N-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (MNNG) による実験的腸上皮化生ならびに胃腫瘍の発生と糖質栄養との関連性

山田 和彦*, 佐々木光美*, 合田 敏尚*
細谷 憲政*, 野田 節子**, 森内 幸子***

* 東京大学医学部保健学科保健栄養学教室

** 東海大学医学部解剖学教室

*** 日本女子大学家政学部食物学科

Relation between *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine Induced Intestinal Metaplasia and Tumor in Rat Stomach and Dietary Carbohydrate

Kazuhiko YAMADA,* Mitsuyoshi SASAKI,*
Toshinao GODA,* Norimasa HOSOYA,*
Setsuko NODA**
and Sachiko MORIUCHI***

* Department of Nutrition, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113

** Department of Anatomy, School of Medicine, Tokai University, Isehara, 259-11

*** Department of Food and Nutrition, School of Home-Economics, Japan Women's University, Bunkyo-ku, Tokyo, 112

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.) 37, 369~372 (1984)

The effects of dietary carbohydrate on the induction of gastric intestinal metaplasia by oral administration of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) were observed with the rats raised on two different diets, viz, a starch diet (70% as starch) and a sucrose diet (46% of the total weight in the form of sucrose, 24% as starch). MNNG was administered at a concentration of 83 µg/ml in drinking water for 3 months from 6 weeks old. Rats were examined at 3, 5, 7, 10 and 13 months after the start of MNNG administration.

Intestinal metaplasia detected as sucrase activity by tes-tape and tumors were induced in the glandular stomach at 5 months after MNNG administration in both dietary groups, and developed with aging. The incidence and sucrase activity of intestinal metaplasia were higher in

the starch-fed rats than sucrose-fed rats. No tumor was found in the stomach without MNNG administration, but intestinal metaplasia was found with aging, although sucrase activity was lower than that of MNNG-administered rats in both dietary groups. The activities of maltase and sucrase in the proximal small intestine were slightly lower in MNNG-administered rats, but did not show any significant difference between starch and sucrose-fed rats. These results suggested that high starch intake involved in the early stage of the development of intestinal metaplasia as well as aging.

(Received December 22, 1983)

胃粘膜が小腸粘膜様の変化を示し、本来は小腸粘膜に観察されて胃粘膜にはみられない二糖類水解酵素などの膜消化酵素活性が胃に観察されることがある^{1)~3)}。この腸上皮化生は、ヒト胃癌組織の周辺に存在する例が多く、胃癌の前癌状態ではないかといわれている。腸上皮化生は日本人にとくに多く、また加齢との関連が強く、40歳以上の人の半数には多かれ少なかれ腸上皮化生がみられるという¹⁾。疫学的にも、加齢とともに増加する分化型胃癌と腸上皮化生の相関は高く、分化型胃癌の発生と食生活が関連するともいわれる⁴⁾。また、近年、日本人の胃癌発生率は減少し食生活の西欧化がすすみ、穀物摂取量の減少ならびにシヨ糖摂取量の増大がみられる⁵⁾⁶⁾。

一方、発癌剤である *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (MNNG) の経口投与により、実験的に動物の胃粘膜に、腸上皮化生ならびに胃癌を発生させることができることが知られている⁷⁾⁸⁾。

そこで、MNNG 投与による実験的な腸上皮化生ならびに胃腫瘍の発生過程に、動物の栄養条件がどのように影響しているかを検討するために、デンプン食あるいはシヨ糖食によって飼育したラットに、MNNG を経口投与して、胃粘膜の腸上皮化生ならびに腫瘍の発生に及ぼす影響を経時的に観察し、さらに小腸の二糖類水解酵素活性の高いときに腸上皮化生を起こしやすいか、小腸の酵素活性との間に関連があるかどうかを知るために、小腸粘膜二糖類水解酵素活性も観察してみた。

実験方法

1. 実験動物

6週齢の Wistar 系雄ラットを2群に分け、糖質の内容だけを変えて、デンプン 70% シヨ糖 0% (重量比) のデンプン食ならびに、デンプン 24% シヨ糖 46% のシヨ糖食とした合成飼料を用いて飼育した。各飼料ともカゼイン 16%, コーンオイル 5%, 濾紙粉末 4%, 塩混合 4%⁹⁾, ビタミン混合 0.7%⁹⁾, 塩化コリン 0.3% を含

* 〒113 東京都文京区本郷 7-3-1

** 〒259-11 伊勢原市望星台

*** 〒112 東京都文京区目白台 2-8-1

む。各群はさらに、MNNG を投与しない群と投与する群とに分けて4群とした。MNNG は使用直前に水道水に $83 \mu\text{g/ml}$ の濃度に希釈して、飲料水として生後6週齢から3か月間だけ自由に摂取させた。

