo* of canine gastric cancer induced by N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

George Takaaki Mikasa

The First Department of Surgery, Nippon Medical School

Labelling index (LI) of the canine gastric cancer induced by N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG) was investigated *in vivo* by pulse injection of [methyl-³H] thymidine intravenously. LIs of cancerous lesions were lower than those of generative cell zones of the gastric mucosa in the control dog. There were variations in LIs among each lesion of the same histological type of carcinoma and also among the different areas of a single carcinoma. The mean value of LIs of well differentiated type of adenocarcinoma in the mucosa was higher than that of the poorly differentiated type. Especially, signet-ring cell carcinoma showed significantly lower LI than those of other types of adenocarcinoma (*t*-test, $p < 0.05$). In the well differentiated adenocarcinoma the value of LI(*y*) decreased strikingly with the increase in the diameter (*x*) of the carcinoma with the regression curve $y = 6.645/x^{0.3766}$ ($p < 0.05$). On the contrary, the value of LI(*y*) increased proportionally with the increase in the diameter(*x*) of carcinoma in the poorly differentiated type of adenocarcinoma with the straight line $y = 0.213x + 0.95$ ($r = 0.535$, $p < 0.05$).

Key words : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG), experimental gastric cancer, labelling index, autoradiography

緒 言

腫瘍を効果的に治療するためには、腫瘍細胞の生物学的特性、特に細胞動態を理解する必要性が認識されてきた^{1,2)}。³H-チミジンによる labelling index (以下 LI と略す) は、細胞増殖の指標である growth fraction, cell loss factor, median cell cycle time などと密接な関係があり、細胞増殖の指標として有用であることが報告されている³⁾。

従来より *in vitro* のオートラジオグラフィ法により、種々の組織型および進行度のヒト胃癌の LI が検索されてきた^{4,5)}。しかしながら、この *in vitro* の

方法には ³H-チミジンの組織内への浸透が不十分で不均一になりやすく、したがって浸透した一部の組織でその LI を測定することは誤差を生ずる可能性が高いなどの欠点がある。

N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (以下 MNNG と略す) によるラット実験胃癌は、*in vivo* で ³H-チミジンによる標識を行い、胃癌の細胞増殖を検索することを可能とした⁶⁻⁸⁾。ラットの実験胃癌は、大部分が高分化型腺癌である。ところが、ENNG によるイヌ実験胃癌は、高分化型腺癌から低分化型腺癌まで多彩な組織型を示す腺癌が一つの胃に多発するので^{6,9-11)}、種々の組織型の胃癌の細胞増殖の差異など

を同一個体で検索できるという特徴がある。さらにイヌ実験胃癌は、ラットのそれより肉眼形態、組織形態ともにヒト胃癌に類似しているためヒト癌研究の好個なモデルと考えられよう^{10,11)}。

本研究では、ENNG によるイヌ実験胃癌を *in vivo* で³H-チミジンにより標識し、各胃癌組織型の LI を検索し、胃癌の細胞動態を研究した。

実験材料および方法

体重 10 kg 前後の 6 ヶ月齢米国産雄ビーグルイヌ 2 頭を使用した。ENNG は Aldrich Chemical Co. Ltd. (米国) より購入し、脱イオン水で 1 mg/ml の濃度に溶解、遮光瓶に保存し 1 週間以内に使用した。使用直前に水道水で 100 μ g/ml の濃度に希釈し、飲料水として 9 ヶ月間自由に摂取させた。その後、実験終了時までは水道水で飼育した。体重 15 kg の 2 年齢の雄ビーグルイヌ 1 頭には ENNG を投与せず、対照イヌとして使用した。

