

ハムスター胆汁・膵液・十二指腸液胆道内逆流モデルにおける胆道上皮の組織学変化と発癌

竹尾 智行, 真嶋 敏光, 角田 司

膵胆管合流異常症は、胆道系癌が発生することで前癌状態として認識されている。その発癌機序の一つとして、膵液の胆管への逆流が関与していると考えられている。

そこで我々は、ハムスターに外科的に胆汁・膵液・十二指腸液が確実に胆道内に逆流する処置を加え、いわゆる膵胆管合流異常症モデル (cholecystoduodenostomy with dessection of the extrahepatic bile duct on the distal end of the common duct 以下 CDDB モデル) を作成し、胆汁、膵液を含む十二指腸液の逆流が、胆道上皮へ及ぼす影響を検討した。術後、全てのハムスターに基本飼料を与え、水道水を自由摂取させた。そして発癌剤を投与することなく6ヶ月および12ヶ月以上観察した。

病理組織学的には、6ヶ月観察の6例全例に胆嚢上皮の過形成を認め、1例では高度の腺管の異形成が認められた。そして胆嚢粘膜の増殖細胞の検出を PCNA LI を用い測定した結果、CDDB モデルは、手術非施行例に比べ高値であった。肝外胆管上皮は炎症細胞の浸潤はあるものの過形成は認められなかった。肝内胆管、膵管上皮には特別な病変を認めなかった。

12ヶ月以上観察できた14例の胆嚢では、全例に胆嚢上皮の過形成がみられ、異形成はみられなかった。一方肝外胆管では、上皮の過形成が14例中半数の7例にみられ、1例に肝外胆管癌の発生を認めた。しかし K-ras 遺伝子変化はみられなかった。6ヶ月に比べ12ヶ月の長期観察では肝外胆管にも変化がみられた。

この実験結果より、発癌剤を投与しなくとも、CDDB モデルは逆流した膵液と胆汁を含む十二指腸液が長期間にわたり直接粘膜に接触すると、胆嚢上皮と胆管上皮の細胞回転が亢進し、過形成、異形成が発症し、さらには発癌に至ることが示された。

すなわち、この実験モデルは、発癌物質を投与することなく胆道の前癌状態から発癌にいたる過程を観察でき、発癌機構を解明できる有用なモデルとなる可能性がある。

(平成14年10月18日受理)

Carcinogenesis and Change in the Biliary Epithelium in a Hamster CDDB Model without Carcinogen

Tomoyuki TAKEO, Toshimitsu MAJIMA, Tsukasa TSUNODA

It is well known that pancreaticobiliary maljunction (PBM) in the pancreatobiliary system promotes development of biliary carcinoma in man.

The reflux of pancreatic juice into the biliary tract is considered to be one factor promoting biliary carcinoma.

Therefore, we carried out a cholecystoduodenostomy with dissection of the extrahepatic bile duct at the distal end of the common duct (CDDB) in hamsters in such a way that pancreatic juice and duodenal contents would enter the biliary tract.

After with CDDB, all the animals were fed a basal diet and provided drinking water ad libitum without the use of a carcinogen until they were sacrificed at 6 months or 12 months.

In the six-month group, hyperplasia of the epithelium in the gallbladder was observed in 100%. Severe dysplasia of the epithelium in the gallbladder was noted in one out of six hamsters.

The cell kinetics of the gallbladder epithelium were examined using the PCNA-labeling index (PCNA LI). A high PCNA LI in the epithelium of the gallbladder was demonstrated in hamsters that had undergone CDDB but not in those who had not.

Although inflammatory cells permeated the epithelium of the extrahepatic bile duct, no hyperplasia was observed.

No pathological findings were made in the liver or pancreas.

In the 12 month group, hyperplasia of the epithelium of the gallbladder was observed in 100% and of the extrahepatic bile duct in 50%. Extrahepatic bile duct carcinoma was found in 1 out of 14 hamsters. K-ras gene mutation was not detected.

In conclusion, the CDDB procedure itself greatly accelerated cell turn-over of the epithelium in the extrahepatic biliary system.