MNNG 投与開始後、3, 5, 7, 10, 13 か月後に、各群より4~5匹ずつ断頭により屠殺した。

2. 胃粘膜腸上皮化生の検出

屠殺後、ただちに胃を摘出し、大弯側を切り開き生理的食塩水により洗浄後、パラフィン板上にピンで粘膜面を上にして固定した。胃腫瘍の発生を肉眼的に観察した後、これに 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH } 6.5$) に溶解した 5% ショ糖液を噴霧して、 37°C に5分間温置した。ショ糖水解酵素によって遊離したブドウ糖を尿糖判定用のテストテープを胃の粘膜面にすき間なくはりつけ、その色が黄から緑に変化することにより腸上皮化生の発生を検出した¹⁰⁾。テストテープをはりつけて1分後に写真撮影を行なった。

3. 小腸粘膜二糖類水解酵素活性の測定

小腸の起始部より 10 cm を十二指腸とし、残りを2等分して前部を空腸、後部を回腸とした。おのおのから粘膜を剝離採取して、小腸粘膜の湿性重量を測定後、 10 mM リン酸カリウム緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) を用いてホモジネートを作成した。二糖類水解酵素活性の測定は、グルコースオキシダーゼを用いる Dahlqvist の方法¹¹⁾ に従った。酵素活性はタンパク質 1 mg が1時間に水解する基質量 μmol を用いて表わした。タンパク質の測定は、ウシ血清アルブミンを標準とし、Lowry らの方法¹²⁾ に従った。

4. 試 薬

MNNG は Aldrich Chemical 社製品を用い、グルコースオキシダーゼは藤沢薬品㈱より、ショ糖は国産化学より購入した。マルトースは林原生物化学研究所よりご供与いただいた。合成飼料に使用した塩混合ならびにビタミン混合は日本クレア㈱より購入した。

結果ならびに考察

1. デンブン食ならびにショ糖食飼育ラットの MNNG 投与による胃における腸上皮化生ならびに胃腫瘍の発生

MNNG を比較的短期間ラットに投与すると1年後には、胃腫瘍の発生は $50\sim 60\%$ であり、腸上皮化生は $90\sim 100$ の高頻度に発生することが報告されている⁷⁾。一方、糖質は小腸粘膜に存在する二糖類水解酵素活性を上昇させることも知られている¹³⁾¹⁴⁾。そこで、胃の腸上皮化生の発生に対して糖質の内容が異なる影響を与えるかどうかを、デンブン食ならびにショ糖食を用いて経時的に観察した。

Fig.1. Intestinal metaplasia of the rat gastric mucosa as sucrase activity detected with tes-tape.

一, +, ++ indicate the strength of sucrase activity.

MNNG 投与開始約2か月間は、非投与群に比べて投与群の体重増加はやや大きかったが、投与中止後は各群の成長曲線には違いはみられなかった。各群とも実験開始後6か月には約 400 g に達し、それ以後はゆるやかな成長を示し、13 か月には約 450 g 前後となった。デンブン食群とショ糖食群との間に差はなかった。

胃の腸上皮化生は、Fig.1 に示すように、テストテープを用いてショ糖水解酵素活性の発現に鋭敏に反応する緑

Table 1. Effects of diet and MNNG administration on sucrase activity detected with tes-tape in the rat gastric mucosa.

Experimental period (month)	Starch diet		Sucrose diet	
	MNNG(-)	MNNG(+)	MNNG(-)	MNNG(+)
3	-----	-----	-----	-----
5	-----	↓ - + + +	----- +	----- + +
7	----- +	- + + + +	----- +	----- + +
10	- - + +	- + + + +	- - + +	- - + + +
13	+ + + +	+ + + + +	- + + +	- + + + +

-, +, ++ indicate the strength of sucrase activity in Fig. 1.

The arrow indicates the rat with tumor in the glandular stomach.

Fig. 2. The effects of diet and MNNG administration on sucrase and maltase activities in rat intestinal mucosa.

The values were expressed as $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ Statistic analysis by Student's *t*-test was carried out between administered and not administered groups of MNNG.

*** Significantly different at $p < 0.05$, 0.01 , respectively.

色の発色の程度により，－，＋，++として判定した。MNNG 投与中止直後には，いずれの群においても腸上皮化生は発生していなかったが，投与開始後5か月以後には，MNNG 投与群のデンプン食，シヨ糖食いずれの群にも腸上皮化生が発生し，7，10，13 か月と経時的に，発生率は高くなった (Table 1)。また，腸上皮化生によるシヨ糖水解酵素活性の程度も増大した。デンプン食群は，シヨ糖食群に比較して5か月，7か月には，腸上皮化生の発生率は高く，その程度も強い傾向にあった。しかし，10か月，13か月には両群に差はみられなくなった。さらに，MNNG 非投与群の場合にも，加齢に伴っ

て10か月，13か月後には両群いずれも腸上皮化生の発生が多く観察された。一方，肉眼的に明らかな胃腫瘍の発生は，MNNG 非投与群においては発生しなかったが，投与群においては，デンプン食群に4例，シヨ糖食群に3例観察された。

日本人の腸上皮化生の頻度は30代より上昇するが，胃癌，とくに分化型腺癌の頻度は50代より顕著な上昇がみられ，腸上皮化生は分化型腺癌の出現より先行することが報告されている¹²⁾。分化型胃癌の発生がとくに食生活と深く関連していることが日系米人の疫学的研究で示されており¹⁵⁾，また，塩化ナトリウムはMNNGに

