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

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 片山, 外一
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8989

金沢大学十全医学会雑誌　第91巻　第3号　452－472　(1982)

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

金沢大学大学院医学研究科外科学第二講座（主任：宮崎逸夫教授）
片　山　外　一
（昭和57年4月13日受付）

大腸癌発生増殖に及ぼす胆汁酸の影響を究明する目的で，N-メチル-N′-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine，以下MNNGと略）誘発大腸癌における便流遮断の影響並びに便流遮断空置大腸に対する各種胆汁酸付加投与の影響について検討を加えた．実験動物はWistar系雄性ラットを用い，回盲部より2cm肛門側で人工肛門造設に伴う便流遮断空置大腸を作成した．MNNGは2.5mg/1mlを2週間，各種胆汁酸は10mg/1mlを30日間自然肛門より注腸投与し，実験開始後30週目に全群屠殺剖検して得られた大腸腫瘍について発生率及び組織学的に検索した．腫瘍発生率は便流非遮断群の73.5%に対し便流遮断MNNG単独投与群では13.5%と有意の低下（P<0.001）を示した．便流遮断空置大腸における各種胆汁酸付加投与による検索では腫瘍発生率はケノデオキシコール酸（chenodeoxycholic acid）付加投与群14.3%，ウルソデオキシール酸（ursodeoxycholic acid）付加投与群25%，コール酸（cholic acid）付加投与群24%と，1次胆汁酸付加投与群ではMNNG単独投与群に比し腫瘍発生率に有意差は認められなかったが，デオキシコール酸（deoxycholic acid）付加投与群では50%，リトコール酸（litocholic acid）付加投与群では70%と2次胆汁酸付加投与群で腫瘍発生率の有意の増加（p<0.01）を示した．この傾向は癌腫発生率，腺腫発生率，腫瘍個数を算定しても同様であった．以上，MNNG誘発ラット大腸癌では便流遮断により腫瘍発生率は有意に減少したが，便流遮断空置大腸に対し2次胆汁酸付加投与により腫瘍発生率は有意の増加を示し，便流非遮断群に近似する傾向を示したことから，大腸癌発生増殖過程において2次胆汁酸は発癌促進因子として作用することが示唆された．

Key words　Colon carcinoma, Rat, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, Bile acid.

大腸癌は疫学的に人種，地域，年齢，遺伝など種々の要因により発生頻度の異なることが知られているが，特に人種，地域によりかなりの差がみられ，欧米諸国での罹患率はアジア諸国の数倍から10倍に達している[1)-3)]．しかし近年，本邦では生活様式殊に食生活の欧米化に伴い大腸癌発生率も漸増する傾向を示し[4)5)]，しかも米国に在住する日本人二世の大腸癌発生率が米国人の大腸癌発生頻度に匹敵する傾向を示すのに対し，移住後も日本の食習慣を維持している日系一世では大腸癌の発生率は極めて低いことが指摘されている[6)-8)]．

このことは大腸癌発生頻度は単に地域あるいは人種差に依存するものではなく環境因子，殊に食餌性因子との密接な関連性を示唆するもので[7)8)]，Wynderら[5)9)10)]の食餌内容の欧米化に伴う脂肪摂取量の増加と大腸癌発生率との間に高い相関を認めたことからも推察される．すなわち家族性大腸ポリポージスなど一部の大腸癌は遺伝的素因によってその発生が規定されているが[11)]，大部分の大腸癌は食餌性因子に基づく外的noxaのみならず宿主の内的環境の変化が大腸癌発生機構上，重要な要因を形成するものと言える．

高脂肪食の摂取は生体内でほぼ閉鎖的な腸肝循環を営む胆汁酸代謝の変化を惹起することが知られているが[12)]，Reddyら[13)]は日本人，中国人に比べ大腸癌罹患率の高い米国人では高脂肪食摂取に伴い糞便中胆汁酸

Effect of Bile Acids on Colon Carcinogenesis in Rats. **Hokaichi Katayama,** Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University.

排泄量の増加，並びに胆汁酸組成の変化をきたし，大腸癌発生に及ぼす高脂肪食の影響はかかる胆汁酸代謝の変化に起因するものと述べている．同様に Hill[14)15)]らもアジア・アフリカ・欧米諸国での大腸癌発生率と糞便中胆汁酸排泄量との間に高い相関性を認め，胆汁酸排泄量の増加が大腸発癌に密接に関与していると報じている．

このように大腸癌発生機序を解明する上で胆汁酸と大腸癌発生増殖の因果関係を究明することは極めて有意義である．

ところで従来大腸発癌実験では化学発癌物質として4-アミノビフェニール（4-Aminobiphenyl），メチルアゾキシメタノール（Metyl azoxymethanol）や種々の同族体が用いられてきたが[16)17)]，その作用経路は主に胆汁を介して糞便中に排泄され大腸粘膜に至るとされている[18)]．即ちこれらの発癌物質では糞便中にプールされた胆汁酸との混在を回避することは困難で，大腸癌発生増殖に及ぼす純粋な胆汁酸の影響を検索し得る発癌剤並びに実験モデルの作製が要求される．

1971年 Narisawa ら[19)]は化学発癌物質 N-メチル-N′-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine，以下 MNNG と略）の水溶液を注腸投与することにより，ラットの遠位大腸に高率に人腸癌に類似する腺癌を発生せしめることに成功したが，MNNG の作用は大腸粘膜に対する直接接触のみによるもので，胆汁を介して糞便中に排泄されることはないものとされている．

そこで著者は実験的に人工肛門造設に伴う便流遮断空置大腸を作製し，発癌剤 MNNG 注腸投与並びに各種胆汁酸の付加注腸投与により，大腸癌発生増殖に及ぼす便流遮断の影響並びに各種胆汁酸付加投与の影響について検討を加え，若干の知見を得たので報告する．

材料及び方法

オリエンタル固型飼料および水道水で飼育された7週齢，体重200 g 前後の Wistar 系雄性ラットを用いた．

I．便流遮断空置大腸作製方法

1．術前処置および麻酔

24時間絶食後，エチルエーテル（Ethyl ether）麻酔下に開腹した．

2．人工肛門造設による便流遮断空置大腸作製方法

下腹部正中線上に約5 mm の切開を加え開腹する．開腹創より上行結腸を引き出し，回盲部より約2 cm 肛門側で大腸を切離する．肛門側断端は6-0（U.S.P.号数）Silk，針型 U-1の血管縫合糸（日腸工業株式会社製）で結紮した後，漿膜タバコ縫合で埋没し，末梢側大腸の便流遮断を図る．一方口側断端は人工肛門に供し，開腹創で Primary open skin level colostomy とした（図1）．

3．術後管理

術当日よりオリエンタル固型飼料および水道水を ad libitum に与えたが，感染防止のため術後3日間連日テトラサイクリン（Tetracycline）5 mg 加生理食塩水2 ml を腹壁皮下に注射した．

なお，飼育条件は室温25±1°C，湿度55±5%に維持した．

II．実験群

以下の7群を設定した．

1．便流非遮断群

1群：無処置ラット＋MNNG 群　34匹

2．便流遮断群

2群：人工肛門ラット＋MNNG 群　37匹

3群：人工肛門ラット＋MNNG＋ケノデオキシコール酸（Chenodeoxycholic acid，以下 CDCA と略）群　28匹

4群：人工肛門ラット＋MNNG＋ウルソデオキシコ

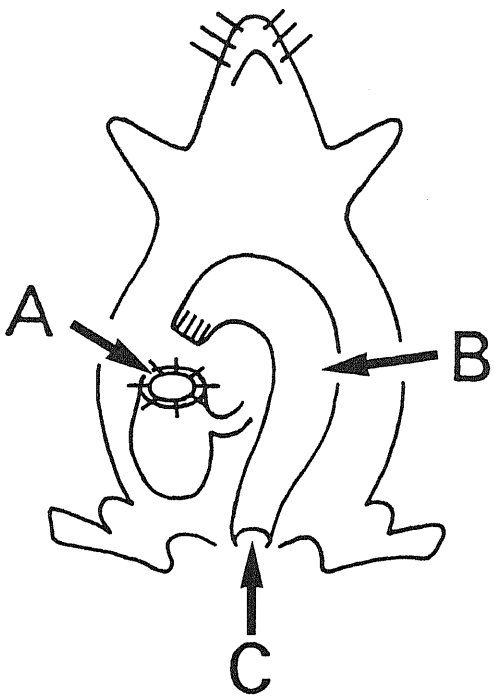

Fig. 1. Design of the experimental model. Primary open skin level colostomy (arrow A) was performed approximately 2 cm distal to the cecum to produce a defunctionalized colon (arrow B), and drugs were instilled via the anus (arrow C).