We could observe extrahepatic biliary carcinogenesis in the model without a carcinogen.

This model allows for observation of the process from hyperplasia to carcinoma without the use of a carcinogen, and is a useful model for investigating and clarifying the mechanism of carcinogenesis in the extrahepatic biliary system. (Accepted on October 18, 2002) *Kawasaki Igakkaishi* 28(4): 279-286, 2002

Key Words ① Pancreaticobiliary maljunction ② CDDB ③ Carcinogen
④ Extrahepatic biliary carcinogenesis

はじめに

ハムスターに発癌物質である *N*-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (以下 BOP) を投与すると、膵癌、肝内胆管癌の発生がみられる¹⁾が、外科的処置を加え、胆汁・膵液・十二指腸液が胆道内へ逆流する膵胆管合流胆道発癌モデルを作成し、BOP を投与すると、膵癌、肝内胆管癌のみならず、胆嚢、肝外胆管にも有意に発癌がみられることが報告されている²⁾。これらの発生機序としては、外科的処置をすることにより、肝外胆管と胆嚢の上皮細胞の細胞回転が亢進し、

発癌物質である BOP の作用を選択的に促進させたためと考えられている²⁾。

そこで我々は、ハムスターに外科的処置を加え、膵胆管合流モデルを作成し、発癌剤を投与することなく6ヶ月および12ヶ月以上観察した。その結果、胆汁、膵液を含む十二指腸液の逆流が、胆道上皮に及ぼす影響を過形成から異形成、そして発癌へと観察しえたので、文献的考察をふまえ報告する。

材料及び方法

1. 実験動物及び飼育条件

雌性 6 週齢，体重 90～100 g の syrian golden hamster (日本エスエルシー株式会社) 計 20 匹を使用した。まず最初に手術を施行し，術後 2 匹ずつに分けプラスチックケージで飼育した。室温は 23 ± 3 °C，湿度は 30～90%，飼料は基本飼料を投与し，飲料水は水道水を自由に飲水させた。実験中発癌剤をいっさい投与することはなかった。

2. 手術方法

Pentobarbital sodium (50 mg/kg) 腹腔内投与による麻酔下に開腹し，共通管を遠位側にて結紮切離後，胆嚢十二指腸吻合を行い，ハムスター胆汁・膵液・十二指腸液胆道内逆流モデル (cholecystoduodenostomy with dissection of the extrahepatic bile duct at the distal end of the common duct 以下 CDDB モデルと省略) を作成した (Fig. 1)。

3. 病理組織学的検討

術後 6 ヶ月経過時に 6 匹，12 ヶ月以上経過した後に 14 匹屠殺し，肝，膵，胆嚢，胆管をそれぞれ分け，ホルマリン固定後，パラフィン包埋

し，最大割面が得られるように切り出した。このブロックを 5 μ m で薄切し，Hematoxylin-Eosin 染色 (以下 H. E. 染色と省略) を行い鏡検した。

4. 免疫組織学的検討

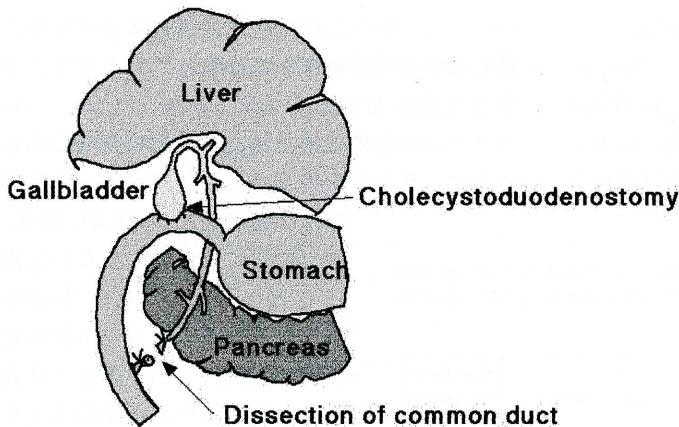
6 ヶ月においては，胆嚢上皮のパラフィン包埋切片を用いて，脱パラフィン，microwave 処理後，DAKO 社製 EPOS/PCNA kit を用いて染色し，proliferating cell nuclear antigen labeling index (PCNA LI) を算出した。PCNA は核が一樣にバックグラウンドより強染しているものを陽性とし，細胞 2000 個あたりの陽性細胞の比率を LI とした。さらに p 53 染色を ENVISION 法で施行した。抗体はハムスターに使用可能なマウスモノクローナル抗体 (抗 p 53 Protein, クローン: PAb 122, Ig 鎖: マウス IgG 2 b) を使用した。なお比較した normal gallbladder は無処置ハムスターの胆嚢上皮とした。

