

MNNG 誘発ラット胃癌の間質に関する研究 —とくに基底膜の態度について—

岡山大学医学部第一外科教室 (主任: 田中早苗教授)

石 川 純

(昭和51年9月16日受稿)

目 次

第1章 緒 言
第2章 実験方法
第1節 実験動物
第2節 実験方法
第3節 観察方法
第3章 実験結果
第1節 対照群における基底膜および fibroblast sheath について
第2節 MNNG 投与群における基底膜および fibroblast sheath の変化
第1項 光顕的観察結果
第2項 電顕的観察結果
第4章 総括ならびに考按
第5章 結 言

第1章 緒 言

1967年, 杉村ら¹⁾が N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) をラットに経口投与し, 高率にラット腺胃に癌を作り得ることを報告して以来, 幾多の実験胃癌に関する研究がなされている。しかし, これらの多くは上皮細胞についての腫瘍性変化に関するものであり, 間質の態度に関しての研究は少ない。本研究は上皮の腫瘍性増殖に際してみられる上皮の基底膜の変化を中心として, 周辺の間質の態度を経時的に組織化学的および電子顕微鏡的に観察し, 腫瘍細胞と間質との関係を検討せんとするものである。

ヒト胃癌については癌の間質を腫瘍に対する生体の防禦反応とする説や, 癌増殖による組織障害の修復反応に過ぎないとする説などがあり一定でない²⁾。また, 基底膜についても carcinoma in situ では, 癌はいまだ基底膜を破っていないものであり, 浸潤癌では基底膜が破れているものであるといわれ,

癌に対する防禦作用が基底膜にあるが如く考えられているが, MNNG によるラット腺胃の腫瘍性増殖巣においてこれらの点を検討し, さらに基底膜の形成機序に関する考察を行った。

実験胃癌について癌腫としての組織学的 criteria は明確にされていないが, criteria の明らかな人癌の間質および基底膜の態度と対比するとともに, 組織学的判定は Stewart³⁾ のいうごとく漿膜浸潤のあるものを癌とするという criteria を再検討した。また, 一連の間質の変化が MNNG 投与による上皮の腫瘍性増殖に続いて生じたものか, あるいは間質自体にも MNNG が作用しているかの点についても同時に考察を加えた。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

生後6週令の Wistar 系雄性ラットを使用し, クレア製 CE-2 固型飼料にて飼育した。

第2節 実験方法

MNNG は Aldrich chemical 社製を使用した。投与方法はラットを3群に分け, 第1群としては MNNG を 83 μg/ml の濃度に水道水にて溶解し, 遮光した給水壇にて経口的に8か月間自然摂取させ, 以後は水道水のみを投与した。なお, 水溶液は週3回新しいものに取り換えた。第2群としては Tween 60 を 0.4% の割合にて第1群の MNNG 溶液に加え, 同様の方法で投与し, 対照群には水道水のみを投与した。

第3節 観察方法

投与後1週目ごとに66週まで経時的に屠殺し第1群43匹, 第2群26匹, 対照群13匹, 合計82匹について光顕的ならびに電顕的標本を作成した。

光顕的観察には10%中性ホルマリンにて固定後, 全腺胃から約3mm巾の組織片を連続して切り出し, パラフィン包埋の後に各ブロック90枚の垂連続的切

片を作成し、これらに Hematoxyline and eosin 染色, Alcian green 染色, PAS 反応, Colloid iron 染色, Hematoxyline Phroxin Safran 染色⁴⁾ (以下 HPS と略す), 鍍銀染色, Mallory Azan 染色を施し, 鏡検に供した。

電顕的観察には 2.5% glutaraldehyde 溶液 (0.1M cacodylate buffer にて pH7.4 に調整) にて 1 時間 30 分, 4℃ で前固定を行い, さらに 0.2M 蔗糖液にて水洗, ついで 1% OsO₄ (0.1M cacodylate buffer にて pH7.4 に調整) にて 4℃, 2 時間後固定の後アルコール系列にて脱水し Epon に包埋した。薄切後酢酸ウラニール, 酢酸鉛にて染色し日立 Hu 12 型にて観察, 撮影した。

酸性ムコ多糖 (AMPS) の存在は Luft⁵⁾ による Ruthenium red 法に準じて行った。すなわち, 前記前固定液に 1,500 ppm の Ruthenium red を加え前述のごとく前固定を行い, 30 秒間水洗の後, 1,500 ppm Ruthenium red 加 2% OsO₄ (0.1M cacodylate buffer で pH7.4 に調整) にて 3 時間室温で後固定を行い, 以下一般電顕用と同様に脱水包埋を行った。

第 3 章 実験結果

第 1 節 対照群における基底膜および fibroblast sheath について

基底膜は電顕的には上皮細胞直下に約 200Å の透明帯 (lamina lucida, lamina vara⁶⁾) を隔てて, 電

表 1

	腺管構造	構成細胞	核	粘液分泌所見	fibroblast sheath の形成	基底膜の形成
病巣 A 型	ところにより多方向に分岐, 腺管の延長化もあるが規則的	円柱状ないし立方状	円形ないし楕円形で密に基底側に配列	有り	良好	良好
病巣 B 型	腺管配列は不規則, 形は不均一	短円柱状ないし立方状など一様でない	円柱ないし短楕円形で基底側に整然とは配列していない	少ない	不良	形成不全一部に過形成
病巣 C 型	腺管構造の乱れ著明	一定性なく核細胞質比が高い	大きさ形等の不顕性著明	少ない	不良	形成不全

子密度の高い巾 500-800Å の lamina densa として認められる。Ruthenium red 染色では強く濃染され (図 1a), surface coat⁷⁾ して細胞膜と連続しているがごとくみられるが, さらに強拡大にて観察すると細胞膜, lamina lucida との織別が可能となり, この Ruthenium red 陽性物質は lamina densa およびその周囲に顆粒状に沈着してみられる (図

1b)。光顕的には PAS 反応で観察される他に Ruthenium red 陽性物質, すなわち AMPS を含むと考えられることより colloid iron 染色によって観察し得る⁸⁾ (図 2)。また, HPS 染色でみると, 基底膜の外側には紡錘型の線維芽細胞と膠原線維から成る fibroblast sheath により腺管が取り囲まれている (図 3)。

第 2 節 MNNG 投与群における基底膜および fibroblast sheath の変化

第 1 項 光顕的観察結果

MNNG 投与 2 週目より幽門腺の萎縮と間質における膠原線維の増加がみられた。また, 9 週目より体部腺および幽門腺領域にびらんを生じ 17 週目では筋層に, さらに 26 週目では瘻までおよぶ潰瘍の発生をみた。

投与 26 週目より主として幽門腺領域において, 胃内腔に隆起性に増殖する腺管増殖病変や, あるいは粘膜炎を破り下方に発育し漿膜に達する過剰の腺管増殖病変がみられた。これらの増殖病変を腺管構造上の異型性とその細胞形態の異型性の程度により, A, B, C 型の 3 種類に分類し検討した (表 1)。

病巣 A 型: 腺管構造には軽度の異型を認め, ところによりやや多方向に分岐し, あるいは嚢胞状の拡張をみるも, その構成細胞は円柱状ないし立方状, 核は円形ないし楕円形で密に規則正しく基底側に配列している。また, 腺腔側には粘液分泌所見がみられる (図 4)。HPS 染色では腺管周囲に fibroblast

sheath の形成が良好であり, colloid iron 染色においても基底膜が観察される (図 5)。

病巣 B 型: 増殖腺管の配列は不規則で, 形は多様化し不均一であり, 一部では嚢胞状の拡張もみられ, しかも拡張した腺管の不均一性はより高度である。構成細胞は短円柱状ないし立方状など一様でなく, 胞体はむしろ好酸性である。核は円形ないし短楕円

形で基底側に整然とは配列していない。粘液分泌所見は少ない(図6)。腺管周囲には fibroblast sheath は形成不良で膠原線維束は腺管を取り囲むことなく散在している(図7)。さらに, collid iron 染色では基底膜は不明瞭となっている(図8)。

病巣C型: 構造異型は高度で, 一部では腺管構造が乱れ不明瞭となっている。細胞異型も強く, 胞体はむしろ好塩基性で, 核細胞質比が高く, 核の大小, 形の不同性など癌と容易に診断し得る所見を備えている。fibroblast sheath の形成や colloid iron 染色による基底膜は不明瞭である(図9)。

MNNG 投与群合計69匹の腺胃に発生した増殖病巣はA型: 43病巣, B型: 20病巣, C型: 4病巣の合計67病巣である(表2)。これらのうち63病巣が幽門腺領域に発生し, 体部腺領域には4病巣に過ぎない(表4)。

これら病巣とその壁深達度をみると(表2), A型では粘膜下層(sm): 69.8% (30/43)と大部分を占め, 筋層(pm)および漿膜s(+): 14.0% (6/43)と少ない。また, 粘膜固有層(m)の7病巣はすべて病巣A型である。

B型では sm: 55.0% (11/20), pm: 30.0% (6/20), s(+): 15.0% (3/20)と pm および s(+)のものが増加している。なお, C型ではs(+)のものがほとんどである。

飼育期間と壁深達度の関係を見ると, 表3のごとく, 1年以上長期飼育例ではmに留まるもの: 28.6% (2/7), sm: 40.5% (17/42), pm: 81.8% (9/11), s(+): 71.4% (5/7)と pm および s(+)に長期間を要した病巣が多い。