ール酸(Ursodeoxycholic acid, 以下 UDCA と略) 群 28 匹

5 群：人工肛門ラット＋MNNG＋コール酸(Cholic acid, 以下 CA と略) 群 25 匹

6 群：人工肛門ラット＋MNNG＋デオキシンコール酸 (Deoxycholic acid, 以下 DCA と略) 群 24 匹

7 群：人工肛門ラット＋MNNG＋リトコール酸 (Lithocholic acid, 以下 LC と略) 群 20 匹

MNNG および各種胆汁酸投与方法は人工肛門造設後，術前体重に復した時点で MNNG(和光純薬工業株式会社製) 2.5 mg/ 1 ml を 2 週間 (計 35 mg/匹) 連日自然肛門より空置大腸に注腸投与し，その後胆汁酸は CDCA (東京田辺株式会社製)，UDCA (東京田辺株式会社製)，CA (東京田辺株式会社製)，DCA (Difco labolatories 製)，LC(東京化成株式会社製) 10 mg/ 1 ml を 30 日間(計 300 mg/匹)連日注腸投与した．なお注腸投与はネラトンカテーテル (6 フレンチサイズ) を自然肛門より空置大腸に 7 cm 挿入し，これを通して投与約 1 時間前に遮光壜中で蒸留水に溶解した MNNG 溶液または落花生油に均一に混和した各種胆汁酸を注入した．

III. 大腸癌判定基準

MNNG 投与開始後 30 週目に全群屠殺剖検し，摘出した大腸において肉眼的に隆起性病変として観察し得たものを腫瘍とし，組織学的な癌の判定は人腸癌の判定基準[20]に従い，大腸癌取扱い規約[21]に準じ検討した．

IV. 腫瘍発生率算定法

実験開始後 30 週目に屠殺剖検した時点における各実験群の生存匹数を有効匹数とし，次式の如く算定した．

大腸腫瘍発生率 (%)

$$=\frac{\text{大腸に腫瘍を認めた匹数}}{\text{有効匹数}}\times 100$$

なお癌腫発生率，腺腫発生率も上記の算定法に従った．

V. 体重測定法

人工肛門ラットでは術後 4 週間は隔日に，その後 4 週間は 1 週毎に，以後は 4 週毎に体重測定を行ない，その数値は各群の平均値をもってあらわした．

成 績

I. 大腸腫瘍発生率

大腸腫瘍発生率は便流非遮断群 (1 群) の 34 匹中 25 匹 (73.5%) に対し便流遮断 MNNG 単独投与群 (2 群) では 37 匹中 5 匹 (13.5%) と，便流遮断により腫瘍発生率は有意の低下を示した ($p<0.001$)．便流遮断空置大腸に対し MNNG 単独投与群 (2 群) と各種胆汁酸付加投与群における腫瘍発生率を対比検討すると，MNNG 単独投与群の 13.5% に対し，CDCA 付加投与群 (3 群) 28 匹中 4 匹 (14.3%)，UDCA 付加投与群 (4 群) 28 匹中 7 匹 (25%)，CA 付加投与群 (5 群) 25 匹中 6 匹 (24%)，DCA 付加投与群 (6 群) 24 匹中 12 匹 (50%)，LC 付加投与群 (7 群) 20 匹中 14 匹 (70%) と，MNNG 単独投与群 (2 群) に比し CDCA, UDCA, CA の 1 次胆汁酸付加投与群ではやや増加傾向を示すも有意差は認められなかったのに対し，DCA, LC の 2 次胆汁酸付加投与群では腫瘍発生率の有意の増加を示した ($p<0.01$)．

発生した腫瘍を組織学的に癌腫と腺腫に大別し，各々の発生率を検討すると，癌腫発生率は 1 群 34 匹中 21 匹

Table 1. Colon tumor incidence in normal rats instilled with MNNG and colostomized rats instilled with MNNG or MNNG and bile acids

Group	No. of rats	No. (%) of rats with tumors	No. (%) of rats with carcinomas	No. (%) of rats with adenomas
1. Normal+MNNG*	34	25 (73.5)	21 (61.8)	14 (41.2)
2. Colostomy+MNNG	37	5 (13.5)▲	4 (10.8)▲	1 (2.7)▲
3. Colostomy+MNNG+CDCA**	28	4 (14.3)	3 (10.7)	2 (7.1)
4. Colostomy+MNNG+UDCA	28	7 (25.0)	4 (14.3)	4 (14.3)
5. Colostomy+MNNG+CA	25	6 (24.0)	6 (24.0)	1 (4.0)
6. Colostomy+MNNG+DCA	24	12 (50.0)▲▲	10 (41.7)▲▲	4 (16.7)
7. Colostomy+MNNG+LC	20	14 (70.0)▲▲	13 (65.0)▲▲	7 (35.0)▲▲

* : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.
** : CDCA, chenodeoxycholic acid ; UDCA, ursodeoxycholic acid ; CA, cholic acid ; DCA, deoxycholic acid ; LC, lithocholic acid.
▲ : Significantly different from the group of "normal+MNNG" ($p<0.001$).
▲▲ : Significantly different from the group of "colostomy+MNNG" ($p<0.01$).

(61.8%)，2群37匹中4匹（10.8%）と便流遮断により有意の低下（p<0.001）を示した．一方各種胆汁酸付加投与群では3群28匹中3匹（10.7%），4群28匹中4匹(14.3%)，5群25匹中6匹(24%)，6群24匹中10匹（41.7%），7群20匹中13匹（65%）と，MNNG単独投与の2群に比しDCA，LCの2次胆汁酸付加投与群で癌腫発生率の有意の増加を認めた(p<0.01)．

腺腫発生率も同様に1群34匹中14匹(41.2%)，2群37匹中1匹（2.7%），3群28匹中2匹（7.1%），4群28匹中4匹（14.3%），5群25匹中1匹（4%），6群24匹中4匹（16.7%），7群20匹中7匹（35%）と，便流遮断により腺腫発生率の有意の低下を認めたが(p<0.001)，便流遮断MNNG単独投与の2群に比し2次胆汁酸のLC付加投与群で有意の増加を示した（p<0.01）（表1）．

II．大腸腫瘍個数

得られた大腸腫瘍について1匹当りの個数を算定すると，便流非遮断群（1群）では34匹に45個（1.32個）に対し便流遮断MNNG単独投与群（2群）では37匹に6個（0.16個）と，便流遮断により発生腫瘍個数の有意の減少が認められた（p<0.01）．便流遮断空置大腸に対し各種胆汁酸付加投与群での腫瘍個数はCDCA付加投与群（3群）28匹に6個（0.21個），UDCA付加投与群（4群）28匹に9個（0.32個），CA付加投与群（5群）25匹に9個（0.36個），DCA付加投与群（6群）24匹に16個（0.67個），LC付加投与群（7群）20匹に35個（1.75個）と，便流遮断MNNG単独投与の2群に比しCDCA，UDCA，CAの1次胆汁酸付加投与群ではやや増加する傾向を示すも有意差は認められなかったが，DCA，LCの2次胆汁酸付加投与群では発生腫瘍個数の有意の増加を示した（p<0.05）．

癌腫個数では1群34匹に25個（0.73個）に対し2群37匹に5個（0.14個）と便流遮断により有意の減少を示し（p<0.01），また胆汁酸付加投与の各群では3群28匹に4個(0.14個)，4群28匹に5個(0.18個)，5群25匹に7個（0.28個），6群24匹に12個（0.5個），7群20匹に28個（1.4個）と便流遮断MNNG単独投与の2群に比しDCA，LC，の2次胆汁酸付加投与群で有意の増加を認めた（p<0.05）．

また腺腫個数では1群34匹に20個(0.59個)，2群37匹に1個（0.03個），3群28匹に2個（0.07個），4群28匹に4個（0.14個），5群25匹に2個（0.08個），6群24匹に4個（0.17個），7群20匹に7個（0.35個）と，便流遮断により腺腫個数の有意の減少を認めたが（p<0.01），便流遮断MNNG単独投与の2群に比し2次胆汁酸LC付加投与群では有意の増加を示した（p<0.05）（表2）．

III．占居部位並びに分布状況

屠殺剖検により摘出された大腸の平均長は便流非遮断群（1群）の24 cmに対し，人工肛門造設による便流遮断MNNG単独投与群（2群）では12.7 cm，CDCA付加投与群（3群）では14.1 cm，UDCA付加投与群（4群）で13.5 cm，CA付加投与群（5群）で13.2 cm，DCA付加投与群（6群）で12.5 cm，LC付加投与群（7群）では，12.7 cmと便流遮断群では人工肛門造設による廃用性萎縮に伴う大腸の短縮が認められた．

癌腫占居部位は1群では歯状線より0.5～10.5 cm，(平均5.7 cm)，2群では4.5～7.5 cm(平均5.9 cm)，3群5.5～10.5 cm，(平均7.8 cm)，4群6～8.6 cm，(平均8.2 cm)，5群5～7.5 cm(平均6.5 cm)，6群1～12 cm，(平均7.1 cm)，7群では0.7～12.5 cm，

Table 2. Number of tumors in normal rats instilled with MNNG and colostomized rats instilled with MNNG or MNNG and bile acids

Group	No. of rats	No. (per rat) of tumors	No. (per rat) of carcinomas	No. (per rat) of adenomas
1. Normal+MNNG	34	45(1.32±0.19)*	25(0.73±0.11)	20(0.59±0.14)
2. Colostomy+MNNG	37	6(0.16±0.07)▲	5(0.14±0.07)▲	1(0.03±0.03)▲
3. Colostomy+MNNG+CDCA	28	6(0.21±0.11)	4(0.14±0.09)	2(0.07±0.05)
4. Colostomy+MNNG+UDCA	28	9(0.32±0.12)	5(0.18±0.09)	4(0.14±0.07)
5. Colostomy+MNNG+CA	25	9(0.36±0.15)	7(0.28±0.11)	2(0.08±0.08)
6. Colostomy+MNNG+DCA	24	16(0.67±0.17)▲▲	12(0.50±0.14)▲▲	4(0.17±0.08)
7. Colostomy+MNNG+LC	20	35(1.75±0.42)▲▲	28(1.40±0.37)▲▲	7(0.35±0.11)▲▲

* : Mean±S.E.
▲ : Significantly different from the group of "normal+MNNG" (p<0.01).
▲▲ : Significantly different from the group of "colostomy+MNNG" (p<0.05).

(平均7.3 cm)と，いずれも下部大腸に好発する傾向を示し占居部位に差異は認められなかった（図2a).