5. 遺伝子学的検討

K-ras 遺伝子点突然変異を RT-PCR-SSCP (reverse transcription-polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism 以下 SSCP) 法にて解析した。RT-PCR-SSCP は，凍結組織より得られた RNA から，逆転写酵素 (BRL, Gaithersburg, MD) を使って cDNA を合成し，polymerase chain reaction (以下 PCR) して増幅した。

PCR は 35 サイクルで，熱変性は 94°C 30 秒，アニーリング 55°C 30 秒，伸長反応 72°C 1 分，SSCP 分析での PCR 生成物 (2 μ l) は，198 μ l のローディング溶液 (90% ホルムアミド，20 mM EDTA，0.05% XC，0.05% BPB) で薄められ，80°C 2 分で変性させた。そして 6

Surgical procedure



(Tajima et al : jpn. J. Cancer Res, 1994)

A Cholecystoduodenostomy was carried out with dissection of the extrahepatic bile duct at the distal end of the common duct (CDDB) in hamsters in such a way that pancreatic juice and duodenal contents would enter the biliary tract.

Fig. 1. Cholecystoduodenostomy with dissection of the extrahepatic bile duct at the distal end of the common duct (CDDB) in the hamster.

%ポリアクリルアミドゲル (0.5×TBE, 10%グリセロールのあるものとないもの) を用い、40 Wで30℃および4℃で約3時間電気泳動した (LKB macroelectrophoresis system, Pharmacia, Japan). ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーした。

K-ras の検索はネステッドプライマーを使いPCRし、得られた生産物は0.5%アガロースゲルで電気泳動した。DNAは再度取り出しインターナルプライマーを用いPCRし増幅した。

SSCP分析の結果を確認するため、文献^{3), 4)}にそってダイレクトシーケンスした。

なお、比較した normal gallbladder は無処置ハムスターの胆嚢上皮とした。

6. 統計学的処理

PCNA LI は Student's t-test で検定し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

6ヶ月及び12ヶ月以上経過例の肝、胆嚢、膵、胆管の病理組織所見の結果を **Table 1, 2** に示す。

肝、膵

6ヶ月、12ヶ月以上ともに、肝、膵組織は病理組織学的に特に異常はみられなかった。

胆嚢

6ヶ月と12ヶ月以上ともに全例に炎症細胞浸潤と胆嚢上皮の過形成が認められ (**Fig. 2a, b**)、6ヶ月の1例では高度の腺管の異形成が認めら

れた (**Fig. 3a, b**)。しかし癌の発生は6ヶ月と12ヶ月以上ともに認められなかった。6ヶ月のPCNA LIは、normal gallbladder $8.4 \pm 2.2\%$ に対し、 $56.2 \pm 11.4\%$ と優位に高値であった (**Table 3**) (**Fig. 4a, b**)。しかし、p53染色は陰性で、K-ras exon 1 codon 12, 13にも変異はなかった (**Fig. 5**)。

総胆管

6ヶ月自然観察例の総胆管径は平均4.5 mmと、正常1 mm以下と比べ拡張しており、病理組織学的には炎症細胞の浸潤はあるものの過形成は認められなかった。12ヶ月以上自然観察例の径も平均2.8 mmと拡張しており、7例に過形成を認め1例には間質への浸潤像のある中分化管状腺癌像を示す肝外胆管癌の発生が確認された。 (**Fig. 6a, b**)。K-ras exon 1 codon 12, 13の変異は認めなかった。原因ははっきりしないが、総胆管径で6ヶ月に比べ12ヶ月以上自然観察例の方が拡張は少なかった。