A, B, Cの各病巣を経時的に検討すると(表4), A型は26週目より, B型は33週目より, C型は35週目よりみられ, これらを1年以内のもの計34病巣について比較すると, A型: 73.5% (25/34), B型: 20.6% (7/34), C型: 5.9% (2/34)とA型が多い。他方, 1年以上の長期飼育例33病巣ではA型: 54.5% (8/33), B型: 39.4% (13/33), C型: 6.1% (2/33)とB型の病巣が増加してくるが, A型病巣も多く約半数を占めている。

印環細胞癌, 単純癌は第1, 第2群ともみられず, またリンパ節や他の諸臓器への転移もみられなかった。なお, 腺胃にみられたその他の病変としては表5のごとくである。unclassified とした8病巣は主として腺胃の粘膜内にあり, 核は小さく明瞭で他方, 胞体には微細な顆粒を有し, これらは PAS 反

表2

	m	sm	pm	s (+)	total
病巣A型	7	30	5	1	43
病巣B型	0	11	6	3	20
病巣C型	0	1	0	3	4

表3

month	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
m	•		•	•				•	•		
sm	•		•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
pm			•			•	•	•	•	•	•
s (+)			•	•					••	••	

• 病巣A型
◦ 病巣B型
* 病巣C型

表4

month	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
病巣A型	•		•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
病巣B型			•	•	•••••	•	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
病巣C型			•			•			•	•	

• pyloric region
◦ fundic region

表5

glandular stomach	
benign mesothelioma	3 cases
osteoid formation	5
squamous metaplasia	2
leiomyosarcoma	1
reticulum cell sarcoma	1
unclassified	8

応, Alcian green 染色にて弱陽性に染り colloid iron 染色にて青染され, ヒトの granular cell myoblastoma 類似の所見を呈していた? 周辺正常組織との境界は不明瞭で 1 例は pm にまで及んでいた。

Tween 60 による腫瘍発生について検討すると, 腫瘍性変化の生じる 7 ヶ月以後における有効ラット数は第 1 群 (MNNG のみ投与) 22 匹, 第 2 群 (Tween 60 を加えたもの) 26 匹である。病巣 A 型 43 病巣中第 2 群のものは 25 病巣, 病巣 B 型では 20 病巣中 10 病巣, 病巣 C 型では 4 病巣中 2 病巣で, 第 1 群, 第 2 群でほとんど差はみられない。

第 2 項 電顕的観察結果

病巣 A 型では (図 10), 増殖腺管の上皮細胞直下に透明帯を隔てて lamina densa すなわち, 基底膜が連続して明瞭に認められ, 細長い線維芽細胞がその外側に上皮細胞に沿って観察される。また, 線維芽細胞の外側には周期性横紋を有する膠原線維の形成が良好で, これら線維束によって腺管が取り巻かれており, 光顕的に HPS 染色でみられた fibroblast sheath が電顕的にも認められる (図 20 の No. 1)。

病巣 B 型においては, 増殖腺管の上皮細胞管腔側表面には不完全な微絨毛を認め, 細胞間には複雑な interdigitation があるが desmosome はあまり発達していない。基底側の細胞表面は凹凸やうねりを示し, 原形質の一部が間質側に突出するものも認められた。この突出部には細胞小器官の発達不良で, 多くの free ribosome が認められる (図 16)。核は一般に大きく, 核膜にはしばしば湾入が認められ, 細胞質は概して細胞小器官に乏しく ribosome に富むものが多い。(図 14)

病巣 B 型の増殖腺管の基底膜には形成不良から過形成に至る像が観察され, その際上皮側の変化のみならず間質, 特に線維芽細胞の態度により種々の像を呈している。すなわち, 図 11 のごとく, 線維芽細胞が直接上皮細胞と密接し, その部では基底膜はみられないが, 上皮に近接した部では基底膜が認められる。他方, 線維芽細胞が上皮に近接しているにもかかわらず, 基底膜は約 200 Å と細くなり, しかも顆粒状に連続しているものがある (図 12)。さらに, 図 13 のごとく線維芽細胞が近接しても基底膜が全くみられないことがある。この場合, 線維芽細胞には細胞小器官の発達は不良であり, 周辺には microfibril はみられるが膠原線維の形成は不良である。また, 基底膜がところどころ欠如し断続的に存在する場合 (図 14), あるいは間質側において, 線維芽細胞

の上皮への接近がなく, 多核白血球などが直接上皮に近接した場合にも基底膜の形成はみられず, 膠原線維の発育も不良であった (図 15)。さらに, 上皮の原形質の一部が間質側に突出している場合には突出部には基底膜は欠如し, 膠原線維の形成も不良であった (図 16)。

以上は基底膜の形成不良の場合であるが, MNNG 投与後比較的長期飼育例においては反対に基底膜の過形成状態が観察された。すなわち, 投与後 52 週目ラットの上皮細胞直下に基底膜が波状にうねり, その外側には線維芽細胞を認めるも膠原線維の発育は悪く, 未熟な microfibril を認めるに過ぎない (図 18)。また, 53 週目ラットでは基底膜が幾重にも多層してみられ (図 17), 近接せる線維芽細胞には粗面小胞体の発育は不良で, 周囲の膠原線維の形成も悪い。さらに, 投与後 52 週目のものでは, 増殖腺管に近接せる線維芽細胞周囲にも部分的に基底膜様構造が観察された (図 19)。

以上, 電顕的に観察された基底膜の種々の変化を模式図で示すと図 20 のごとく 10 型に分類することができる。

No. 1 は病巣 A 型にみられるもので線維芽細胞は上皮に近接し, その外側には膠原線維束が取り巻いており, 基底膜の形成も良好なことを示している (図 10 参照)

No. 2 より No. 10 までは病巣 B 型にみられるもので, 増殖腺管を取り囲む膠原線維の形成が悪く, 光顕的に観察された fibroblast sheath の形成が不良であり, 基底膜はこのように種々に変化していることを示している。すなわち, No. 2 では基底膜がところどころ欠如し (図 14 参照), No. 3 は原形質が間質側に突出しその部の基底膜は欠如しているもの (図 16 参照), No. 4 は多核白血球が上皮に密接して存在し基底膜は欠如するもの (図 15 参照), No. 5 は線維芽細胞が密接して存在し基底膜が欠如するもの (図 11 参照), No. 6 は基底膜は細く顆粒状に連続しているものであり (図 12 参照), No. 7 は線維芽細胞が近接しても基底膜が全く欠如しているものである (図 13 参照)。

No. 8 は基底膜が波状にうねっているもの (図 18 参照), No. 9 は基底膜が幾重にも重層しており (図 17 参照), No. 10 では線維芽細胞周囲に基底膜様構造が散在することを示している (図 19 参照)。

第 4 章 総括ならびに考按

1. 実験胃癌における癌の組織学的診断基準

Stewart³⁾は組織学的に漿膜浸潤のあるものを癌と判定しているが、これは増殖進展を主体にしたもので、異型性などの形態学的特徴は考慮されておらず診断基準として十分とはいえない¹⁰⁾¹¹⁾また、MNNGの実験胃癌において、リンパ節、肝などへの転移については高橋¹²⁾木暮ら¹³⁾により報告されているが、ヒト胃癌に比較しまれであり、本実験においても転移はみられず、これらの点からもヒト胃癌とは相違しており、実験胃癌における癌としての組織学的診断基準はいまだ確立されていない。そのため、本実験においては腺管の腫瘍性増殖病巣を細胞ならびに構造異型度からA、B、Cに分類し、その分類に従い基底膜を含む周辺の間質の態度を検討した。すなわち、病巣B型の基底膜は図20のNo. 2～No. 10に示すごとく、形成不全から過形成に至る種々の状態が観察され、特に原形質突出とその部の基底膜の欠如、さらに基底膜の多層化などはヒトの低分化腺癌でしばみられる所見である¹⁴⁾¹⁵⁾また、fibroblast sheathについても病巣B型では形成不良であるが、同様にヒト胃癌¹⁵⁾や大腸癌¹⁶⁾にも fibroblast sheath の形成が不良であり両者は類似した所見である。これらのことより病巣C型ばかりでなく、漿膜浸潤のない病巣B型でも組織学的に悪性腫瘍性の変化と考えたい。なお、1年以上の長期飼育ラットにも病巣A型が多数みられることは、同時期のものに筋層や漿膜に達する病巣も存在することと考えあわせると、組織発生の考察において興味深いことである。

2. 基底膜の起原と形成機構

基底膜は従来結合組織基質の凝縮したものと考えられたが¹⁷⁾近年上皮由来とされている¹⁸⁾Pierce¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾は基底膜物質は上皮から分泌され、しかも lamina densa のみに特異性を持つ抗体が上皮細胞の小胞体にも認められるが、結合組織成分とは全く無関係であると証明している。生化学的には基底膜は proline, hydroxy proline に富む collagen を含むが、間質の collagen のとき640Åの周期性横紋はみられず30～40Åの細線維構造がみられ²³⁾その collagen はα鎖のみから成っている²⁴⁾一般に collagen は線維芽細胞より分泌されると考えられてきたが、H³-proline を使用し、上皮細胞からも proline が基底膜に分泌されることが確かめられている²⁵⁾