腺腫占居部位も1群2～12 cm，(平均6.7 cm)，2群(平均7.2 cm)，3群0.4～7.5 cm(平均4 cm)，4群1.4～9 cm (平均4.9 cm)，5群 (平均6.5 cm)，6群4～7 cm (平均5.6 cm)，7群0.3～8 cm (平均4.3 cm) と，各群間に差異はみられず，また癌腫の好発部位と類似した (図2b).

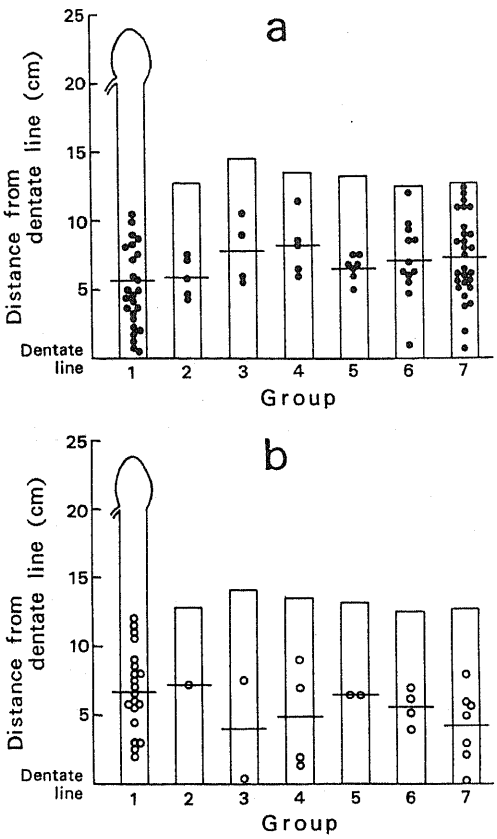

Fig. 2. Location of carcinomas (Fig. 2a) and adenomas (Fig. 2b) in normal rats instilled with MNNG and colostomized rats instilled with MNNG or MNNG and bile acids. ●, carcinoma; ○, adenoma; ——, mean distance; ∩, mean length of normal colons for group 1; ⊓, mean length of defunctionalized colons for each group. Group: 1, normal+MNNG; 2, colostomy+MNNG; 3, colostomy+MNNG+CDCA; 4, colostomy+MNNG+UDCA; 5, colostomy+MNNG+CA; 6, colostomy+MNNG+DCA; 7, colostomy+MNNG+LC. Number of rats used for each group were 34 for group 1, 37 for 2, 28for3, 28 for 4, 25 for 5, 24 for 6 and 20 for 7.

IV. 大腸腫瘍肉眼形態

1. 肉眼的分類

得られた大腸腫瘍は全て隆起性を示し，癌腫は大腸癌取扱い規約[21]に従い，腺腫は山田分類[22]に準じ検討した.

癌腫の肉眼形態は便流非遮断群（1群）ではII a型5個(20%)，I s型16個(64%)，I p型1個(4%)，Borrmann 1型3個 (12%) を示したのに対し，便流遮断MNNG単独投与群（2群）ではII a型3個 (60%)，I s型2個 (40%) と，前者で多彩な肉眼形態の分布を示した．各種胆汁酸付加投与群ではCDCA付加投与群（3群）でII a型2個 (50%)，I s型2個 (50%)，UDCA付加投与群（4群）でII a型1個 (20%)，I s型4個 (80%)，CA付加投与群（5群）でII a型3個 (43%)，I s型3個 (43%)，I p型1個 (14%)，DCA付加投与群（6群）でII a型4個 (33%)，I s型7個 (58%)，Borrmann 1型1個 (8%)，LC付加投与群(7群)ではII a型9個(32%)，I s型12個(43%)，I p型2個(7%)，Borrmann 1型5個(18%)を示し，いずれの群でもII a，I s型が大半を占め肉眼形態による差異は認められなかった.

また腺腫肉眼形態は1群では山田I型3個 (15%)，II型11個(55%)，III型5個(25%)，IV型1個(5%)，2群ではIII型1個 (100%)，3群でII型1個 (50%)，III型1個 (50%)，4群でI型1個 (25%)，II型3個 (75%)，5群でIII型2個 (100%)，6群でI型1個 (25%)，III型3個(75%)，7群ではII型2個(29%)，III型5個(71%)といずれの群でも山田II，III型が75%以上を占め，腺腫肉眼形態においても各群間に差は認められなかった（表3).

2. 腫瘍径

腫瘍の最大径について検討すると，癌腫では便流非遮断群（1群）で<5 mm，5個(20%)，5～10 mm，13個 (52%)，>10 mm，7個 (28%) を示したのに対し，便流遮断MNNG単独投与群(2群)では<5 mm，4個 (80%)，>10 mm，1個 (20%) と，便流遮断により癌腫の長径が小なる傾向を示したが両群間に有意差は認められなかった．各種胆汁酸付加投与群ではCDCA付加投与群（3群）で<5 mm，3個 (75%)，5～10 mm，1個 (25%)，UDCA付加投与群（4群）で<5 mm，1個(20%)，5～10 mm，3個(60%)，>10 mm，1個 (20%)，CA付加投与群（5群）で<5 mm，3個(43%)，5～10 mm，2個(29%)，>10 mm，2個 (29%)，DCA付加投与群（6群）で<5 mm，8個 (67%)，5～10 mm，3個 (25%)，>10 mm，1個 (8%)，LC付加投与群（7群）で<5 mm，8個 (29%)，5～10 mm，15個 (54%)，>10 mm，5個

(18%) と，便流遮断 MNNG 単独投与の 2 群に比し胆汁酸付加投与の各群でやや癌腫径の大なる傾向がみられた．

腺腫長径については 1 群で<5 mm，13 個 (65%)，5～10 mm，6 個 (30%)，>10 mm，1 個 (5%) に対し 2 群では>10 mm，1 個のみであった．胆汁酸付加投与群では 3 群で< 5 mm，2 個(100 %)，4 群で< 5 mm，4 個(100 %)，5 群で< 5 mm，1 個(50%)，5～10 mm，1 個(50%)，6 群で< 5 mm，3 個(75%)，5～10 mm，1 個 (25%)，7 群では< 5 mm，3 個 (43%)，5～10 mm，2 個 (29%)，>10 mm，2 個 (29%) を示し，LC 付加投与群で 5 mm 以上の腺腫が多くを占めた．なお腺腫径と癌腫径の対比では腺腫に比し癌腫径の大きい傾向が認められた (表 4)．

V．大腸癌組織学的分類

得られた大腸癌の組織型は便流非遮断群 (1 群) では高分化腺癌 23 個 (92%)，中分化腺癌 2 個 (8 %) を示し，便流遮断の MNNG 単独投与群(2 群)，CDCA 付加投与群(3 群)，UDCA 付加投与群(4 群)，CA 付加投与群 (5 群) では全例が高分化腺癌を，DCA 付加投与群 (6 群) では高分化腺癌 11 個 (92%)，印環細胞癌 1 個 (8 %)，LC 付加投与群 (7 群) では高分化腺癌 26 個 (93%)，低分化腺癌，偏平上皮癌各 1 個 (4 %) と，いずれの群でも高分化腺癌が主体を成したが，2 次胆汁酸付加投与群で組織型がやや多彩な傾向を示した．

癌腫の深達度は 1 群で m 18 個 (72%)，sm 4 個 (16%)，ss 3 個 (12%) を示したのに対し 2 群では全例が m と便流遮断により深達度の低い傾向がみられた．また胆汁酸付加投与の各群では 3 群，4 群が全例 m，5 群では 2 個 (29%) が sm，6 群では sm，ss 各 1 個 (8 %)，7 群では sm 5 個 (18%)，pm 3 個 (11%)，ss 2 個 (7 %) と，便流遮断 MNNG 単独投与群に比し胆汁酸付加投与により深達度は高度な傾向を示し，特に 2 次胆汁酸付加投与群で pm 以上の浸潤を示す癌腫が多く認みられた．

Table 3. Morphological types of colon tumors in normal rats instilled with MNNG and colostomized rats instilled with MNNG or MNNG and bile acids

Group	No. of carcinomas	No. (%) of carcinomas showing type* of				No. of adenomas	No. (%) of adenomas showing type** of			
		IIa	Is	Ip	Borrmann 1		I	II	III	IV
1. Normal+MNNG	25	5(20)	16(64)	1(4)	3(12)	20	3(15)	11(55)	5(25)	1(5)
2. Colostomy+MNNG	5	3(60)	2(40)			1			1(100)	
3. Colostomy+MNNG+CDCA	4	2(50)	2(50)			2		1(50)	1(50)	
4. Colostomy+MNNG+UDCA	5	1(20)	4(80)			4	1(25)	3(75)		
5. Colostomy+MNNG+CA	7	3(43)	3(43)	1(14)		2		2(100)		
6. Colostomy+MNNG+DCA	12	4(33)	7(58)		1(8)	4	1(25)	0	3(75)	
7. Colostomy+MNNG+LC	28	9(32)	12(43)	2(7)	5(18)	7		2(29)	5(71)	

* : Morphological classification of colon carcinomas was performed by the General Rules of Japanese Research Society for Cancer of Colon and Rectum[21].