考 察

ヒト膵胆管合流異常症は、胆道系癌が高率に発生することで前癌状態として認識されている。その発癌機序はいまだ不明なところが多い^{5)~7)}。そのため肝外胆管癌実験モデルを作成し発癌機構を解明しようと、これまでさまざまな実験が行われてきた。Pourら¹⁾は、ハムスターに外科的処置を加えず、発癌物質であるニトロソ化合物を投与すると、膵および肝内胆管には癌が発生し得るが、胆嚢、肝外胆管に癌は発生しないと報告している。その後Tajimara²⁾は、ハムスターに外科的処置を修飾的に行い、胆汁・膵液・十二指腸液胆道内逆流モデルを作成しその後発癌物質のBOPを投与すると、膵癌、肝内胆管癌のみならず、胆嚢癌、肝外胆管癌が発生すると報告し、世界で初めて肝外胆管癌発症モ

Table 1. Histopathological findings of the liver, gallbladder, pancreas and common bile duct in 6 hamsters six-months after CDDB, and Diameter of the common bile duct

No.	liver	gallbladder	pancreas	common bile duct	Diameter of the common bile duct (mm)
1	normal	dysplasia	normal	inflammatory change	4.8
2	normal	hyperplasia	normal	inflammatory change	4.5
3	normal	hyperplasia	normal	normal	4.6
4	normal	hyperplasia	normal	normal	4.5
5	normal	hyperplasia	normal	normal	3.9
6	normal	hyperplasia	normal	inflammatory change	4.7

Table 2. Histopathological findings of the liver, gallbladder, pancreas and common bile duct in 14 hamsters 12 months after CDDB, and Diameter of the common bile duct

No.	liver	gallbladder	pancreas	common bile duct	Diameter of the common bile duct (mm)
1	normal	hyperplasia	normal	abscess	1.0
2	normal	hyperplasia	normal	hyperplasia	2.3
3	normal	hyperplasia	normal	inflammatory change	1.8
4	normal	hyperplasia	normal	hyperplasia	2.2
5	normal	hyperplasia	normal	inflammatory change	1.3
6	normal	hyperplasia	normal	adenocarcinoma	3.2
7	normal	hyperplasia	normal	hyperplasia	2.8
8	normal	hyperplasia	normal	hyperplasia	4.0
9	normal	hyperplasia	normal	hyperplasia	2.2
10	normal	hyperplasia	normal	hyperplasia	3.1
11	normal	hyperplasia	normal	unevaluated	2.9
12	normal	hyperplasia	normal	inflammatory change	3.7
13	normal	hyperplasia	normal	hyperplasia	3.9
14	abscess	hyperplasia	normal	inflammatory change	2.8

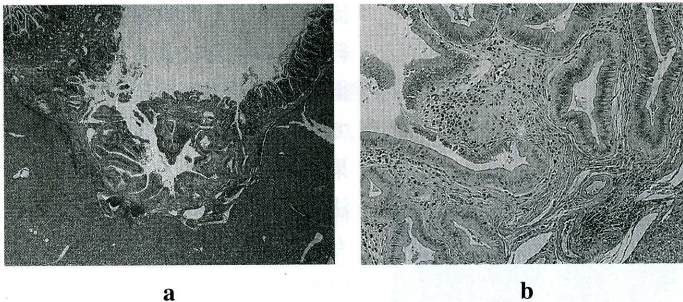


Fig. 2. Histopathological findings in the gallbladder of a hamster six months after CDDB (H.E. staining $\times 40$ (a), H.E. staining $\times 400$ (b)). Hyperplasia of the gallbladder epithelium was observed.