基底膜形成における結合組織細胞の役割について Pierce は癌細胞で²¹⁾Dodson²⁶⁾は角膜上皮などの実験で全く無関係に基底膜が形成されると報告しているが、Kallman²⁷⁾ Hay²⁸⁾は上皮と間質の両者が基底

膜形成に寄与していると考えている。しかしながら、基底膜が上皮細胞直下に一定の構築を作る機構は明確でなく、この点に関し梶川²⁹⁾は3'-methyl-DAB 投与ラットにおける胆管上皮細胞増殖時の基底膜形成過程において紡錘型の線維芽細胞様の結合組織細胞の関与を重視し、これを随伴細胞と仮称し他の線維芽細胞と区別している。

本実験においても基底膜の形成には上皮の異型性の程度のみならず、周辺の間質、特に線維芽細胞の形態ならびに機能により種々の像(図20)が観察されたことより、たとえ上皮細胞あるいは線維芽細胞から基底膜物質が分泌されるにせよ、基底膜形成には上皮ばかりでなく線維芽細胞の役割が重要であると考えられる。

3. 癌腫における基底膜について

古くより癌腫が積極的に基底膜を破壊すると考えられ、この破壊像をもって浸潤癌と診断された。また、いまだ基底膜を破っていないものを Carcinoma in situ³⁰⁾と呼び、いずれも癌腫は基底膜を破壊すると考えたが、武藤³¹⁾は広範な研究から³²⁾³³⁾浸潤癌といえども基底膜を認める場合があり、基底膜の形成良好なものから形成不全なものまで各種の段階が存在し、基底膜破壊という過程は客観的事実として記載されたものではないと批判している。

電顕的にも癌腫に基底膜を認め得るがその形成は非連続的である³⁴⁾特に、ヒト胃癌において分化型腺癌では基底膜の形成は良好で、部分的に欠損などを認めるが、低分化型癌では基底膜の形成は不良で全く欠如せるものが多い¹⁴⁾しかし、一部においては多層化などの過形成もみられる¹⁵⁾

本実験では病巣A型では基底膜の形成は良好であったが、病巣B型では図20のNo. 2よりNo. 10まで多種の像が観察され、特に線維芽細胞の接近にもかかわらず基底膜の欠如するもの、多層あるいは波状にうねるもの、さらに原形質が突出しその部に基底膜が欠如している像はヒト胃の低分化型癌のほかにも腸癌³⁵⁾肺癌³⁶⁾子宮癌³⁷⁾においても観察されている。

これら基底膜の欠如あるいは形成不全は、上皮側の異型性の有無の他に間質側、特に線維芽細胞の状態に関係するが、さらには基底膜に collagen を認める²⁴⁾²⁵⁾ことから collagenase の作用が考慮されねばならない。collagenase は線維芽細胞のみならず、むしろ上皮細胞から多く分泌され²⁷⁾しかも collagenase 処理により基底膜を消失せしめ得る³⁸⁾³⁹⁾

以上のことより癌腫における基底膜の形成に関し

ては上皮と間質, すなわち線維芽細胞, 膠原線維, AMPS, collagenase などが関与しているものと考察される。

4. 基底膜の役割

基底膜には細胞自体の恒常性維持と, 間質と上皮の間の barrier としての働きが考えられる²⁴⁾他に, 癌の浸潤に対する防禦作用の有無が問題となる。浸潤性の低分化型癌では基底膜形成が悪く, 分化型癌では比較的良好であることは前述のごとくであり, 基底膜に防禦作用が存在し, 基底膜の消失したところから癌浸潤が生ずると考えられた⁹⁾しかし, 癌細胞による基底膜の形成は, 悪性化の後も正常機能で作られることより, 基底膜が腫瘍浸潤に抵抗せんとする宿主の防禦的機構とは考え難いとの説²¹⁾もある。また, ヒト胃癌において基底膜の過形成状態と考えられる多層化は, 分化型よりもむしろ低分化型癌で観察されることは防禦作用の点から考えると不都合である。

本実験において, 病巣B型の基底膜が形成不良のものから多層化を示した過形成状態まで観察されたが, 基底膜に癌進展に対する防禦作用が存在するならば, これら増殖病変の早期に多層化などの過形成状態が多く観察されるはずである。しかし, 多層化せる基底膜は必ずしも増殖初期に認められない。すなわち, 基底膜が防禦作用により形成されるのではなく, 前述のごとく上皮と間質との相互作用により形成されると考えるのが妥当であろう。

5. fibroblast sheath

腺管周囲には上皮細胞に沿って線維芽細胞が存在し, その外側には膠原線維が取り巻いて連続した層を形成しており, これを epithelioid sheath⁴⁰⁾ sub-epithelial connective tissue sheath¹⁶⁾あるいは pericryptal fibroblast sheath⁴¹⁾と呼んでいる。この上皮細胞と線維芽細胞は正常では synchronous migration を行い, 正常構造を保持するために両者が1単位として作用している⁴¹⁾すなわち, 上皮と間質の間には相互作用が存在し, それによって構造の維持, 再生, 機能が保たれていると考えられる⁴²⁾

本実験についてみると病巣A型では fibroblast sheath の形成が良好で, しかも上皮には異型が少なく, 両者の間の基底膜は連続的であるのに対し, 病巣B型では fibroblast sheath は非連続的で, 腺管を取り囲むことなく, 基底膜の欠如や多層化などの種々の変化がみられた。これらは上皮—基底膜—fibroblast sheath が常に協調しつつ相関関係を持ち, この相関作用が比較的良好な状態が病巣A型で

あり, 他方破綻をきたした場合が病巣B型と考えられる。Kaye⁴³⁾は大腸病変のうち悪性化の傾向をもつ adenomatous polyp では fibroblast sheath は未分化であることを認め, これらの事実より上皮と間葉系の相互作用の不均衡を電顕的に証明した。本実験では fibroblast sheath の形成の良否は腫瘍性増殖の影響をうけるのみならず, その他の因子として MNNG の作用を考慮せねばならない。

6. MNNG の作用

MNNG は強い突然変異誘起物質として知られていたが⁴⁴⁾杉村ら⁴⁵⁾は1966年ラット皮下に注射し可移植性の肉腫を作ることに成功し, さらに1967年MNNGを水溶液としてラットに経口投与し腺胃に胃癌を高率に発生せしめた⁴¹⁾このMNNGの発癌機構についてはMNNGがDNAと反応し7-methylguanineのようなメチル化を起こすことより突然変異として説明することができるが, 他方MNNGが蛋白質と結合しニトロロアミジノ化を起こすことより分化の異常としても説明できる⁴⁶⁾

また, 本実験においても観察されたごとく骨, 軟骨組織, 扁平上皮化生などが出現することより癌化の過程を分化の異常の一つのタイプとして説明できると述べている⁴⁷⁾

MNNGを経口投与した場合, 胃においてはまず胃粘膜の上皮に作用することは論をまたないが, 間質側の変化については病巣BおよびC型で腺管周囲の fibroblast sheath が形成不良で, しかも膠原線維束の方向が一定でなく, 線維芽細胞の形態ならびに機能が種々に変化していることが観察された。このことは, 上皮の変化による二次的なもの, あるいは上皮細胞から誘導⁴⁸⁾されたとも考えられるが, 多くの線維肉腫⁴⁹⁾や多種類の非上皮性腫瘍(表5)が発生していることはMNNGが間葉系細胞にも作用していることが示唆される。これに関し, 田原⁵⁰⁾はMNNGによる非上皮性腫瘍の発生母細胞として多分化能を有する線維芽細胞類似の幼若間葉細胞を想定しているが, いずれにせよMNNGが間葉系細胞にも作用しているものと推測される。

MNNG投与によるラット腺胃の基底膜の態度を中心として上皮および間質について検討した結果, MNNGは上皮ばかりでなく間葉系細胞にも作用し, 上皮側の変化としては病巣A型のみならずB型, C型の病変を生じ, また間葉系の変化としては fibroblast sheath の変化や線維肉腫などの非上皮性腫瘍を生ぜしめ, それらの結果として種々の基底膜の変

化を示すものと考えられる。さらに、基底膜にはムコ多糖体や collagen も含まれることより、基底膜の形成にはこれら基質が関与していることが考えられる。

また、collagenase の作用により基底膜が消失されることや collagenase の消長が癌の進展に関与し⁵⁾、しかも上皮側のみならず間葉系細胞からも分泌されていることより、これらの関係を図示すると図 21のごとくである。

第 5 章 結 言

ラットに MNNG を投与して生じた腺胃の腫瘍性増殖病変を異型性の程度により病巣 A, B, C 型の 3 種に分類し、基底膜を中心にした間質の変化を組織化学的ならびに電顕的に検討し、つぎの結果を得た。

1. 有効匹数 69 匹中上皮の腫瘍性増殖病巣は 67 病巣で、A 型は 43 病巣、B 型は 20 病巣、C 型は 4 病巣である。

2. 深達度別では m: 7 病巣, sm: 42 病巣, pm: 11 病巣, s(+): 7 病巣である。

3. 病巣 A 型では上皮の基底膜および腺管周囲の fibroblast sheath の形成はともに良好である。

4. 病巣 B 型では fibroblast sheath の形成は不良で、基底膜は形成不全のものから過形成まで種々の状態が観察され、ヒト胃癌の低分化型腺癌と類似の所見を呈する。