** : Morphological classification of adenomas was performed by the description of YAMADA[22].

Table 4. Sizes of colon tumors in normal rats instilled with MNNG and colostomized rats instilled with MNNG or MNNG and bile acids

Group	No. of carcinomas	No. (%) of cacinomas showing size (mm) of			No. of adenomas	No. (%) of adenomas showing size (mm) of		
		<5	5−10	>10		<5	5−10	>10
1. Normal+MNNG	25	5(20)	13(52)	7(28)	20	13(65)	6(30)	1(5)
2. Colostomy+MNNG	5	4(80)		1(20)	1			1(100)
3. Colostomy+MNNG+CDCA	4	3(75)	1(25)		2	2(100)		
4. Colostomy+MNNG+UDCA	5	1(20)	3(60)	1(20)	4	4(100)		
5. Colostomy+MNNG+CA	7	3(43)	2(29)	2(29)	2	1(50)	1(50)	
6. Colostomy+MNNG+DCA	12	8(67)	3(25)	1(8)	4	3(75)	1(25)	
7. Colostomy+MNNG+LC	28	8(29)	15(54)	5(18)	7	3(43)	2(29)	2(29)

転移，脈管侵襲はいずれの癌腫にも認められなかった．

腺腫の合併は1群で10匹（40%）を示したのに対し便流遮断の2群では認められず，胆汁酸付加投与の3群で1匹（33%），4群で1匹（25%），5群で1匹（17%），6群で2匹（20%），7群で6匹（46%）と，胆汁酸付加投与群，殊にLC付加投与群で腺腫合併率は無処置群と同等の割合を示した（表5.6.7.8.9.10.11.）．

VI. MNNG誘発大腸腫瘍の組織像の特徴

ここで代表症例を提示する．

症例1：ラットNo. X-84-2．無処置ラット+MNNG群．30週目屠殺．

摘出標本の肉眼所見で3個の腫瘍を認める．歯状線から3.5 cmに径7×7×6 mm，Is型の腫瘍を認め，表面は平滑で発赤を伴う．歯状線より8.8 cmには径

Table 5. Histological types of colon carcinomas in the group of "normal+MNNG"

Case	No. of carcinomas	Histological type	Depth of invasion	Complicated tumor
1	1	Well diff. a. c.*	m**	—
2	1	Well diff. a. c.	m	—
3	1	Well diff. a. c.	m	—
4	1	Well diff. a. c.	m	—
5	1	Well diff. a. c.	m	—
6	1	Well diff. a. c.	m	—
7	1	Well diff. a. c.	m	Adenoma
8	1	Well diff. a. c.	m	Adenoma
9	1	Well diff. a. c.	m	Adenoma
10	1	Well diff. a. c.	m	Adenoma
11	1	Well diff. a. c.	m	Adenoma
12	1	Well diff. a. c.	sm	—
13	1	Well diff. a. c.	sm	Adenoma
14	1	Well diff. a. c.	ss	—
15	1	Well diff. a. c.	ss	Adenoma
16	1	Mod. diff. a. c.	sm	—
17	1	Mod. diff. a. c.	sm	—
18	2	Well diff. a. c.	m	—
		Well diff. a. c.	m	
19	2	Well diff. a. c.	m	Adenoma
		Well diff. a. c.	m	
20	2	Well diff. a. c.	m	Adenoma
		Well diff. a. c.	m	
21	2	Well diff. a. c.	m	Adenoma
		Well diff. a. c.	ss	

* : Well diff. a. c., well differentiated adenocarcinoma ; Mod. diff. a. c., moderately differentiated adenocarcinoma.
** : m, mucosal layer ; sm, submucosal layer ; ss, subserosal layer.

Table 6. Histological types of colon carcinomas in the group of "colostomy+MNNG"

Case	No. of carcinomas	Histological type	Depth of invasion	Complicated tumor
1	1	Well diff. a. c.	m	—
2	1	Well diff. a. c.	m	—
3	1	Well diff. a. c.	m	—
4	2	Well diff. a. c.	m	—
		Well diff. a. c.	m	

25×22×10 mm，Borrmann I 型の腫瘍をみ，表面は凹凸不整，粗大結節状で灰白色調を呈する．また歯状線より 12 cm に 16×12×10 mm，分葉状の山田IV型の腫瘍を認め，表面は顆粒状で発赤を伴う（写真1）．

歯状線より 12 cm，山田IV型腫瘍のルーペ像では樹枝状に分葉する腺管の増生を認める（写真2）．強拡大像で腫瘍細胞は異型性に乏しく，腺腫の組織像である（写真3）．

歯状線より 8.8 cm，Borrmann 1 型腫瘍のルーペ像では，異型腺管が漿膜下層にまで浸潤する像が認められる（写真4）．強拡大像では組織学的に高分化腺癌を示したが，脈管侵襲は認められない（写真5）．

症例2：ラット No. H－66－2．人工肛門ラット＋MNNG＋LC 群．30 週目屠殺．

肉眼所見では歯状線より 9.5 cm に径 7×7×5 mm，Borrmann 1 型の腫瘍を認める．表面は平滑で色調はやや発赤を伴う（写真6）．ルーペ像では異型腺管が粘膜下層を越え，固有筋層にまで浸潤する像が認められる（写真7）．強拡大像では組織型は高分化腺癌を示し，脈管侵襲は認められない（写真8）．

症例3：ラット No. F－52－1．人工肛門ラット＋MNNG＋DCA 群．30 週目屠殺．

歯状線から 4.7 cm，径 4×3×2 mm の Borrmann 1 型腫瘍のルーペ像で，腫瘍細胞はビマン性に浸潤し，粘膜下層では mucinous な増殖を示し，一部固有筋層を越えて漿膜下層に達する（写真9）．同腫瘍の強拡大像

Table 7. Histological types of colon carcinomas in the group of "colostomy＋MNNG＋CDCA"

Case	No. of carcinomas	Histological type	Depth of invasion	Complicated tumor
1	1	Well diff. a. c.	m	–
2	1	Well diff. a. c.	m	Adenoma
3	2	Well diff. a. c.	m	–
		Well diff. a. c.	m	

Table 8. Histological types of colon carcinomas in the group of "colostomy＋MNNG＋UDCA"

Case	No. of carcinomas	Histological type	Depth of invasion	Complicated tumor
1	1	Well diff. a. c.	m	–
2	1	Well diff. a. c.	m	–
3	1	Well diff. a. c.	m	Adenoma
4	2	Well diff. a. c.	m	–
		Well diff. a. c.	m	

Table 9. Histological types of colon carcinomas in the group of "colostomy＋MNNG＋CA"

Case	No. of carcinomas	Histological type	Depth of invasion	Complicated tumor
1	1	Well diff. a. c.	m	–
2	1	Well diff. a. c.	m	–
3	1	Well diff. a. c.	m	–
4	1	Well diff. a. c.	sm	–
5	1	Well diff. a. c.	sm	Adenoma
6	2	Well diff. a. c.	m	–
		Well diff. a. c.	m	

Table 10. Histological types of colon carcinomas in the group of "colostomy+MNNG+DCA"

Case	No. of carcinomas	Histological type	Depth of invasion	Complicated tumor
1	1	Well diff. a. c.	m	–
2	1	Well diff. a. c.	m	–
3	1	Well diff. a. c.	m	–
4	1	Well diff. a. c.	m	–
5	1	Well diff. a. c.	m	–
6	1	Well diff. a. c.	m	–
7	1	Well diff. a. c.	m	–
8	1	Well diff. a. c.	m	Adenoma
9	2	Well diff. a. c.	m	–
		Well diff. a. c.	sm	
10	2	Well diff. a. c.	m	Adenoma
		Sig. ring c. c.*	ss	

* : signet-ring cell carcinoma.

Table 11. Histological types of colon carcinomas in the group of "colostomy+MNNG+LC"

Case	No. of carcinomas	Histological type	Depth of invasion	Complicated tumor
1	1	Well diff. a. c.	m	–
2	1	Well diff. a. c.	m	–
3	1	Well diff. a. c.	m	Adenoma
4	1	Well diff. a. c.	sm	–
5	1	Well diff. a. c.	sm	Adenoma
6	1	Well diff. a. c.	pm**	Adenoma
7	1	Squamous c. c.*	m	–
8	2	Poor. diff. a. c.	sm	–
		Well diff. a. c.	ss	
9	2	Well diff. a. c.	m	Adenoma
		Well diff. a. c.	pm	
10	3	Well diff. a. c.	m	–
		Well diff. a. c.	m	
		Well diff. a. c.	sm	
11	4	Well diff. a. c.	m	–
		Well diff. a. c.	m	
		Well diff. a. c.	m	
		Well diff. a. c.	ss	
12	5	Well diff. a. c.	m	Adenoma
		Well diff. a. c.	m	
		Well diff. a. c.	m	
		Well diff. a. c.	m	
		Well diff. a. c.	sm	
13	5	Well diff. a. c.	m	Adenoma
		Well diff. a. c.	m	
		Well diff. a. c.	m	
		Well diff. a. c.	m	
		Well diff. a. c.	pm	

* : Squamous c. c., squamous cell carcinoma ; Poor. diff. a. c., poorly differentiated adenocarcinoma.
** : proper muscular layer.

では，組織型は印環細胞癌を示し，脈管侵襲は認められなかった(写真10)．またPAS染色で胞体内の粘液が証明された（写真11)．

症例4：ラットNo. H-63-1．人工肛門ラット＋MNNG＋LC群．30週目屠殺．

歯状線より0.7cm，径2×2×1 mm，Is型の腫瘍のルーペ像で粘膜上皮に腺管の形成を伴わない腫瘍細胞の増殖が認められる(写真12)．強拡大像では多数の核分裂像を伴う細胞異型の著明な偏平上皮癌である(写真13)．

Ⅶ. 体重変化

体重の推移は便流非遮断群（無処置ラット群）ではMNNG投与後，30週の屠殺時まで漸次一定の増加傾向を示す上昇曲線を描いたのに対し，便流遮断群（人工肛門ラット群）では人工肛門造設後1週目はやや減少するも2週後には術前体重を上回り，術後2週目において外科的侵襲は解除されたと判断した．以後の体重の推移は漸増曲線を示したが便流非遮断群に比し術後1ケ月目より増加勾配は小さく，屠殺時には100g以上の体重差が認められた．これは人工肛門造設に伴う消化吸収面での影響を反映したものと思われた(図3)．

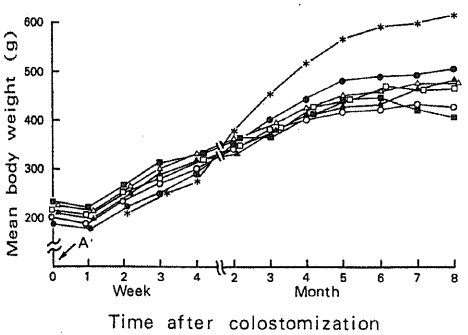

Fig. 3. Change in body weight of normal rats instilled with MNNG and colostomized rats instilled with MNNG or MNNG and bile acid. MNNG was instilled for two weeks, beginning two weeks after colostomization (arrow A), and each bile acid was instilled for the subsequent four weeks. *, group of "normal+MNNG"; ●, group of "colostomy+MNNG"; ○, group of "colostomy+MNNG+CDCA"; ▲, group of "colostomy+MNNG+UDCA"; △, group of "colostomy+MNNG+CA"; ■, group of "colostomy+MNNG+DCA"; □, group of "colostomy+MNNG+LC". Number of rats used for each group is indicated in Fig. 2.