デルとして確立させた。この発癌機序は、胆汁と膵液を含んだ十二指腸液が、胆管へ逆流、うっ滞し、膵酵素の活性化、二次胆汁酸の増加による胆道粘膜障害をおこし、発癌剤の効果を促進すると考えられている^{2), 9)}。

さらに真嶋らは同モデルで、K-ras および p

53の遺伝子検索を行ったところ、肝外胆管癌は75%に、膵癌は54.5%に K-ras exon 1 codon 12の G → A への変化がみられ、p 53の発現には異常は見られなかったと報告した⁸⁾。

本研究では、Tajima らに準じて外科的処置を施行し、発癌物質を投与せず6ヶ月および12ヶ月以上の長期観察で胆道系への影響を観察した。その結果、12ヶ月以上

の長期観察の1例に肝外胆管癌が誘発された。K-ras の変異は認められなかったものの、発癌物質を投与せずとも癌がみられたことは、胆道上皮の過形成から異形成そして癌化と考えられる一連の流れとも解釈できた。

発癌物質を投与せずに発癌させ、その発癌機

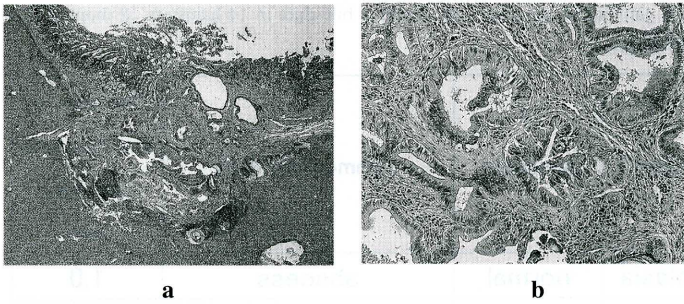


Fig. 3. Histopathological findings in the gallbladder of a hamster six months after CDDB (H.E. staining $\times 40$ (a), H.E. staining $\times 400$ (b)). Dysplasia of the gallbladder epithelium was observed.

Table 3. PCNA LI in the gallbladder epithelium of a hamster six months after CDDB

normal gallbladder (n=4)	8.4 \pm 2.2%	} p<0.05
CDDB gallbladder (n=6)	56.2 \pm 11.4%	

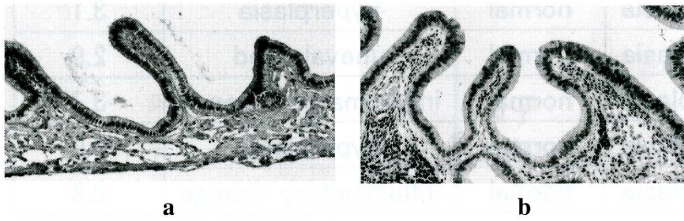


Fig. 4. Staining of PCNA antibody in the normal gallbladder (a) and hyperplasia (b) of a hamster six months after CDDB (PCNA staining $\times 400$). The positive cells were observed (b).

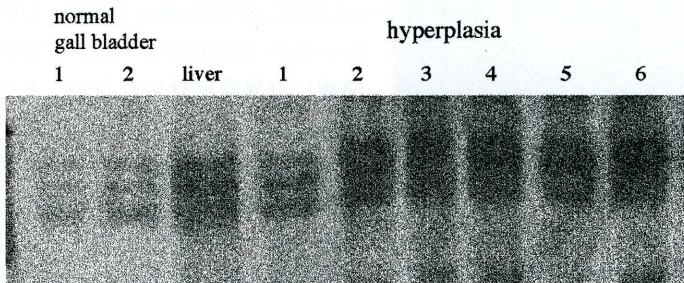


Fig. 5. Results of PCR-SSCP analysis of K-ras (exon-1) in gallbladder hyperplasia of a hamster six months after CDDB. No abnormal, mobility shifted bands were seen.