5. 長期飼育例にも病巣 B 型、C 型ばかりでなく病巣 A 型も多くみられる。

6. 実験胃癌の組織学的判定基準を基底膜および間質からも検討し、病巣 B, C 型は癌腫と判定しえると考えられた。

7. 基底膜の形成には上皮の変化のみならず、間質特に線維芽細胞が関与しているものと考えられる。

8. 間質側の種々の変化や、多数の非上皮性腫瘍の発生がみられることより、MNNG は上皮のみならず間葉系細胞にも作用しているものと推測される。

稿を終わるに臨み御指導、御校閲を賜った恩師田中早苗教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導下さった岡島邦雄助教授ならびに藤井康宏講師に深謝いたします。

文 献

- 1) Sugimura T. and Fujimura S.: Tumor Production in Glandular Stomach of Rat by N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. *Nature*, **216**: 943-944, 1967.
- 2) 今井 環, 大塚 久: 腫瘍に対する生体反応, *最新医学*, **11**: 1808-1819, 1956.
- 3) Stewart H. L., Snell K. C., Morris H. P., Wagner B. P. and Ray F. E.: Carcinoma of the Glandular Stomach of Rats Ingesting N, N'-2, 7-Fluorenylenebisacetamide. *Nat. Cancer. Inst. Monogr.*, **5**: 105-139, 1961.
- 4) Lee G. Luna: *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, McGraw-Hill Co. New York, 1968.
- 5) Luft J. H.: Ruthenium red staining of the striated muscle cell membrane and the myotendinal junction. *Electron microscopy II*, p65, Maruzen, Tokyo, 1966.
- 6) Yamada E.: The fine structure of the renal glomerulus of the mouse. *J. biophysic. biochem. Cytol.*, **1**: 551-579, 1955.
- 7) Bennett H. S.: Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.*, **11**: 14-23, 1963.
- 8) Ashworth C. T., Stemberge V. A., Luibel F. J.: A study of basement membranes of normal epithelium, carcinoma in situ and invasive carcinoma of uterine cervix utilizing electron microscopy and histochemical methods. *Acta Cytol.*, **5**: 369-384, 1961.
- 9) Strong E. W., McDivitt R. W. and Brasfield R. D.: Granular Cell Myoblastoma. *Cancer*, **25**: 415-422, 1970

- 10) 大原 毅：胃潰瘍癌の実験的研究，癌の臨床，17：543-550，1971.
- 11) Bralow S. P. : Experimental gastric carcinogenesis. *Digestion*, 5 : 290-310, 1972.
- 12) Takahashi M., Fukushima S. and Sato H. : Carcinogenic effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine with various kinds of surfactant in the glandular stomach of rats. *GANN*, 64 : 211-218, 1973.
- 13) 木暮喜久子，河村卓，藤村真示，桑原紀之，高山昭三，下里幸雄，杉村隆：N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンおよびその誘導体，特にN-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンによるハムスターの実験胃癌について。第29回日本癌学会総会記事，P 66，1970.
- 14) 土屋良武：ヒト胃癌間質に関する電子顕微鏡的研究。金沢大学十全医学会雑誌，78：267-293，1969.
- 15) 花房 伸，岡島邦雄，藤井康宏，荒木京二郎，石川 純，伊藤国昭，田中早苗：人胃癌進展と間質増生に関する電顕及び酵素組織化学的研究。第33回日本癌学会総会記事，P 175，1974.
- 16) Lane N., Kaplan H. and Pascal R. R. : Minute adenomatous and hyperplastic polyps of the colon : divergent patterns of epithelial growth with specific associated mesenchymal changes. *Gastroenterology*, 60 : 537-551, 1971.
- 17) Gersh I., Catchpole H. R. : The organization of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease and growth. *Am. J. Anat.*, 85 : 457-521, 1949.
- 18) Kurtz S. M., Feldman J. D. : Experimental studies on the formation of the glomerular basement membrane. *J. Ultrastructure Research*, 6 : 19-27, 1962.
- 19) Pierce G. B., Midgley A. R. and Sri Ram J. : The histogenesis of basement membranes. *J. Exp. Med.*, 117 : 339-348, 1963.
- 20) Pierce G. B. Jr., Beals T. F., Sri Ram J. and Midgley A. R. Jr. : Basement membranes . IV. Epithelial origin and immunologic cross reactions. *Am. J. Path.*, 45 : 929-961, 1964.
- 21) Pierce G. B. Jr. : Basement membranes. VI. Synthesis by epithelial tumors of the mouse. *Cancer Res.*, 25 : 656-669, 1965.
- 22) Pierce G. B., Nakane P. K. : Basement membranes. Synthesis and deposition in response to cellular injury. *Lab. Invest.*, 21 : 27-41, 1969.
- 23) Kefalides N. A. : Comparative biochemistry of mammalian basement membranes. *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix.*, 1 : 535-573, 1970.
- 24) Kefalides N. A. : Isolation of a collagen from basement membranes containing three identical α chains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45 : 226-239, 1971.
- 25) Hay E. D. and Dodson J. W. : Secretion of collagen by corneal epithelium. I. Morphology of the collagenous products produced by isolated epithelia grown on frozen-killed lens. *J. Cell. Biol.*, 57 : 190-213, 1973.
- 26) Dodson J. W. and Hay E. D. : Secretion of collagenous stroma by isolated epithelium grown in vitro. *Exp. Cell Res.*, 65 : 215-220, 1971.
- 27) Kallman F. and Grobstein C. : Source of collagen at epitheliomesenchymal interfaces during inductive interaction. *Develop. Biol.*, 11 : 169-183, 1965.
- 28) Hay E. D. and Revel J. P. : Autoradiographic studies of the basement lamella in ambystoma. *Develop. Biol.*, 7 : 152-168, 1963.
- 29) 梶川欽一郎：基底膜（その形成と病的変化）。結合組織，3：7-14，1971.
- 30) Broders, A. C. : Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. *J. A. M. A.*, 99 : 1670-1674, 1932.
- 31) 武藤幸治：基底膜の形態学的研究。日病会誌，48：961-999，1959.
- 32) 山田 豊：子宮癌に関する病理形態学的研究，特に癌組織における基底膜の態度について。日大医誌，18：1319-1337，1959.

- 33) 宮田雅夫：胃癌組織に於ける基底膜に就いて。日大医誌, **15**：728-739, 1959.
- 34) 関 正利, 寺尾 清, 岡本達也, 滝沢延次郎：人癌の電子顕微鏡的研究 (第IV報), 基質の変化について。日病会誌, **51**：494, 1962.
- 35) 小池良夫：腸の良性および悪性腫瘍における基質に関する病理組織学的ならびに電子顕微鏡的研究。千葉医会誌, **45**：60-79, 1969.
- 36) 小形岳三郎, 林 豊：人肺癌基質の電子顕微鏡的研究。第30回日本癌学会総会記事, p268, 1971.
- 37) William B. Riley, Jr. and Erle E. Peacock Jr.: Identification, Distribution and Significance of a Collagenolytic Enzyme in Human Tissues. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **124**：207-210, 1967.
- 38) Bernfield M. R., Banerjee S. D. and Cohn R. H. : Dependence of salivary epithelial morphology and branching morphogenesis upon acid mucopolysaccharide-protein (proteoglycan) at the epithelial surface. J. Cell Biol., **52**：674-689, 1972.
- 39) Kahl F. R. and Pearson R. W. : Ultrastructural studies of experimental vesiculation. II Collagenase. J. Invest. Derm., **49**：616-631, 1967.
- 40) Deane H. W. : Some Electron Microscopic Observations on the Lamina Propria of the Gut, with Comments on the Close Association of Macrophages, Plasma Cells, and Eosinophils. Anat. Res., **149**：453-473, 1964.
- 41) Pascal R. R., Kaye G. I. and Lane N. : Colonic pericryptal fibroblast sheath : Replication, migration and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. I. Autoradiographic studies of normal rabbit colon. Gastroenterology, **54**：835-851, 1968.
- 42) Kaye G. I., Lane N., Pascal R. R. : Colonic pericryptal fibroblast sheath : Replication, migration, and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. II. Fine structural aspects of normal rabbit and human colon. Gastroenterology, **54**：852-865, 1968.
- 43) Kaye G. I., Pascal R. R. and Lane N. The colonic pericryptal fibroblast sheath : replication, migration and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. III. Replication and differentiation in human hyperplastic and adenomatous polyps. Gastroenterology, **60**：515-536, 1971.
- 44) Mandell J. D. & Greedberg J. : A new chemical mutagen for bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. Biochem. Biophys. Res. Commun., **3**：575-577, 1960.
- 45) Sugimura T., Nagao M. and Okada Y. : Carcinogenic Action of N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Nature, **210**：962-963, 1966.
- 46) 斉藤貴生, 杉村隆：ニトロソグアニジンによる実験胃癌研究の進歩, 癌の臨床, **16**：503-512, 1970.
- 47) 杉村隆, 藤村真示, 長尾美奈子, 細井宏益, 木暮喜久子, 斉藤貴生, 横島徹喜, 佐藤茂秋, 穂積本男, 太田圭子：N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンによる発癌実験をめぐって。医学のあゆみ, **69**：19-24, 1969.
- 48) 小林忠義：病理学領域における組織誘導の問題, 日病会誌, **50**：91-120, 1961.
- 49) Fujimura S., Kogure K., Sugimura T. and Takayama S: The Effect of Limited Administration of N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on the Induction of Stomach Cancer in Rats. Cancer Res., **30**：842-848, 1970.
- 50) 田原栄一, 山田明：N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NG) によるラット胃腸管系の非上皮性腫瘍の発生について。第31回日本癌学会総会記事, P 45, 1972.
- 51) 伊藤国昭, 岡島邦雄, 藤井康宏, 荒木京二郎, 石川純, 花房伸, 田中早苗：人胃癌における組織内 collagenase と癌壁内進展について。第33回日本癌学会総会記事, P 185, 1974.