(1) [メチル-³H] チミジンを用いたオートラジオグラフィーによる LI の測定

内視鏡による生検で胃癌の発生およびその存在を確認した後、上述の ENNG 投与イヌ 2 頭は、実験開始後 17 ヶ月 (No.1) と 21 ヶ月 (No.2) で、多量の静脈麻酔剤 (Somnopenyl, Pitman-Moore, Inc., N. J., 米国) 投与により屠殺した。屠殺 2 時間前に対照イヌとともに、1.5 mCi/kg の [メチル-³H] チミジン (1 mCi/ml, 24 Ci/mmol, New England Nuclear, Mass., 米国) を cephalic vein より投与した。

胃は 15% 中性ホルマリン固定後、大弯側で切開し、全胃を 5 mm 幅で切り出しブロックを作製した。各々のブロックから 5 μ の 2 枚の連続切片を作製し、1 枚には Hematoxylin Eosin (HE) 染色し、組織学的に検索した。残りの切片は、NR-M 2 (小西写真株式会社) 乳濁液中に 1 回浸した後、5 週間露出させ、現像、定着後切片を HE 染色した。

しかる後に、非癌部では細胞増殖帯の細胞を約 3,000、癌病巣部では 3,000 以上の細胞数を算し、細胞数の少ない病巣では、その全細胞数を算した。核に 20 以上の銀粒子が存在する細胞を標識細胞とした。LI は、算した細胞数中の標識細胞数の百分率をもって示した。

(2) 胃癌の肉眼型と組織型分類

イヌ実験胃癌の肉眼型と組織型分類は、胃癌取扱い

規約¹²⁾に従った。すなわち、組織学的には乳頭腺癌、管状腺癌、低分化腺癌、印環細胞癌の 4 型に分類した。また、前 2 型を高分化型腺癌、後 2 型を低分化型腺癌と大別した。

結 果

1. ENNG により発生した胃腫瘍

肉眼的に No.1 のイヌには胃角部に IIc 型早期癌が、幽門前庭部に Borrmann 2 型進行癌が見られた (Photo 1)。組織学的には、種々の組織型の胃癌がこの両病巣部を中心に多発していた (Fig. 1)。幽門前庭部の Borrmann 2 型胃癌の潰瘍辺縁の粘膜には乳頭腺癌 (Photo 2 A,B) が、粘膜下層には中分化管状腺癌 (Photo 3 A,B) が、また固有筋層内には低分化腺癌 (Photo 4 A,B) が見られた。低分化腺癌は所属リンパ節に転移していた。胃角 IIc 病巣部粘膜には乳頭腺癌、中分化管状腺癌、低分化腺癌、さらに印環細胞癌も相接して存在していた。また、粘膜下層には乳頭腺癌および低分化腺癌の浸潤が見られた。多くの粘膜内微小胃癌が、主として幽門腺領域に見られたが (Photo 5 A,B)、一部は体部腺領域にも存在していた。乳頭状または管状の組織形態を示す微小な腺腫も、主として幽門腺領域に散在していた。

Fig. 1 A topographical map of adenomas and adenocarcinomas in the stomach of Dog No. 1 (Photo 1) which was histologically examined.

Gray areas show adenocarcinomas in the mucosa. Shaded areas with oblique lines represent adenocarcinoma in the submucosa or the muscularis propria. A dotted area shows adenoma in the mucosa.

No.2 のイヌには、肉眼的にⅡc 型早期癌が胃角部に、また無茎性ポリープが幽門前庭部に見られた。組織学的に乳頭腺癌が潰瘍辺縁に見られ、潰瘍底部には低分化腺癌が浸潤していた。種々の大きさおよび組織型を示す粘膜内癌が、体部腺領域と幽門腺領域との中間帯に多発していた。幽門前庭部の無茎性ポリープは腺腫であった。胃癌の他臓器への転移は認められなかった。