構の解明を目的とした実験モデルとしては、ラットを用いて外科的修飾を行い、長期(50週)観察した胃術後における残胃癌の発生モデル^{10)~16)}や食道癌発生のモデル^{17),18)}がある。

小澤ら¹¹⁾は、十二指腸液の逆流によって胃粘膜への直接暴露が大きな要因で、逆流した十二指腸液が萎縮性胃炎から腸上皮化生、GCP (Gastric Cystica Polyposa) および異型上皮細胞の出現へと変化し最後に胃発癌へと進展するとしている。

藤村ら¹³⁾は、胆汁・膵液分離逆流モデルにおいて、全十二指腸液逆流群および胆汁逆流群に高率に胃発癌がみられ膵液逆流群には認められなかったことから、特に発癌に胆汁の関与が示唆されるとしている。

また、臨床的にも術式における違いが報告されている。左野ら¹⁹⁾や鎌田ら¹⁴⁾は、Billroth I法よりII法吻合の方が残胃癌のリスクは高く、十二指腸液が胃内へ逆流する量の多い術式は残胃癌を促進させるとしている。さらに、上西ら²⁰⁾は残胃癌の発生には十二指腸液胃内逆流を中心とした攻撃因子と、神経支配の脱落による胃粘膜の防御因子の低下が重要であるとしており、臨床的、実験的検討結果から残胃癌の予防には、再建法としてBillroth II法吻合よりもRoux Y 吻合術を提唱している。

十二指腸液の逆流は、残胃癌のみならず、実験的に食道へ逆流させると、前癌病変と考えられているBarrett食道や食道癌を引き起こす¹⁷⁾。これは胃液よりむしろ多量の十二指腸液逆流が関与している

可能性があるとしている。さらに佐原ら¹⁸⁾は、胃液、十二指腸液の混合液および分離液を逆流させ、胃液ではなく十二指腸液の逆流に食道発

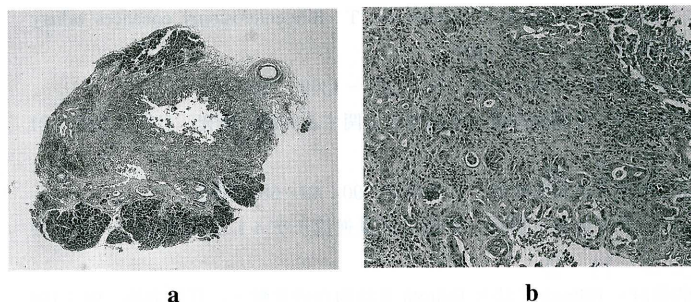


Fig. 6. Histopathological findings of the extrahepatic bile duct in one of the 14 hamsters 12 months after CDDB (H.E. staining $\times 40$ (a), $\times 400$ (b)). Moderately differentiated adenocarcinoma were observed, proliferating into the lumen of bile ducts (a) and, invading a extra-bile duct tissue (b).

に影響することが示された。

結 語

胆汁・膵液・十二指腸液が確実に胆道内に逆流するハムスター膵胆管合流異常症モデルは、胆道の前癌状態から発癌にいたる過程を観察でき、発癌機構を解明できる有用なモデルであるといえる。そして、胆汁と膵液を含んだ十二指腸液の逆流が発癌に関与している

癌に対する initiator 作用があるとしている。

このように、消化液、特に十二指腸液の逆流とそれによる粘膜の持続的な障害という共通した要因が発癌に関与しているといえる。

我々の行った実験結果からも、発癌にいたる過程として、発癌剤を投与しなくとも、逆流した膵液と胆汁を含む十二指腸液が長期間にわたり、直接胆管粘膜に障害を与え続けたことが、過形成、異形成、細胞回転の上昇および、発癌

と結論した。

なお、本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け、川崎医科大学動物実験指針に基づき実施された。