附 図 説 明

Ep: 上皮細胞, Bm: 基底膜, Fb: 線維芽細胞, Cl: 膠原線維, Cp: 原形質突出, Le: 多核白血球.

図1. 対照群. Ruthenium red 染色

腺管上皮細胞の原形質膜, 基底膜, interdigitation, 接合斑および基質に Ruthenium red の沈着を認める. 1b では上皮細胞の原形質膜と基底膜の間に透明帯が識別され, 基底膜には Ruthenium red が顆粒状に沈着している. (1a×20,000, 1b×60,000)

図2. 対照群, 上皮細胞の基底膜が濃染され, 直下には細長い線維芽細胞が観察される (矢印). (×2,300 colloid iron 染色)

図3. 腺管周囲は膠原線維と細長い線維芽細胞により構成された fibroblast sheath により取り巻かれている. (×600, HPS 染色)

図4. 病巣A型, 投与66週目, 粘膜下層におよぶ. 構造異型を認めるも細胞異型はほとんどみられない. (H. E. 染色, ×260)

図5. 病巣A型, 投与35週目, 基底膜は連続して認められ, その外側には細長い線維芽細胞がみられる (矢印). (×2,300, colloid iron 染色)

図6. 病巣B型, 投与46週目, 粘膜下層まで浸潤し, 筋層を強く圧迫している. 増殖腺管には構造異型が著明である. (H. E. 染色, ×100)

図7. 病巣B型, 投与46週目, 膠原線維は増殖腺管を取り囲むことなく散在し, fibroblast sheath は認められない. (HPS 染色, ×400)

図8. 病巣B型, 投与46週目, 腺上皮細胞と間質との間に基底膜は認められない (矢印). (×2,300, colloid iron 染色)

図9. 病巣C型, 投与58週目, 漿膜下層におよび, 先進部では腺管構造がみられず, 細胞異型も高度である. (H. E. 染色, ×100)

図10. 病巣A型, 増殖腺管周囲には膠原線維と線維芽細胞より構成される fibroblast sheath および基底膜の形成はともに良好である (×9,600)

図11. 病巣B型, 投与33週目, 基底膜は非連続的で線維芽細胞が上皮細胞に密接している部には基底膜は認められず (大矢印), 小矢印の部に基底膜様構造を認める. 膠原線維には横紋は不明瞭で, 周囲には微細顆粒状ないしフィラメント状物質が認められる. (×18,000)

図12. 病巣B型, 投与53週目, 基底膜は150~300 Å と細く, 顆粒状に連続しているに過ぎない. 膠原線維の発育は不良である. (×14,000)

図13. 病巣B型, 投与53週目, 上皮細胞は細胞小器官に乏しく, 線維芽細胞が近接しているが基底膜は認められない. 周囲には膠原線維の発育は不良で, 微細顆粒状ないしフィラメント状物質を認める. (×24,000)

図14. 病巣B型, 投与53週目, 上皮細胞には多数の ribosome を認め, 基底膜はところどころ断裂している. 膠原線維の形成も不良である. (×20,000)

図15. 病巣B型, 投与52週目, 上皮細胞は大きな核と核小体を有し, 細胞小器官に乏しい原形質突出がみられる. 間質には多核白血球が上皮に接近して存在し, 基底膜は認められず, 矢印の部に基底膜様構造を認めるに過ぎない. 膠原線維は認められない. (×12,000)

図16. 病巣B型, 投与53週目, 上皮細胞の原形質が間質側に突出した部 (大矢印) では, free ribosome の他は細胞小器官に乏しく, この部には基底膜が認められない. 小矢印の部には基底膜を認める. (×20,000)

図17. 病巣B型, 53週目, 基底膜は上皮下に幾重にも多層化してみられる (矢印). (×20,000)

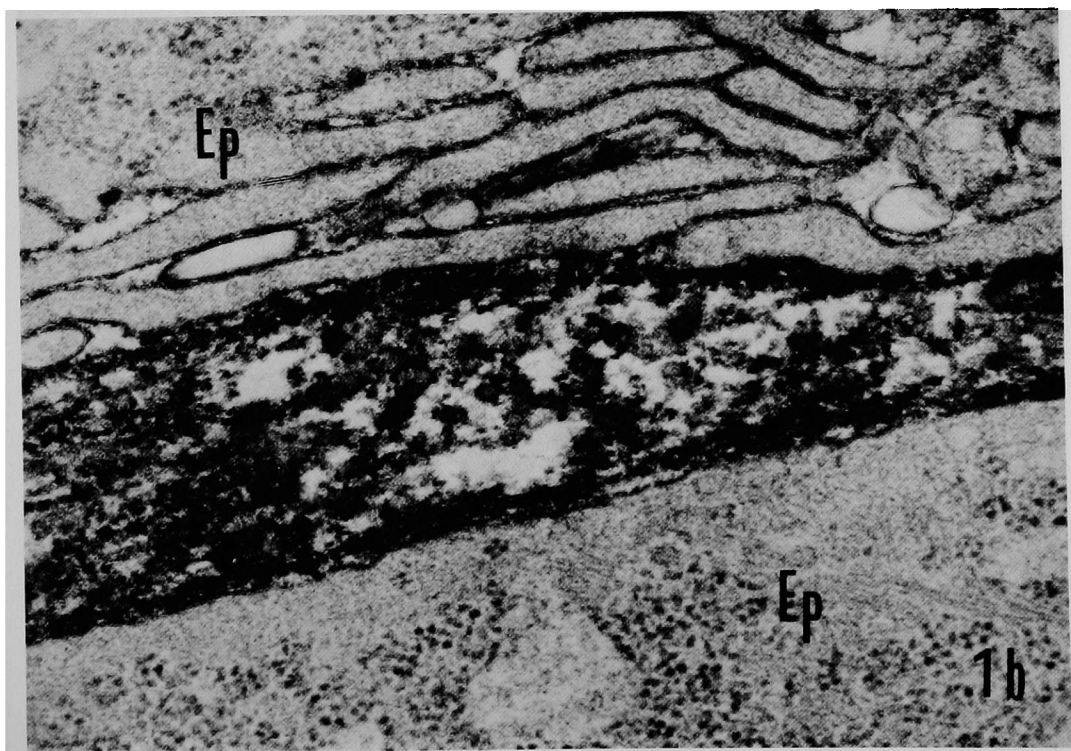
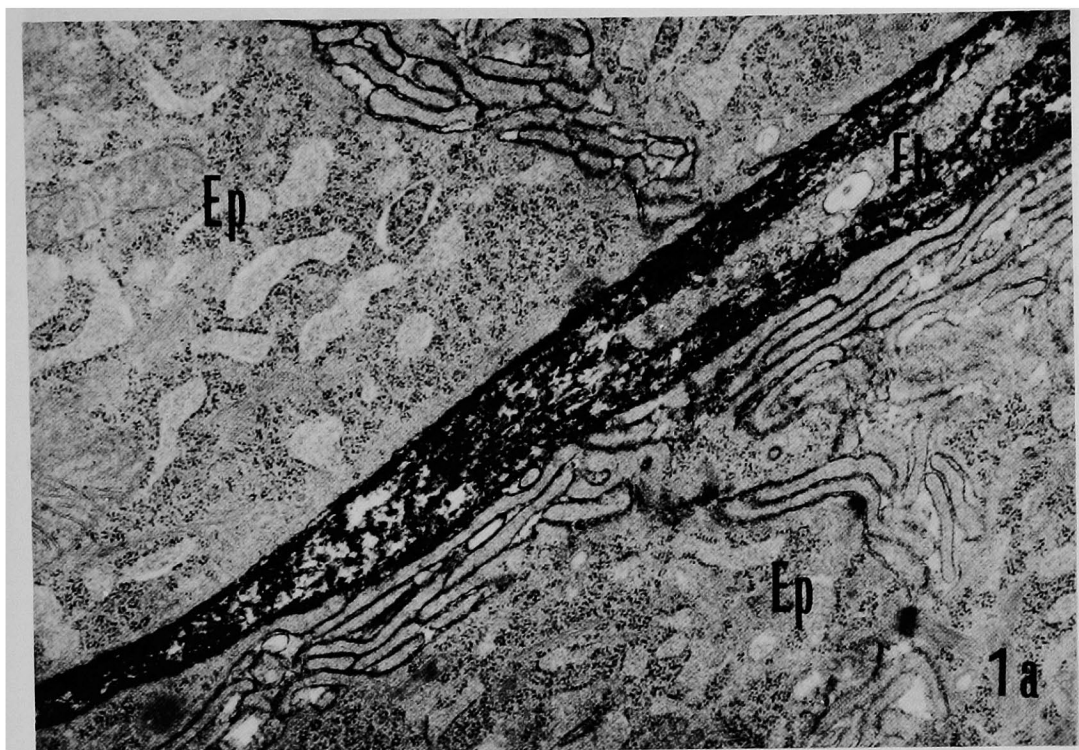
図18. 病巣B型, 52週目, 増殖腺管周囲の基底膜は波状にうねっている. 周辺の膠原線維の発育は不良である. (×18,000)