対照イヌには、腫瘍性病変の発生は全く認められなかった。

2. 胃癌組織における LI

(1) 対照イヌ胃粘膜における LI

対照イヌ幽門腺粘膜の増殖帯における LI は 12.4 ± 3.4 (平均±標準偏差) であり、体部腺粘膜増殖帯の LI は 7.7 ± 2.6 であった。

(2) 粘膜内癌における LI の組織型による差異

粘膜内癌の LI は、幽門腺および体部腺の増殖帯の LI より低値を示すものが多かった。腺腫および粘膜内癌の LI の組織型による差異を示すと Fig.2 のごとくである。胃癌の LI は、同じ組織型でも各病巣により大きく異なった。高分化型腺癌では、各病巣間のばらつきが大きく、低分化型腺癌ではばらつきが小さかった。乳頭腺癌の LI は 6.5 ± 5.4 (平均±標準偏差)、管状腺癌は 8.9 ± 6.3 、低分化腺癌 3.7 ± 2.6 、印環細胞癌 1.2 ± 1.2 と高分化型腺癌の LI が低分化型腺癌の LI より高かった。特に印環細胞癌は、他の組織型に比し有意に低い LI を示した ($p < 0.001 \sim p < 0.01$, Student-t-test)。

Fig. 2 LI(%) of adenomas and adenocarcinomas in the mucosa

Values are the LI in individual adenomas and the respective histological types of adenocarcinomas. Bars indicate means and standard deviation. Lines indicate range of standard deviation of LI of generative cell zone in the pyloric mucosa of a control dog.

Fig. 3 Differences of LI in different sized intramucosal adenocarcinomas

Solid circles and solid triangles show LI in individual well and poorly differentiated adenocarcinomas, respectively. Solid curve shows a fitting hyperbola for LI of well-differentiated adenocarcinoma and solid straight line shows a fitting line for LI of poorly differentiated adenocarcinoma.

一般的に、標識細胞は病巣内に不規則に分布していたが、一部の粘膜内乳頭腺癌では、標識細胞は粘膜中層から深層に分布していた。この部位は、ほぼ正常幽門腺粘膜の増殖帯に相当する。印環細胞癌では、粘液を多量に細胞質内に有し、核の偏在したいわゆる典型的印環細胞は標識されず、粘液量の少ない核が中央に存在する比較的未熟な^{13,14}印環細胞がわずかに標識されていた。粘膜内癌は、最大でも直径 21 mm と小さく、中心壊死は全く認められなかった。

(3) 粘膜内癌の病巣の大きさと LI との関係

粘膜内癌での病巣の大きさと LI との関係を示すと Fig.3 のごとくである。高分化型腺癌では、LI (y) は病巣の直径 (x) の増大につれて急激な減少を示した ($y = 6.645/x^{0.3766}$, $p < 0.05$)。一方、低分化型腺癌では、LI (y) は病巣の直径 (x) に比例して増加した ($y = 0.213x + 0.95$, $r = 0.535$, $p < 0.05$)。

(4) 癌の浸潤部位と LI との関係

癌の浸潤部位と LI との関係を示すと Table 1 のごとくである。高分化型腺癌が粘膜下層に浸潤すると著明な LI の低下がみられたのに対し、低分化型腺癌では転移巣に至るまではほぼ同程度の LI 値を示した。

Table 1 Mean LI(%) of well- and poorly differentiated adenocarcinoma in each of invasive layers of the stomach and a metastatic lymphonode

Invasion of tumor	Well-differentiated adenocarcinoma		Poorly differentiated adenocarcinoma	
	No.	Mean±SD	No.	Mean±SD
Mucosa	31	7.11±5.70	16	2.19±2.17
Submucosa	4	2.03±1.40	4	2.76±2.04
Muscularis propria	0		1	2.40
Lymphonode metastasis	0		1	3.70

考 察

イヌ実験胃癌は、最近 10 年間における作製方法の急速な進歩、形態学的特徴の把握の体系化などにより、ヒト胃癌の好個な動物モデルとしての有用性が明らかにされてきた^{10,11)}。ENNG 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与によるイヌ実験胃癌は、多発性でしかも同一の胃に多数の組織型の異なった癌病巣を生じ、1 頭のイヌで胃癌に関する多くの知見を比較検討できる利点がある¹⁰⁾。