考　　察

近年本邦における大腸癌発生率は漸次増加する傾向にあり[4)5)]，その最大の疫学的要因として食生活の欧米化が指摘されている[9)23)]．すなわちWynderら[3)9)10)]は世界各国における脂肪消費量と大腸癌発生率との間に高い相関がみられることから[15)]，日本における大腸癌発生率の漸増要因として食生活の欧米化に伴う脂肪摂取量の増加を挙げ，高脂肪食の摂取が大腸癌発生に重要な影響を及ぼしていると述べている．このことは通常の日本人米国移住者の大腸癌発生率が移住後，米国人発生率に近似する傾向を示すのに対し，移住後も日本の食習慣を続けている移住者では発生率の増大がみられないこと[6)-8)]からも推察される．

実験的にもNigroら[24)]は発癌剤アゾキシメタン（Azoxymethane，以下AOMと略）皮下注射投与によるラット大腸発癌実験で，標準飼料投与群と35%牛脂肪添加飼料投与群の対比結果から，1匹当りの大腸腫瘍発生個数が標準飼料投与群の3.10±0.58個に対し高脂肪飼料投与群では4.55±0.46個と高脂肪飼料投与によって腫瘍個数の有意の増加を認めている．またReddyら[25)]はラットに脂肪添加飼料としてコーンオイル5%，コーンオイル20%，ラード5%，ラード20%を与えた1-2-ジメチルヒドラジン(1-2-Dimethylhydrazine，以下DMHと略)誘発大腸腫瘍発生率の検討から，各々36%，64%，17%，67%と脂肪の種類に関係なく投与された脂肪量によって腫瘍発生率に有意の差異が認められたと報告している．

このように脂肪摂取量の増大は大腸癌発生上，促進的役割を演じていることは推定に難くない．

ところで，脂肪の摂取は代謝過程で胆汁酸と密接な関連性を有することは周知のところである[26)27)]．即ち，胆汁酸は肝細胞でコレステロールの側鎖が切れて生ずる異化代謝産物で，腸管に排泄された1次胆汁酸(CA，CDCA）は腸内細菌，殊に嫌気性菌による7 α脱水酸化を受けた後，2次胆汁酸（DCA，LC）に変換されその殆んどが主に回腸末端で再吸収されて再び肝に至る極めて閉鎖的な腸管循環を営んでいる．同時に，肝における胆汁酸生成系をフィードバック調節しステロールのホメオスターシスを維持している．このような胆汁酸代謝過程に対し高脂肪食摂取はコレステール給供の増加のみならず脂肪酸，グリセリドとの混合ミセル形成によるコレステロール吸収効率の増大を惹起し胆汁酸生成の促進とともに胆汁酸排泄量の増加をきたすことが指摘されている[12)28)-31)]．

Reddyら[13)]は高脂肪食摂取に伴うかかる胆汁酸代謝の変化に着目し，疫学的な面から，胆汁酸と大腸発癌

との因果関係について検索した．すなわち日本人，中国人，米国人の糞便中胆汁酸分析を行った結果，脂肪摂取量の多い米国人での胆汁酸排泄量は日本人，中国人の約3～5倍に及び，胆汁酸組成でもCAは約1.5～3倍，DCAは約2.5～5倍，LCは約4倍を示したとし，米国人での大腸癌罹患率の高い事実と併せて胆汁酸排泄量の増加並びに胆汁酸組成の変化が大腸発癌と密接な関連性を有すると述べている．同様にHillら[14)15)]も我国を含めたアジア・アフリカ・欧米諸国の大腸癌発生率と糞便中胆汁酸排泄量とが正の相関を示すことを報告し，糞便内への胆汁酸排泄量の増加が大腸発癌に対し促進的に関与することを推察している．

本邦でも小森ら[32)]は大腸担癌生体における胆汁中胆汁酸分析から，大腸癌患者の胆汁酸組成比に変化を認め，また実験的に発癌剤DMHおよびMNNG誘発ラット大腸発癌過程での胆管胆汁分析から発癌剤の種類に関係なく大腸粘膜上皮の異型腺管出現時期と一致してCAの増加CDCA，LCの減少をみたことより，胆汁酸組成比の変化が大腸癌発生増殖過程で促進的内的環境を形成している可能性を指摘している．

以上の結果は高脂肪食摂取に伴う二次的変化としての糞便中胆汁酸の増大，または組成比の変化のいずれにせよ胆汁酸が大腸癌発生増殖に対し重要な要因をなすことを示唆するもので，その因果関係の究明は大腸癌のCarcinogenesis解明の一端を担うものと言える．

さて，大腸の主な生理学的機能は糞便の排泄にあるが，糞便の存在は大腸癌に対する外的noxaのみならず胆汁酸プールの場として抱括的に把握されるものと考えられる．

糞便の存在と大腸癌との関連性についてBurkittら[33)]は摂取食品中の線維成分と大腸癌発生率との因果関係に対する研究から，低線維食品は便秘傾向を助長し，糞便の腸内滞留時間の延長をきたすことが大腸癌発生率増加の一因を成すと結論し，また臨床的には大腸の腺腫や癌腫が空置手術後次第に縮少ないし消失したという報告[34)35)]とともに，家族性ポリポージスの患者に対し大腸亜全摘，回腸直腸吻合術を施行した結果，残存直腸のポリープが縮少または消失したとの事実[36)-38)]から，糞便の存在が大腸癌発生増殖に対し重要な影響を及ぼしていることを示唆している．

Campbellら[39)]はラットの上行結腸に人工肛門を造設し，便流遮断空置大腸に対する発癌剤AOMによる大腸発癌実験から，無処置ラットに比べ便流遮断空置大腸では有意に腫瘍発生率の低下を認め，また片柳[40)]，小平ら[41)]もDMH誘発大腸発癌実験で上行下行結腸曲部に作成した人工肛門造設に伴う便流遮断空置大腸では腫瘍発生率の低下をみたと述べている．更にNavarreteら[42)]，Spjutら[43)]も発癌剤3-2′-ジメチル-4-アミノビフェニール（3-2′-Dimethyl-4-aminobiphenyl，以下DMABと略）皮下注射投与によるラット大腸発癌実験で，下行結腸に造設された人工肛門に伴う便流遮断空置大腸では腫瘍の発生が認められなかったと報告し，いずれの実験でも糞便が大腸発癌に促進的に作用したと結論している．

しかし，AOM，DMH，DMAB等の発癌剤の大腸粘膜に至る到達経路は血行性に大腸粘膜に作用するだけでなく，肝で代謝された後胆汁を介し糞便中に排泄され直接大腸粘膜に作用することから[18)40)43)44)]，便流遮断空置大腸で発癌率の低下をみることは当然の帰結で，便流と大腸発癌との因果関係を立証する実験モデルとは言い難い．即ち純粋に便流の影響のみを検索し得る適切な発癌剤による検索が要求される．

1971年Narisawaら[19)]は発癌剤MNNG水溶液を注腸投与することによりラット大腸に腺癌，腺腫を高率に発生せしめることに成功したが，MNNGの発癌作用経路は大腸粘膜に対する直接的接触作用によるものとされ[45)]，血中を介し大腸以外の他臓器での腫瘍の発生は報告されていない[19)46)47)]．

そこで著者は大腸癌の発生過程における便流の存在の意義を究明するため，ラットの上行結腸に人工肛門を造設し，末梢側大腸の便流遮断を図り，便流遮断空置大腸でのMNNG注腸投与による大腸発癌について検討した．その結果，MNNG誘発大腸腫瘍発生率および癌腫，腺腫発生率は便流非遮断群の各々73.5%，61.8%，41.2%に対し，便流遮断MNNG単独投与群ではそれぞれ13.5%，10.8%，2.7%と便流遮断により腫瘍および癌腫，腺腫発生率はいずれも有意の低下を示した（$p<0.001$）．また得られた腫瘍個数並びに癌腫，腺腫個数も便流非遮断群では1匹当りそれぞれ1.3個，0.7個，0.6個を示したのに対し，便流遮断MNNG単独投与群では各々0.16個，0.15個，0.03個と便流遮断群において発生個数の有意の（$p<0.01$）減少を認めた．

この結果は外的noxaとしてのMNNGの発癌作用に対し糞便の存在が促進的内的環境を形成していることを示唆するもので，前述の糞便内胆汁酸と大腸癌発生率の関連性を考慮すると胆汁酸プールの場としての糞便の意義が注目される．

かかる観点から著者は人工肛門造設に伴う便流遮断空置大腸に対しMNNG並びに各種胆汁酸を付加注腸投与しMNNG誘発大腸癌の発生増殖に対し胆汁酸が如何なる影響を及ぼすかを検討した．