図19. 病巣B型, 52週目, 線維芽細胞周囲に矢印のごとく, ところどころ基底膜様構造を認める. (×20,000)

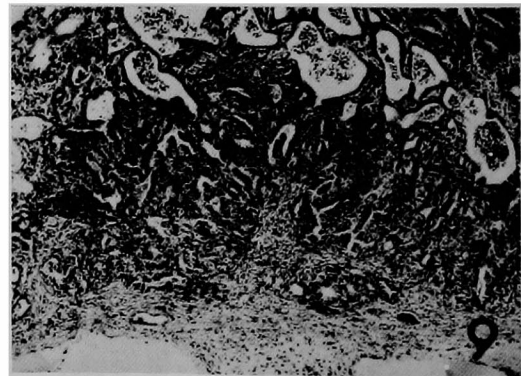
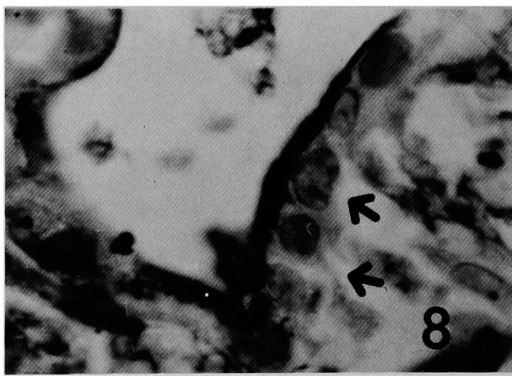
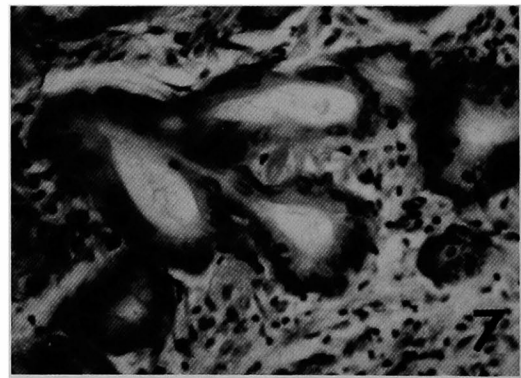
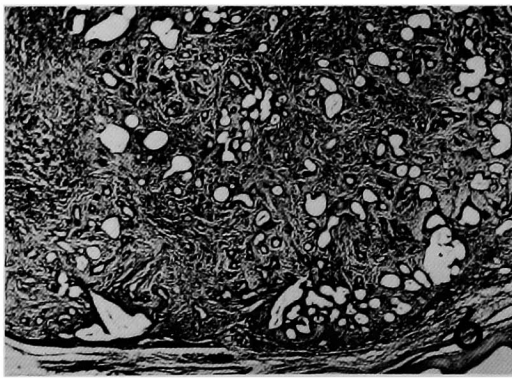
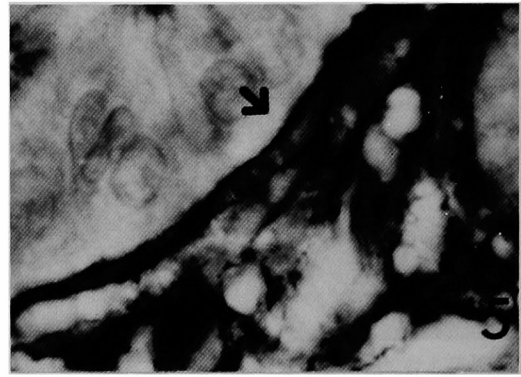
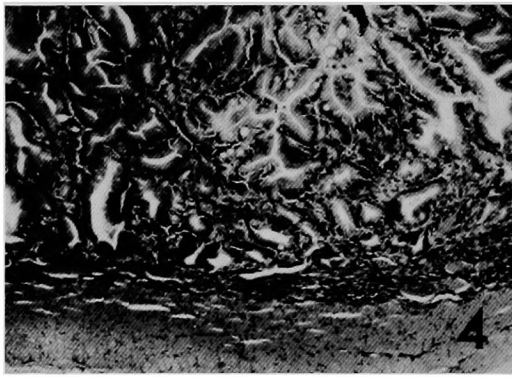
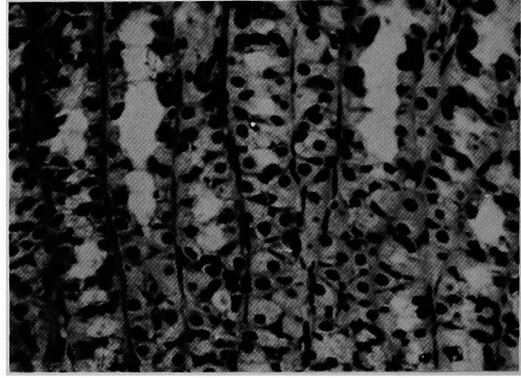
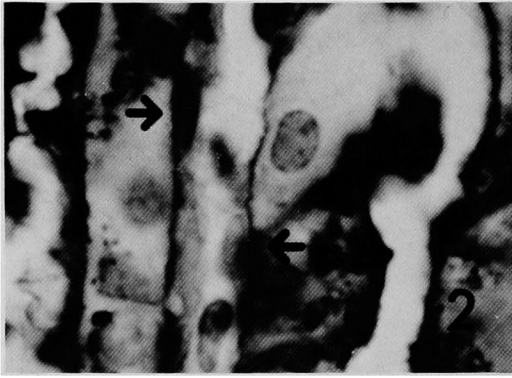
図20. 基底膜の種々の変化. No 1 は病巣A型, No 2 よりNo10までは病巣B型における変化を示す.

図21. MNNG の作用と基底膜の形成機序に関する模式図

石川純論文附図



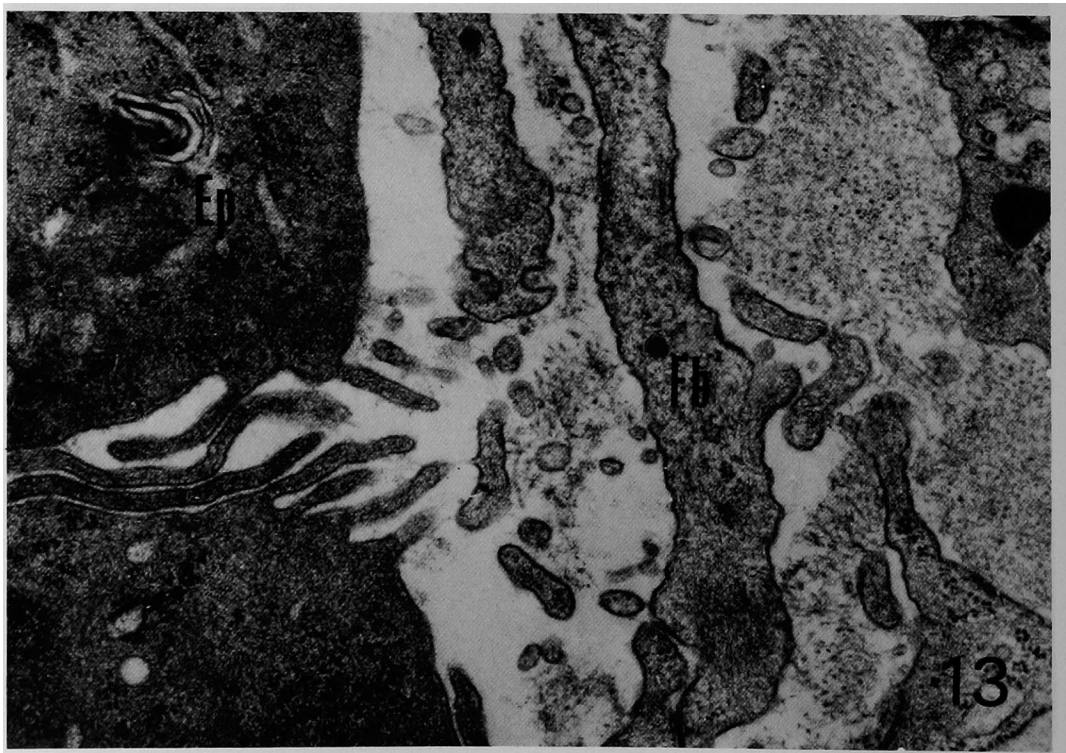
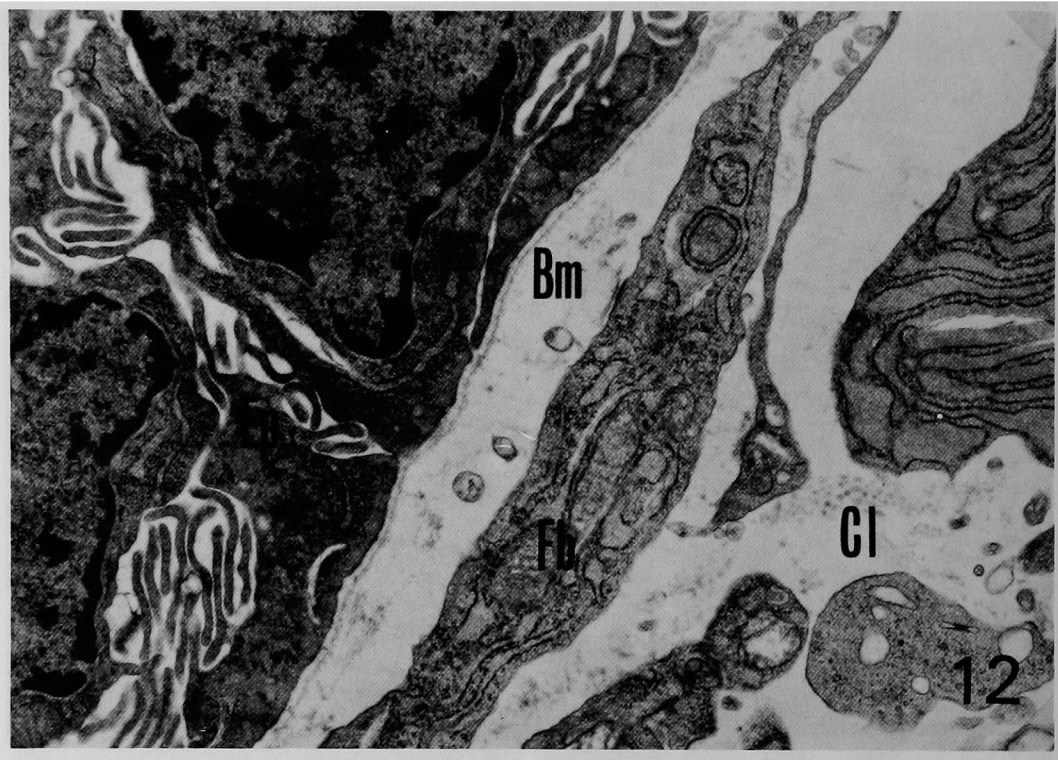
石川純論文附図