郡ら⁹⁾は、MNNG によるラット実験胃癌の細胞増殖を³H-チミジンによる *in vivo* オートラジオグラフィで種々検索し、胃癌と幽門腺粘膜の LI は変わらないが、世代時間と DNA 合成時間は胃癌のほうが幽門腺粘膜より 2～3 倍長いことを報告している⁹⁾。

今回の実験では、大部分の腺腫および腺癌が幽門腺領域に発生したが、これらの胃腫瘍の LI は正常幽門腺の細胞増殖帯の LI より低い値を示すものが大部分であった。印環細胞癌をも含めた低分化型腺癌は、乳頭腺癌、管状腺癌などの高分化型腺癌に比し低い LI を示した。特に印環細胞癌は、他の組織型に比し有意に低い LI 値であった。また、印環細胞癌のうちでも、久保田、長与ら^{13,14)}の C 型すなわち成熟型はほとんど標識されず、A 型および B 型すなわち幼若型または中間型が低頻度に標識されていた。

さらに高分化型腺癌では、癌巣が大きくなるにつれて急激な LI の低下が見られたが、低分化型腺癌では癌巣の増大につれて徐々に LI が増加した。この事実より、高分化型腺癌では微小胃癌の時は細胞増殖が盛んであるが、癌腫が増大するにしたがって細胞増殖の遅くなる可能性が考えられ、一方、低分化型腺癌では細胞回転は癌腫が増大するにつれてわずかながら増大することを示すものと考えられる。

本実験では、³H-サイミジンは *in vivo* で投与されているので、*in vitro* に投与された従来の実験より

^{4,5)}、*in vivo* における細胞増殖をよりよく反映しているものと考えられる。しかしながら、各病巣における血液の微小循環の差異が、³H-チミジンの取り込みの差として表れている可能性も考慮する必要があるであろう。*in vitro* におけるオートラジオグラフィ法には、³H-チミジンの組織への浸透が不十分で、また不均一になりやすいなどの問題が少なくないが、このイヌ実験系は今後の胃癌の細胞動態の検索上極めて有用なものと思われる。

結 論

N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(ENNG)を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で飲料水として雄ビーグルイヌ 2 頭に投与し、多発胃癌を作製、無処置対照イヌ 1 頭とともに、屠殺 2 時間前に 1.5 mCi/kg の³H-チミジンを経静脈的に投与した。各種組織型の胃癌の *in vivo* におけるオートラジオグラフィを作製し、細胞増殖の指標として Labelling index (LI) を測定、胃癌の細胞動態を研究した。

1) 胃癌の LI は、幽門腺および体部腺粘膜の増殖帯の LI より低値を示すものが多かった。

2) 各組織型の粘膜内癌の LI (平均±標準偏差) は、乳頭腺癌 6.5±5.3、管状腺癌 8.9±6.3、低分化腺癌 3.7±2.6、印環細胞癌 1.2±1.2 であり、高分化型腺癌より低分化型腺癌の LI が低く、特に印環細胞癌は他の組織型に比し、有意に低い LI を示した (*t*-test, $p<0.01$)。

3) 粘膜内の高分化型腺癌では、直径 (x) が大きくなるにつれて、急激な LI (y) の低下がみられた ($y=6.645/x^{0.8766}$, $p<0.05$)。これに対し、低分化型腺癌では癌巣の増大につれて LI が増加した ($y=0.213x+0.95$, $r=0.535$, $p<0.05$)。

稿を終るに臨み、本研究を直接指導いただいた日本医科大学第 1 外科学教室松倉則夫博士に感謝する。

文 献

- 1) Brounschweiger, P.G., Poulakos, L., and Schiffer, L.M.: Cell kinetics in vivo and in vitro for C3H/He spontaneous mammary tumors. JNCI, 59, 1197~1204, 1977.
- 2) Sulkes, A., Livingston, R.B., and Murphy, W.K.: Tritiated thymidine labelling index and response in human breast cancer. JNCI, 62, 513~515, 1979.
- 3) Sasaki, T., and Sakka, M.: Implications of thymi-