本研究の一部は平成12年度川崎医科大学プロジェクト研究費「00-018」の援助によって行われた。

文 献

- 1) Pour P, Althoff J, Kruger FW, and Mohr U : A Potent Pancreatic Carcinogen in Syrian Hamsters : N-Nitrosobis (2-oxopropyl) amine. *J Natl Cancer Inst* 58 : 1449 - 1453, 1977
- 2) Tajima Y, Eto T, Tsunoda T, Tomioka T, Inoue K, Fukahori T, Kanematsu T : Induction of Extrahepatic Biliary Carcinoma by N-Nitrosobis (2-oxopropyl) amine in Hamsters Given Cholecystoduodenostomy with Dissection of the Common Duct. *Jpn J Cancer Res* 85 : 780 - 788, 1994
- 3) Tsutsumi M, Kondoh S, Noguchi O, Horiguchi K, Kobayashi E, Okita S, Ohashi K, Hohoki K, Tsujiuchi T, Konishi Y : K-ras gene mutations in early ductal lesions induced in rapid production model for pancreatic carcinomas in Syrian hamsters. *Jpn J Cancer Res* 84 : 1101 - 1105, 1993
- 4) Tsutsumi M, Murakami Y, Kondoh S, Tsujiuchi T, Hohnoki K, Horiguchi K, Noguchi O, Kobayashi E, Okita S, Sekiya T, Konishi Y : Comparison of K-ras oncogene activation in pancreatic duct carcinomas and cholangiocarcinomas induced in hamsters by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine. *Jpn J Cancer Res* 84 : 956 - 960, 1993
- 5) 日本膵管胆道合流異常研究会：膵・胆管合流異常の診断基準。第10回日本膵管胆道合流異常研究会プロシードィングス。10 : 13 - 14, 1987
- 6) 戸谷拓二, 土岐 彰：胆道拡張症における癌発症とその対策。日外会誌 97 : 594 - 598, 1996
- 7) 千々岩 勇, 田中雅夫：胆嚢癌と膵胆管合流異常。日外会誌 97 : 599 - 605, 1996
- 8) Majima T, Tsujiuchi T, Tsutsumi M, Tsunoda T, Konishi Y : Mutation of K-ras but not p 53 genes in biliary duct and pancreatic duct carcinomas induced in hamsters by cholecystoduodenostomy with dissection of the common duct followed by N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine. *Cancer Letters* 118 : 47 - 53, 1997

- 9) Ikematsu Y, Tomioka T, Yamanaka S, Tajima Y, Tsunoda T, Kanematsu T: Bilioenterostomy enhances biliary carcinogenesis in hamsters. *Carcinogenesis* 17:1505-1509, 1996
- 10) 宮田龍和：十二指腸液胃逆流の胃発癌促進作用. 日消外会誌 21:1357-1362, 1988
- 11) 小澤正則, 三上泰徳, 杉山 譲, 羽田隆吉：胃空腸吻合後の胃癌発生に関する実験的研究. 日消外会誌 21:1939-1945, 1988
- 12) 竹林正孝：胆汁酸の胃癌発生促進作用に関する実験的研究. 日外会誌 90:49-58, 1989
- 13) 藤村 隆：十二指腸液胃逆流によるラット胃発癌-胆汁, 膵液の分離逆流モデルによる検討-. 日外会誌 92:933-939, 1991
- 14) 鎌田 徹：残胃の発癌に関する実験的検討- Billroth I 法と Billroth II 法吻合の比較-. 日外会誌 94:104-113, 1993
- 15) 松本 尚：逆流によるラット胃癌発生に関する研究-胃・十二指腸液の変異原性について-. 日外会誌 95:368-375, 1994
- 16) 尾形真光, 寺西 寧, 寺島信也, 渡辺 智, 井上 仁, 元木良一：残胃吻合部粘膜の十二指腸液逆流による経時的変化に関する実験的研究. 日外会誌 96:286-293, 1995
- 17) 瀬川正孝：胃十二指腸液逆流によるラットの食道発癌実験. 日消外会誌 26:971-978, 1993
- 18) 佐原博之：逆流による食道発癌の実験的研究-胃液と十二指腸液の分離逆流-. 日消外会誌 28:1630-1640, 1995
- 19) 左野千秋, 神代龍之介, 井口 潔, 佐々木 攻：胃切除術式の残胃癌発生プロモーションに及ぼす影響に関する実験的研究. 日消外会誌 17:2130-2136, 1984
- 20) 上西紀夫, 山口浩和, 青木文夫, 清水伸幸, 野村幸世, 吉川朱実, 辻 英一, 下山省二, 瀬戸泰之, 河原正樹, 倉本 秋：残胃の癌の発生機序からみた胃切除術式の選択. 外科治療 79:151-157, 1998