その結果，便流遮断空置大腸におけるMNNG誘発大腸腫瘍発生率および癌腫発生率はMNNG単独投与群では各々13.5%，10.8%を示したのに対し，CDCA付

加投与群では14.3%，10.7%，UDCA付加投与群では25%，14.3%，CA付加投与群では24%，24%と，1次胆汁酸付加投与群ではやや増加する傾向を示すも有意差は認められなかった．一方DCA付加投与群では各々50%，41.7%，LC付加投与群では70%，65%と2次胆汁酸付加投与群ではMNNG単独投与群に比しいずれの発生率も有意の（$p<0.01$）増加を示した．

また得られた腫瘍個数並びに癌腫個数でも，1匹当りの個数はMNNG単独投与群の各々0.16個，0.15個に対し，CDCA，UDCA，CAの1次胆汁酸付加投与群ではやや増加する傾向を示すも有意差は認められなかったのに比し，2次胆汁酸付加投与群ではDCA付加投与群で各々0.67個，0.5個，LC付加投与群ではそれぞれ1.75個，1.4個と，いずれも有意の（$p<0.05$）増加を示した．

即ち便流遮断空置大腸に対し，2次胆汁酸付加投与によって腫瘍発生率並びに腫瘍個数はいずれも有意の増加を示し，しかも便流非遮断ラットにおける腫瘍発生率と近似する傾向を示したことから，2次胆汁酸が大腸発癌機構の上で促進的な作用を有することが示唆された．

ところで，Narisawaら[48]，Reddyら[49)-51]はMNNG注腸投与によるラット大腸発癌実験に於いて無処置ラットにCA，CDCA，DCA，LCの各種胆汁酸付加注腸投与を行ない，各種胆汁酸の単独注腸投与では腫瘍の発生を認めなかったことより胆汁酸自体の発癌性を否定すると同時に，MNNG単独投与群に比し全ての胆汁酸付加投与群で大腸腫瘍の発生率が増加を示したとし，1次胆汁酸，2次胆汁酸に関係なく，大腸発癌に対しCo-carcinogenicに作用するものとしている．また，Sauerら[52]も発癌剤DMH誘発大腸発癌実験においてCDCA水溶液を経口的に投与したところ，大腸腫瘍の発生率はCDCA非投与ラットに比べて約3倍に増加したと報じ，CDCAが大腸癌発生上促進作用を示すと述べている．

しかし，CA，CDCAの1次胆汁酸は腸内細菌叢，特に嫌気性菌の作用により，7α脱水酸化され2次胆汁酸に変換されることから[26)27]，これらの実験では腸内細菌叢を伴う通常の便流が維持されているため，経口投与，注腸投与の如可んに拘らず投与された1次胆汁酸から2次胆汁酸への変換を否定できず[51]，1次胆汁酸の大腸癌発生増殖に及ぼす影響を正確には反映していないものと推察される．

このことはCohenら[53]も発癌剤N-メチル-N-ニトロソウレア（N-methyl-N-nitrosourea）注腸投与によるラット大腸発癌実験で，標準飼料に0.2%CAを添加したところ対照の標準飼料投与群に比し発生腫瘍個数の有意の増加を認めたが，その糞便中胆汁酸を分析した結果CA添加飼料投与群では対照群に比し糞便中CAはほぼ等しい値を示したのに対しDCAが約4倍と著明な増加をみたことから，経口投与されたCAが直接影響を及ぼしたのではなく，その腸内細菌による7α脱水酸化物質である2次胆汁酸DCAが大腸腫瘍発生に促進的に作用したものと報じていることからも説明される．

著者の実験では大腸粘膜に通常の便流との接触をなくしMNNGに依るinitiate後同一条件下で各種胆汁酸を直接作用させたもので空置大腸内の細菌叢に対する検索は行っていないが1次胆汁酸付加投与群では腫瘍発生率は増加せず，2次胆汁酸付加投与群で有意の増加を示す結果が得られたことから，空置大腸内細菌叢の影響すなわち付加投与された1次胆汁酸の2次胆汁酸への変換は存在したとしても極く僅少なものと推察され，依って1次胆汁酸自体には発癌促進作用の無いことが示された．

さて胆汁酸自体の発癌性については胆汁酸の分子構造が強力な発癌物質メチルコラントレン（Methylcholanthrene）に類似することより[54]，生体内でメチルコラントレンあるいはそれに類似した発癌物質に変換される可能性が推測されている[15)55]．即ちAriesら[5]，Hillら[14)29]は疫学的研究から大腸癌多発地域では糞便中に多量の嫌気性菌，殊にBacteroides，Bifidobacterium，Clostridiumを検出しこれら嫌気性菌の存在下に胆汁酸からメチルコラントレンの構造に近づける第1の過程として嫌気性菌のΔ^4-脱水素酵素によるステロイド核の不飽和化を証明し得たと述べているが，未だメチルコラントレンに至る全経路は解明されていない．またDruckreyら[56]はDCAに大腸菌を作用させ同定はされていないが発癌性のある物質が生成されたと報じ，腸内細菌叢に起因した種々の酵素と胆汁酸から未知の発癌物質が生成される可能性は今なお完全には否定できない[57)-59]．しかしながら前述のNarisawaら[48]，Reddyら[49)-51]の胆汁酸単独投与実験では腫瘍の発生をみなかったように，大腸に対する発癌性は未だ実証は得られておらず，少なくとも便流の遮断された環境下の著者の実験で大腸に高率に発癌せしめる物質が2次胆汁酸から生成されたとは考え難い．従って2次胆汁酸は大腸発癌機序の上でCarcinogenicというよりCo-carcinogenicな作用を有すると考えるのが妥当であろう[23)50]．

このような大腸癌に対する2次胆汁酸の促進作用から糞便の大腸癌発生増殖に及ぼす影響を考察すると，糞便内にプールされた2次胆汁酸がその主役を演じ，高線維食摂取が大腸癌発生率の低下をもたらすという

疫学的事実[33]と併せると，非消化性線維による糞便容積の増大に伴う2次胆汁酸の希釈及び糞便の腸内滞留時間の短縮が2次胆汁酸と大腸粘膜の接触を抑制することは推定に難くない[23].

一方，低線維食である高脂肪食の摂取は1次胆汁酸排泄量の増加に加えて糞便容積の減少による胆汁酸濃度の増大，大腸粘膜に対する接触時間の延長を惹起し，大腸癌の発生機序の上で促進的環境を形成するものと推察される.

以上より，DCA, LC が MNNG 誘発大腸癌発生に促進因子として作用することが判明し，大腸癌発生における2次胆汁酸の存在の重要性が示唆された.

結　　論

大腸発癌と胆汁酸との因果関係を解明する一端として MNNG 誘発大腸癌における便流遮断の影響を検索すると同時に，便流遮断空置大腸に対する各種胆汁酸の付加投与が大腸癌発生にいかなる影響を及ぼすか検討し，以下の結論を得た.

1. 便流非遮断群および便流遮断 MNNG 単独投与群における MNNG 誘発腫瘍発生率並びに癌腫及び，腺腫発生率は前者では各々73.5%，61.8%，41.2%を示したのに対し，後者ではそれぞれ13.5%，10.8%，2.7%と，いずれも便流遮断により有意の（$p<0.001$）低下を示した.

2. 便流遮断空置大腸に対する MNNG 単独投与群および各種胆汁酸付加投与群における腫瘍発生率並びに癌腫発生率は MNNG 単独投与群では各々13.5%，10.8%，に対し CDCA 付加投与群では各々14.3%，10.7%，UDCA 付加投与群では 25%，14.3%，CA 付加投与群では 24%，24%と1次胆汁酸付加投与群では有意差を認めなかった．一方，2次胆汁酸付加投与群である DCA 付加投与群では各々50%，41.7%，LC 付加投与群では各々70%，65%と2次胆汁酸付加投与群で MNNG 単独投与群に比し有意の（$p<0.01$）増加を示した.

3. 便流非遮断群および便流遮断 MNNG 単独投与群における1匹当りの発生腫瘍個数並びに癌腫，腺腫個数は前者のそれぞれ1.3個，0.7個，0.6個に対し，後者では各々0.16個，0.14個，0.03個と，便流遮断によりいずれも有意に（$p<0.01$）減少した.

4. 各種胆汁酸付加投与群における1匹当りの発生腫瘍個数並びに癌腫個数は，MNNG 単独投与群の各々0.16個，0.14個に比し CDCA 付加投与群では各々0.21個，0.14個，UDCA 付加投与群では 0.32個，0.18個，CA 付加投与群では 0.36個，0.28個と1次胆汁酸付加投与群では有意差を認めなかったのに対し，DCA 付加投与群では各々0.67個，0.5個，LC 付加投与群では各々1.75個，1.4個と2次胆汁酸付加投与群でいずれも有意に（$p<0.05$）増加した.

5. 得られた大腸腫瘍の病理組織所見は全て隆起型で，癌腫は DCA 付加投与群の1例に印環細胞癌，LC 付加投与群の1例に偏平上皮癌を認めた以外，全て腺癌を示した．腫瘍占居部位，肉眼形態，組織型の比較検討では，便流非遮断群に比し便流遮断 MNNG 単独投与群で腫瘍径，深達度が小なる傾向を示したが便流遮断胆汁酸付加投与群では MNNG 単独投与群に比し，2次胆汁酸付加投与群で腫瘍径，深達度共にやや大なる傾向を示した.

以上の結果から，実験的大腸癌発生増殖において2次胆汁酸がその促進因子であることが証明された.