- dine labelling index in the growth kinetics of human solid tumors. *Gann*, **72**, 181~188, 1981.
- 4) 新畑幸：胃癌細胞の ^3H -Thymidine in vitro 標識法による Autoradiography からみた増殖動態の研究。京都府医大誌, **78**, 117~140, 1967.
 - 5) Tanaka, J. : Autoradiographic studies on the cell proliferation of the human gastric mucosa in supravital condition. *Acta Pathol. Jpn.*, **18**, 307~318, 1968.
 - 6) Sugimura, T., and Kawachi, T. : Experimental stomach cancer. "Method in Cancer Research" (Busch, H. ed.), Vol. 7, p. 245~308, Academic Press, New York, 1973.
 - 7) Saito, T., and Sugimura, T. : Biochemical studies on carcinogenesis in the glandular stomach of rats with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Gann*, **64**, 373~381, 1973.
 - 8) Kohli, Y., Hashimoto, Y., Takeda, S., and Kawai K. : Cell kinetics of gastric carcinoma and other gastric lesions in rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine with or without Tween 60. *Gann*, **68**, 133~140, 1975.
 - 9) Kurihara, M., Shirakabe, H., Murakami, T., Yasui, A., Izumi, T., Sumida, M., and Igarashi, A. : A new method for producing adenocarcinomas in the stomach of dogs with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Gann*, **65**, 163~177, 1974.
 - 10) 松倉則夫, 森野一英, 大垣比呂子, 河内卓：イヌ実験胃癌のヒト胃癌研究への貢献。胃と腸, **16**, 715~722, 1981.
 - 11) 松倉則夫, 杵淵真理, 河内卓：胃癌-動物。"ヒトの癌と動物モデル" (大田邦夫, 山本正, 杉村隆, 菅野晴夫編), p. 124~143, 南江堂, 東京, 1979.
 - 12) 胃癌研究会編：胃癌取扱い規約。第10版, 金原出版, 東京, 1979.
 - 13) Kubota, K., Yamada, S., Ito, M., Nakamura, W., and Nagayo, T. : Cytoplasmic leucine naphthylamidase activity expressed in signet-ring cell carcinoma of the stomach. *JNCI*, **59**, 1599~1604, 1977.
 - 14) 長与健夫：胃癌発生に関する組織学的, 実験的研究。日病理会誌, **65**, 3~25, 1976.

Legends

- Photo 1 Gross appearance of the stomach of Dog No. 1 showing IIc type of early gastric cancer in the angulus ventriculi and a Borrmann type 2 advanced gastric cancer in the prepylorus.
- Photo 2 Papillary adenocarcinoma in the mucosa of the ulcer ridge in the prepylorus of Dog No. 1.
- A Histological appearance. HE stain, $\times 100$
 - B Labelled nuclei with grains. HE stain, $\times 800$
- Photo 3 Moderately differentiated tubular adenocarcinoma in the submucosa of the ulcer ridge in the prepylorus of Dog No. 1.
- A Histological appearance. HE stain, $\times 100$
 - B Labelled nuclei. HE stain, $\times 800$
- Photo 4 Poorly differentiated adenocarcinoma in the muscularis propria in the ulcer lesion in the prepylorus of Dog No. 1.
- A Histological appearance. HE stain, $\times 100$
 - B Labelled nuclei. HE stain, $\times 800$
- Photo 5 Minute adenocarcinoma in the mucosa (3 mm in diameter) in the antrum of Dog No. 1.
- A Histological appearance showing papillary adenocarcinoma. HE stain, $\times 20$
 - B Labelled nuclei. HE stain, $\times 800$

(受付：1983年3月2日)

Plate (1)

Plate (2)