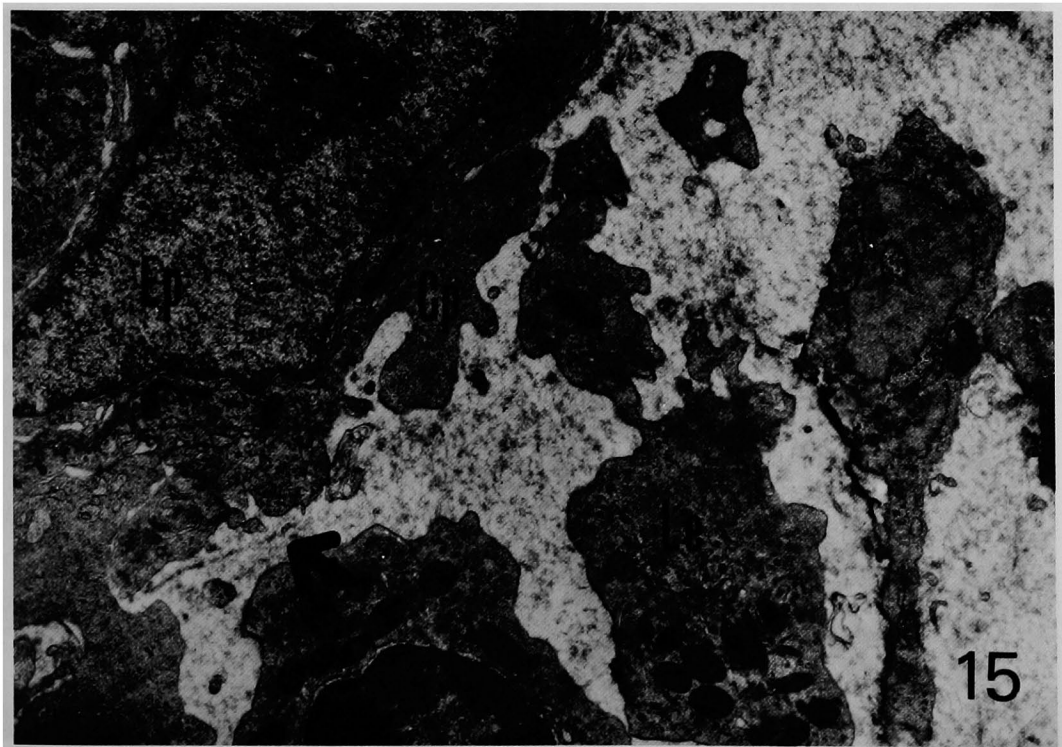
石川純論文附図

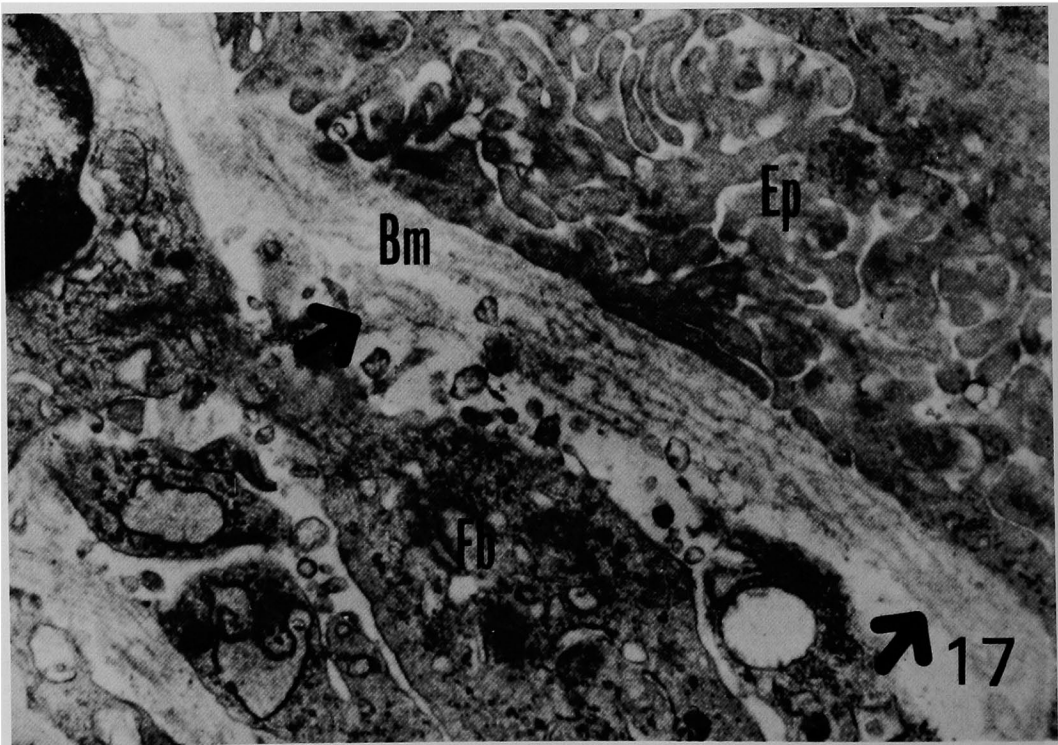
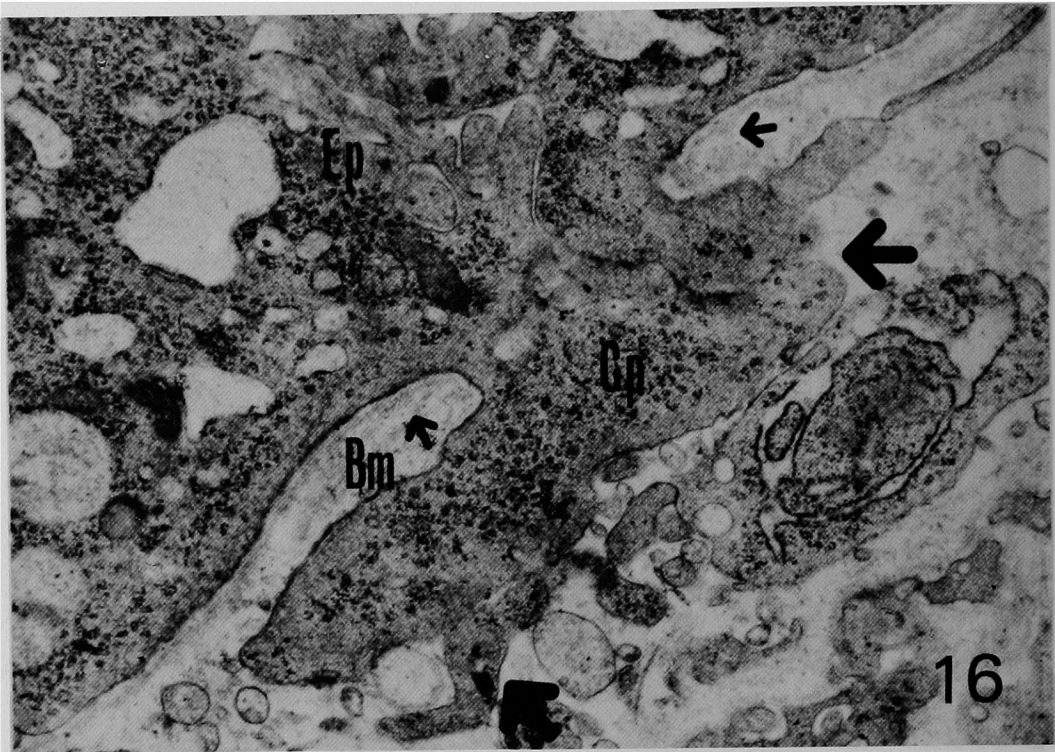