稿を終るに臨み，終始ご懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師宮崎逸夫教授に衷心から感謝の意を捧げます．又，終始御助言，御支援をいただいた高島茂樹博士に，また病理学的検索に御教示を仰ぎました本学第2病理野々村昭孝助教授，ならびに御協力をいただいた教室員各位に深甚の謝意を表します.

文　　献

1) **Antonis, A. & Bersohn, I.**: The influence of diet on fecal lipids in South African white and Bantu prisoners. Am. J. Clin. Nutr., **11**, 142 - 155 (1962).

2) **Wynder, E. L. & Shigematsu, T.**: Environmental factors of cancer of the colon and rectum. Cancer, **20**, 1520 - 1561 (1967).

3) **Wynder, W. L. & Reddy, B. S.**: The epidemiology of cancer of the large bowel. Dig. Dis., **19**, 937 - 947 (1974).

4) **平山　雄**: 大腸癌の疫学的変遷と今後の展望・日本臨牀, **39**, 10 - 20 (1981).

5) **Aries, V., Crowther, J. S., Draser, B. S., Hill, M. J. & Williams, R. E. O.**: Bacteria and the aetiology of cancer of the large bowel. Gut, **10**, 334 - 335 (1969).

6) **Aries, V., Crowther, J. S., Draser, B. S. & Hill, M. J.**: Degradetion of bile salts by human intestinal bacteria, Gut, **10**, 575 - 576 (1969).

7) **Haenszel, W., Berg, J. W., Segi, M., Kurihara, M. & Locke, F. B.**: Large - bowel cancer in Hawaiian Japanese. J. Natl. Cancer Inst., **51**, 1765 - 1779 (1973).

8) **Buell, P. & Dunn, J. E.**: Cancer mortality among Japanese Issei and Nisei of California.

Cancer, **18**, 656 - 664 (1965).

9) **Wynder, E. L., Kajitani, T., Ishikawa, S., Doda, H. & Takano, A.**: Environmental factors of cancer of the colon and rectum. II. Japanese epidemiological data. Cancer Colon Rectum, **23**, 1210 - 1220 (1969).

10) **Wynder, E. L.**: The epidemiology of large bowel cancer. Cancer Res., **35**, 3388 - 3394 (1975).

11) **Haubrich, W. S. & Berk, J. E.**: Hereditary polyposis, p1078 - 1084. In H. L. Bochus (ed.), Gastroeterology, 3rd. W. B. saunders Co., Philadelphia, 1976.

12) **Heaton, K. W.**: 胆汁酸, 146 - 148 頁, 東京, 文光堂. 1977.

13) **Reddy, B. S. & Wynder, E. L.**: Large bowel carcinogenesis: Fecal constituents of populations with diverse incidence rates of colon cancer. J. Natl. Cancer Inst., **50**, 1437 - 1442 (1973).

14) **Hill, M. J., Crowther, J. S., Drasar, B. S., Hawksworth, G., Aries, V. & Williams, R. E. O.**: Bacteria and etiology of cancer of large bowel. Lancet, **16**, 7690 - 7695 (1971).

15) **Hill, M. J.**: The role of colon anaerobes in the metabolism of bile acids and steroids, and its relation to colon cancer. Cancer, **36**, 2387 - 2400 (1975).

16) **Walpole, A. L., Williams, M. H. C. & Roberts, D. C.**: The carcinogenic action of 4 - aminobiphenyl and 3 : 2′- dimethyl - 4 - aminobiphenyl. Br. J. Industr. Med., **9**, 255 - 263 (1952).

17) **Laqueur, G. L.**: The induction of intestinal neoplasms in rats with the glycoside cycasin and its aglycon. Virchows Arch. Pathol. Anat., **340**, 151 - 163 (1965).

18) **Weisburger, J. H.**: Chemical carcinogens and their mode of action in colonic neoplasia. Dis. Colon Rectum, **16**, 431 - 437 (1973).

19) **Narisawa, T., Sato, T., Hayakawa, M., Sakuma, A. & Nakano, H.**: Carcinoma of the colon and rectum of rats by rectal infusion of N - methyl - N′- nitro - N - nitrosoguanidine. Gann, **62**, 231 - 234 (1971).

20) **管野晴夫・中村恭一**: 腸癌の病理学的診断・癌の臨床別冊・消化器癌の診断と治療, 190 頁- 198 頁, 東京, 医歯薬出版. 1972.

21) **大腸癌研究会編**: 大腸癌取扱い規約, 第 2 版, 東京, 金原出版. 1980.

22) **山田達哉. 福富久之**: 胃隆起性病変. 胃と腸, **1**, 145 - 150 (1966).

23) **成沢富雄**: 日本人の食生活の変化と大腸癌. 日本臨床, **39**, 2022 - 2027 (1981).

24) **Nigro, N. D., Singh, D. V., Campbell, R. L. & Pak, M. S.**: Effect of dietary beef fat on intestinal tumor formation by Azoxymethane in rats. J. Natl. Cancer Inst., **54**, 439 - 442 (1975).

25) **Reddy, B. S., Narisawa, T., Vukusich, D., Weisburger, J. H. & Wynder, E. L.**: Effect of quality and quantity of dietary fat and dimethylhydrazine in colon carcinogenesis in rats. Pro. Soc. Exp. Bio. Med., **151**, 237 - 239 (1976).

26) **真下啓明・中川昌一・牧野 勲**: 胆汁と胆汁酸. 代謝, **6**, 290 - 296 (1969).

27) **大管俊明・今井洋一・真重文子**: 胆汁酸の腸肝循環. 代謝, **13**,臨増, 1275 - 1283 (1976).

28) **Hill, M. J.**: The effect of some factors on the fecal concentration of acid steroids, neutral steroids and urobilins. J. Pathol., **104**, 239 - 245 (1971).

29) **Hill, M. J.**: Bacteria and the etiology of colonic cancer. Cancer, **34**, 815 - 818 (1974).

30) **Reddy, B. S., Mastromarino, A. & Wynder, E. L.**: Further leads on metabolic epidemiology of large bowel cancer. Cancer Res., **35**, 3403 - 3406 (1975).

31) **Reddy, B. S., Weisburger, J. H. & Wynder, E. L.**: Effects of high risk and low risk diets for colon carcinogenesis on fecal microflora and steroids in man. J. Nutr., **105**, 878 - 884 (1975).

32) **小森和俊・高島茂樹・宮崎逸夫**: 大腸癌発生に伴う胆汁中胆汁酸組成の変化に関する研究. 日外会誌, **81**,臨増, 323 (1980).

33) **Burkitt, D. P.**: Large - bowel cancer: An epidemiologic jigsaw puzzle. J. Natl. Cancer Inst., **54**, 3 - 6 (1975).

34) **Daland, E.**: Case report of Massachusetts General Hospital No. 40412. N. Engl. J. Med., **251**, 664 - 669 (1954).

35) **Localio, S. A.**: Spontaneous disappearance of rectal polyps following subtotal colectomy and ileoproctostomy for polyposis of the colon. Am. J. Surg., **103**, 81 - 82 (1962).

36) **Dunphy, J. E., Patterson, W. B. & Legg, M. A.**: Etiologic factors in polyposis and carcinoma of the colon. Ann. Surg., **150**, 488 - 498 (1959).

37) **Cole, J. W. & Holden, W. D.**: Postcolectomy

regression of adenomatous polyps of the rectum. Arch. Surg., **79**, 385 - 392 (1959).

38) Williams, R. D. & Fish, J. C.: Multiple polyposis, polyp regression, and carcinoma of the colon. Am. J. Surg., **112**, 846 - 849 (1966).

39) Campbell, R. L., Singh, D. V. & Nigro, N. D.: Importance of the fecal stream on the induction of colon tumors by azoxymethane in rats. Cancer Res., **35**, 1369 - 1371 (1975).

40) 片柳照雄: 実験的大腸癌. 最新医学, **32**, 2414 - 2419 (1977).

41) 小平 進・小山晴夫・広田映五・大森敬子・池田栄一: 大腸粘膜の環境と DMH 誘発大腸癌: 糞流と発癌. 大腸肛門誌, **31**, 578 - 585 (1978).

42) Navarrete, A. & Spjut, H. J.: Effect of colostomy on experimentally produced neoplasms of the colon of the rat. Cancer, **20**, 1466 - 1472 (1967).

43) Spjut, H. J. & Noall, M. W.: Experimental induction of tumors of the large bowel of rats. Cancer, **28**, 29 - 37 (1971).

44) Cleveland, J. C., Litvak, S. F. & Cole, J. W.: Identification of the route of action of the carcinogen 3 : 2′- dimethyl - 4 - aminobiphenyl in the induction of intestinal neoplasia. Cancer Res., **27**, 708 - 714 (1967).

45) 成沢富雄: 実験大腸癌研究の概況. 医学のあゆみ, **103**, 203 - 208 (1977).

46) Nakano, H.: Histopathological studies on rat colorectal carcinoma induced by N - methyl - N′- nitro - N - nitro soguanidine. Tohoku J. Exp. Med., **110**, 7 - 21 (1973).

47) 金城福則: N - methyl - N′- nitro - N - nitrosoguanidine (MNNG)による実験的大腸隆起性病変の内視鏡学的研究. Gastroenterol. Endosc., **22**. 193 - 207 (1980).

48) Narisawa, T., Magadia, N. E., Weisburger, J. H. & Wynder, E. L.: Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N - methyl - N′- nitro - N - nitrosoguanidine in rats. J. Natl. Cancer Inst., **53**, 1093 - 1097 (1974).

49) Reddy, B. S.: Role of bile metabolites in colon carcinogenesis. Cancer, **36**, 2401 - 2406 (1975).

50) Reddy, B. S., Watanabe, K., Weisburger, J. H. & Wynder, E. L.: Promoting effect of bile acids in colon carcinogenesis in germ - free and conventional F344 rats. Cancer Res., **37**, 3238 - 3242 (1977).