よるラットの実験的胃腫瘍の発生を増大させるという報告もある¹⁰⁾。本研究では、発癌剤である MNNG の投与により、実験的に腸上皮化生を正常ラットに比べて早期に発生させ、その発生の初期にはデンプン食のほうがシヨ糖食に比べて誘因となることを示した。それゆえ、腸上皮化生の発生には加齢も重要な因子であるが、食物中の糖質とくにデンプン摂取も要因となると思われる。

2. デンプン食ならびにシヨ糖食飼育ラットの小腸二糖類水解酵素活性に及ぼす MNNG 投与の影響

小腸粘膜二糖類水解酵素活性は食餌組成の変化により影響を受け、糖質比率の増大に伴い、その活性は増大することが知られている^{13),14)}。発癌剤である MNNG 投与が、デンプン食ならびにシヨ糖食群の小腸粘膜二糖類水解酵素活性に及ぼす影響を観察した。

シヨ糖水解酵素活性の場合、胃に最も近い十二指腸では、MNNG 投与中止直後には、非投与群に比べてシヨ糖食群においては有意に低い値を示し、デンプン食群においては低い傾向を示した (Fig. 2)。それ以後も、加齢に伴い、いずれの群も若干増大したが、MNNG 投与群の活性は非投与群に比べて低い傾向にあった。しかしながら、食餌による酵素活性の差は観察されなかった。空腸においても、十二指腸と同様、MNNG 投与によりシヨ糖水解酵素活性は低い傾向を示していたが、回腸では MNNG 投与の影響は明らかでなかった。一方、マルターゼ活性もシヨ糖水解酵素活性とほぼ同様の変動を示した。

このように、小腸粘膜二糖類水解酵素活性は、MNNG 投与により抑制される傾向を示し、胃における MNNG 投与の反応とは異なっていた。しかしながら、腸上皮化生の発生と小腸二糖類水解酵素活性との間には、明らかな関連性は観察されなかった。また、胃にみられたデンプン食とシヨ糖食との差異は小腸には観察されず、長期間の糖質摂取の場合には、小腸粘膜二糖類水解酵素活性に与える影響は、糖質の内容よりも摂取量によるものと思われる。

要 約

発癌剤である MNNG 投与による胃の腸上皮化生の発生過程に及ぼすデンプン食ならびにシヨ糖食摂取の影響を経時的に観察した。

1) 胃の腸上皮化生は MNNG 投与により経時的に発生率が増大し、その程度も発生初期においてはシヨ糖食に比較してデンプン食が高かった。

2) MNNG 非投与群においても MNNG 投与群よりも遅れたが、加齢に伴い腸上皮化生の発生がみられた。

3) 小腸粘膜の二糖類水解酵素活性は MNNG 投与により、近位部位において若干抑制された。

それゆえ、胃の前癌状態ともいわれる腸上皮化生の発生には、加齢も大きな要因となるが、動物の栄養条件によっても強く影響を受けるものと思われる。

文 献

- 1) Imai, T., Kubo, T. and Watanabe, H.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **47**, 179 (1971)
- 2) 山際裕史: 医学のあゆみ, **76**, 788 (1971)
- 3) Iida, F. and Kusama, J.: *Cancer*, **50**, 2854 (1982)
- 4) Munoz, N. and Asuall, J.: *Int. J. Cancer*, **8**, 144 (1971)
- 5) 厚生省統計情報部: 人口動態統計 (昭和 25~56 年), 財団法人厚生統計協会 (東京)
- 6) 厚生省公衆衛生局栄養課 (編): 国民栄養の現状 (昭和 25~56 年度調査成績), 第一出版 (東京)
- 7) Matsukura, N., Kawachi, T., Sasajima, K., Sano, T., Sugimura, T. and Hirota, T.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**, 141 (1978)
- 8) Fujii, I., Watanabe, H., Terada, Y., Naito, Y., Naito, M. and Ito, A.: *Gann*, **71**, 804 (1980)
- 9) Suzuoki, Z., Furuno, K., Murakami, K., Fujita, T., Matsuoka, T. and Takeda, K.: *J. Nutr.*, **94**, 427 (1968)
- 10) Sugimura, T., Kawachi, T., Kogure, K., Tanaka, N., Kazama, S. and Koyama, Y.: *Gann*, **62**, 237 (1971)
- 11) Dahlqvist, A.: *Anal. Biochem.*, **7**, 18 (1964)
- 12) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 13) Deren, J.J., Broitman, S.A. and Zamchek, N.: *J. Clin. Invest.*, **46**, 186 (1967)
- 14) 山田和彦, 森内幸子, 高瀬幸子, 細谷憲政: 栄養と食糧, **29**, 377 (1976)
- 15) Haenszel, W., Kurihara, M., Segi, M. and Lee, R.K.C.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **49**, 969 (1972)
- 16) Takahashi, M., Kokubo, T., Furukawa, F., Kurokawa, Y., Tatamatsu, M. and Hayashi, Y.: *Gann*, **74**, 28 (1983)

(昭和 58 年 12 月 22 日受理)