石川純論文附図

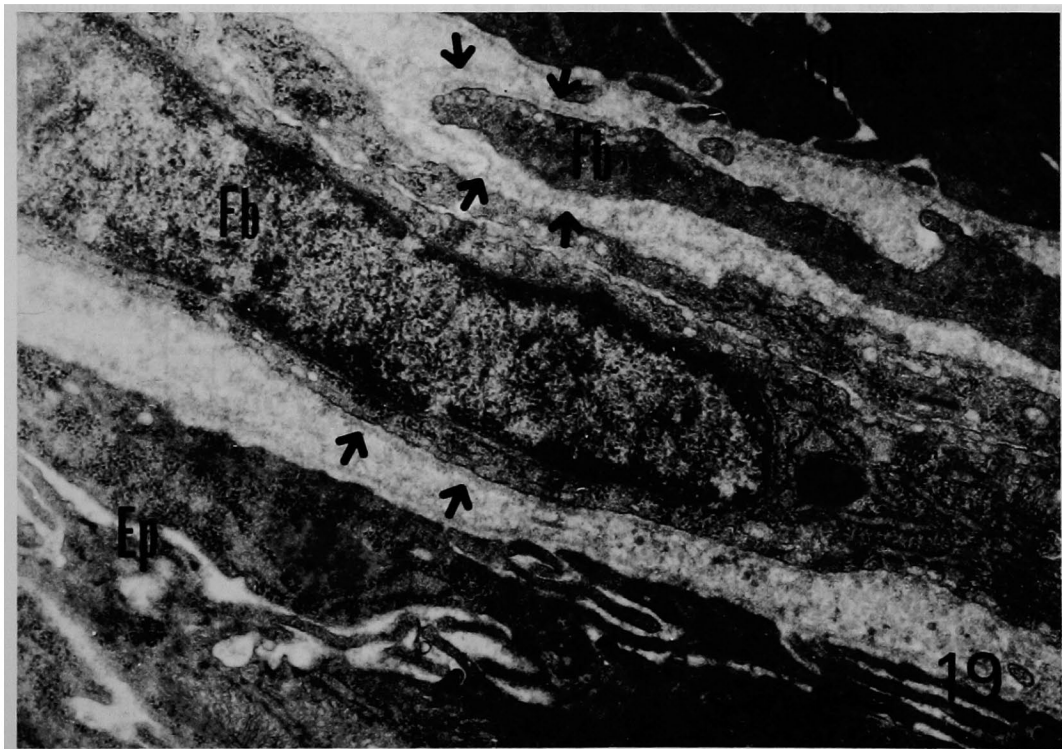
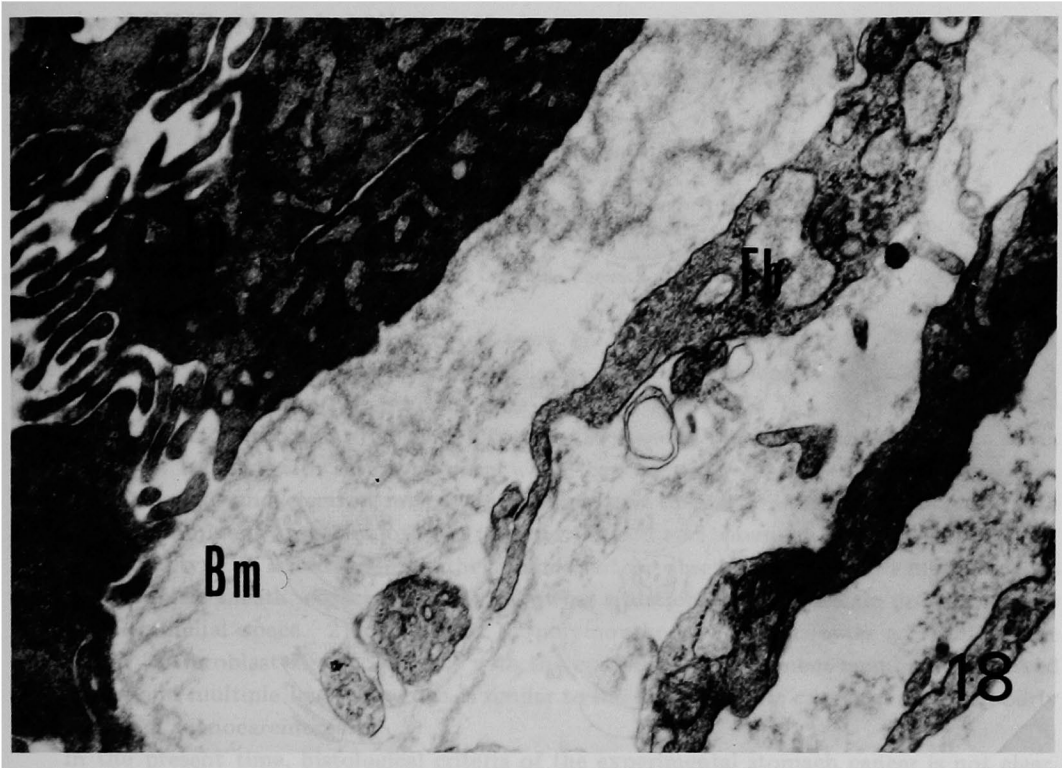


石川純論文附図

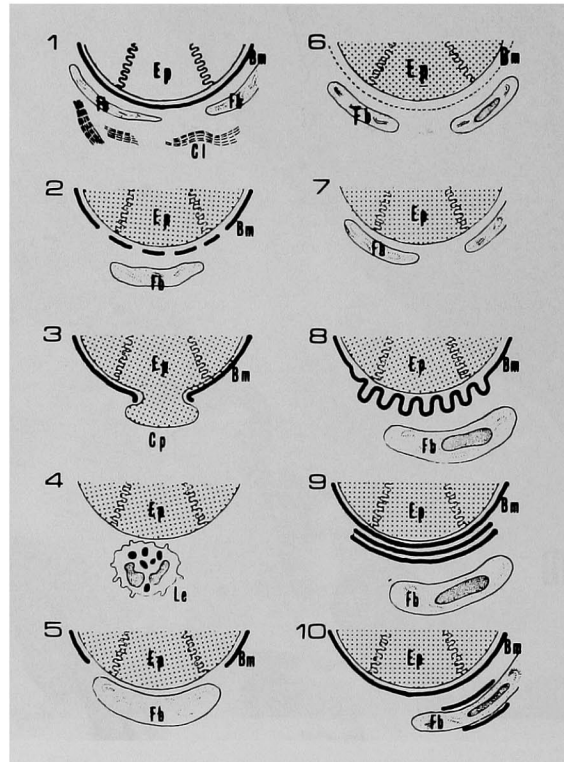




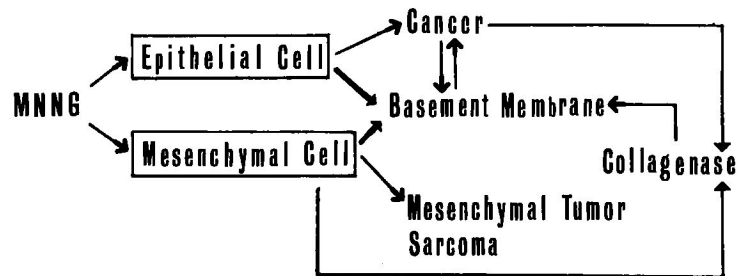
石川純論文附図



石川純論文附図



20



21

**Study of stromal aspect of stomach cancer in rat induced
by MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) in special reference
of morphological change of basement membrane**

by

Makoto ISHIKAWA

1st Dept. of Surgery, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Director : Prof. S. Tanaka, M.D.)

Rats were given MNNG perorally and were killed periodically. In the effective 69 rats, after 26 weeks, 67 lesions of glandular epithelial proliferation developed in glandular stomach of rats. These lesions were classified in three types, as follow: 1) Type A (43 lesions) with scanty cellular and structural atypism. 2) Type B (20 lesions) with moderate grade of atypism. 3) Type C (4 lesions) with severe atypism which can be easily diagnosed as carcinomatous.

In histological and electron microscopical aspect of their stroma, type A lesions are surrounded by prominent formation of both fibroblast sheath and basement membrane.

However, type B lesions exhibit the reminiscent or absence of basement membrane, as well as fibroblast sheath, especially in the following situation: 1) cytoplasmic protrusion into the extra-epithelial space. 2) occurrence of polymorphonuclear leucocytes adjacent of the epithelium 3) fibroblast directly contact with the epithelium 4) basement membrane appeared corrugated and multiple layered, which is similar to the human gastric cancer, mainly as poorly differentiated adenocarcinoma.

In the present time, histological criteria of the experimental stomach cancer is not clear. But, in this study the author suggest that the type B lesions can be concluded to stomach carcinoma, because various changed of the basement membranes in the type B lesions are similar to poorly differentiated adenocarcinoma of human gastric cancer.

The changing mode of the basement membrane is contributed not only by epithelial cells but also by mesenchymal cells, especially fibroblasts. Moreover MNNG could affect both these two types of cells, because various mesenchymal tumors are produced.