51) Reddy, B. S. & Watanabe, K.: Effect of cholesterol metabolites and promoting effect of lithocholic acid in colon carcinogenesis in germ - free and conventional F344 rats. Cancer Res., **39**, 1521 - 1524 (1979).

52) Sauer, H. D., Heer, K. & Mitschke, H.: Orale Chenodesoxycholsäuretherapie und kolorektales Karzinom - eine experimentelle Studie. Z. Gastroenterol., **4**, 236 - 243 (1979).

53) Cohen, B. I., Raicht, R. F., Deschner, E. E., Takahashi, M., Sarwal, A. N. & Fazzini, E.: Effect of cholic acid feeding on N - methyl - N - nitrosourea - induced colon tumors and cell kinetics in rats. J. Natl. Cancer Inst., **64**, 573 - 578 (1980).

54) Wieland, H. & Dane, E.: Untersuchungen über die Konstitution der Gallensäuren. Hoppe Sayler's Z. Physiol. Chem., **219**, 240 - 244 (1933).

55) 金澤暁太郎・島田 馨: 大腸細菌叢. 綜合臨床, **26**, 1042 - 1050 (1977).

56) Druckrey, H., Richter, R. & Vierthaler, R.: Zur Endogenen Entstehung Krebserregender Stoffe Beim Mensuchen. Klin. Wschr., **20**, 781 - 785 (1941).

57) Hill, M. J.: Metabolic epidemiology of dietary factors in large bowel cancer. Cancer Res., **35**, 3398 - 3402 (1975).

58) Hill, M. J., Drasar, B. S., Williams, R. E. O., Meade, T. W., Cox, A. G., Simpson, J. E. P. & Morson, B. C.: Fecal bile - acids and clostridia in patients with cancer of the large bowel. Lancet, **8**, 535 - 538 (1975).

59) 金澤暁太郎: 大腸癌と腸内細菌叢の変動. 最新医学, **33**, 2057 - 2061 (1978).

Effect of Bile Acids on Colon Carcinogenesis in Rats Hokaichi Katayama, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **91**, 452–472 (1982)

Key words: Colon carcinoma, Rat, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, Bile acid.

Abstract

In an attempt to evaluate the effect of bile acids on colon carcinogenesis, colostomies were performed approximately 2 cm distal to the cecum of male Wistar rats to produce a segment of defunctionalized colon, and a carcinogenic agent, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), and various components of the bile acids were instilled into the segment via the anus. MNNG was given daily in a dose of 2.5 mg/1 ml for two weeks and one of the bile acid components was given daily in a dose of 10 mg/1 ml for 30 days after MNNG administration. All animals were sacrificed 30 weeks after the beginning of the experiment to histologically examine the incidence of colon tumor. The incidence was 73.5% in the group of normal rats instilled with MNNG and 13.5% in the group of colostomized rats instilled with MNNG. Thus, the isolation of colon from fecal stream resulted in a significant fall ($p<0.001$) of the incidence. When one of the bile acid components was instilled into colostomized rats following the MNNG administration, the incidence of colon tumor was 14.3% with chenodeoxycholic acid (CDCA), 25% with ursodeoxycholic acid (UDCA), 24% with cholic acid (CA), 50% with deoxycholic acid (DCA) and 70% with lithocholic acid (LC). In the groups with the additional administration of the primary bile acids such as CDCA, UDCA and CA, the tumor incidences were not significantly different from that in the group given MNNG alone. In the groups given the secondary bile acids such as DCA and LC, however, a significant increase ($p<0.01$) was noted. The present results suggest the importance of the secondary bile acids as a promoting factor on colon carcinogenesis.

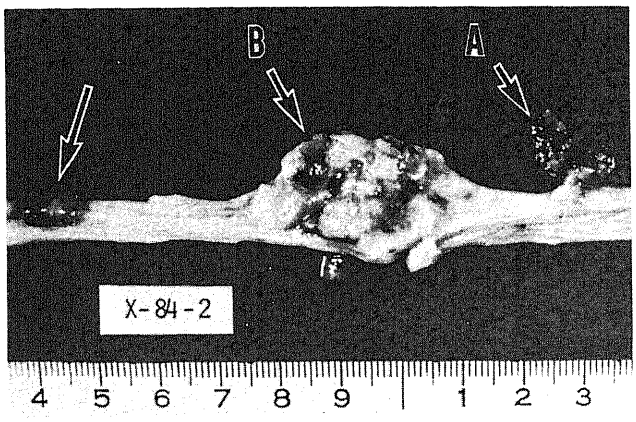

Photo. 1. Case 1, rat No. X - 84 - 2 (normal+MNNG), autopsied at 30 weeks. Gross appearance of the resected specimen. Three tumors (arrowed) are seen on the colon.

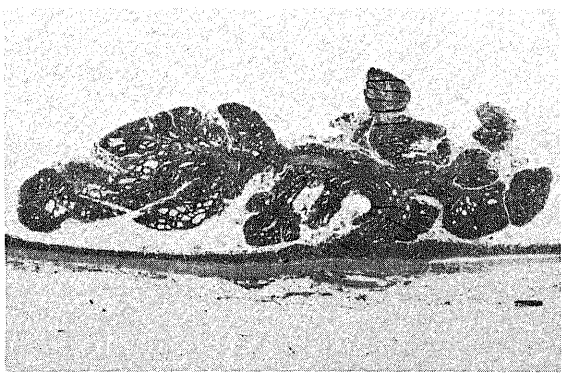

Photo. 2. Histological appearance of the tumor marked with arrow A in photo. 1. Glands are proliferating with lobular architecture. H&E, ×6.5.

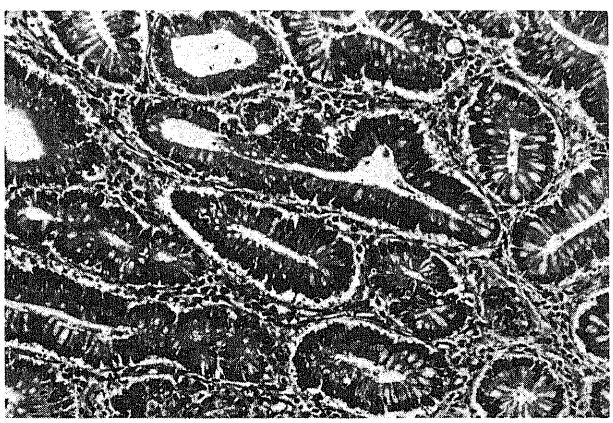

Photo. 3. High power view of the tumor cells in photo. 2, showing tubular adenoma. H&E, ×200

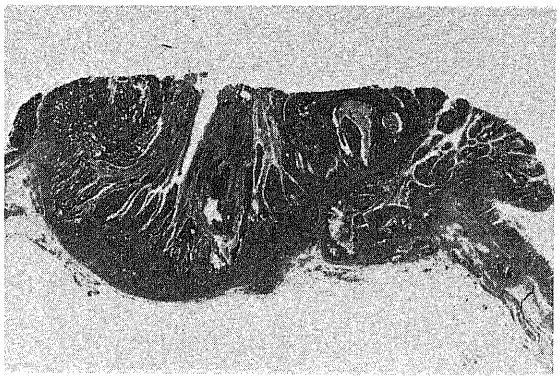

Photo. 4. Histological appearance of the tumor marked with arrow B in photo. 1. Note the invasion of tumor cells into the subserosal layer. H&E, ×5.

Photo. 5. High power view of the tumor cells in photo. 4, showing well differentiated adenocarcinoma. H&E, ×200.

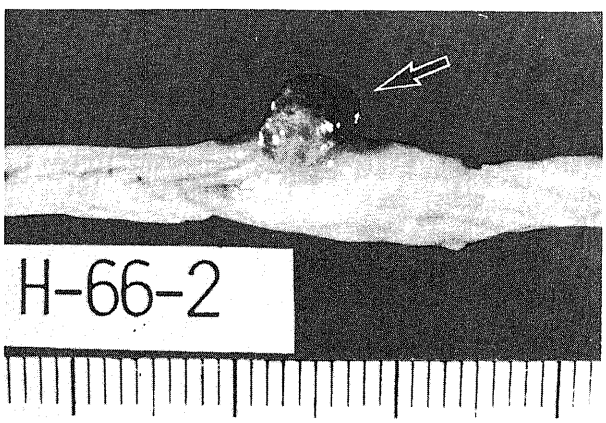

Photo. 6. Case 2, rat No. H-66-2 (colostomy+MNNG+LC), autopsied at 30 weeks. Gross appearance of the resected specimen. Borrmann 1 type tumor is seen on the colon (arrowed).

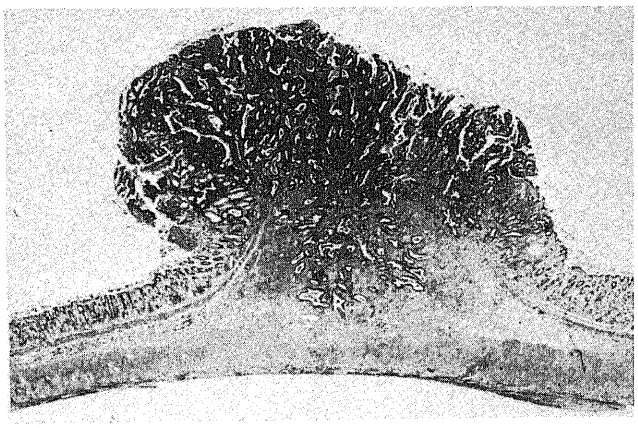

Photo. 7. Histological appearance of the tumor in photo. 6. Note the invasion of tumor cells into the proper muscular layer. H&E, ×12.

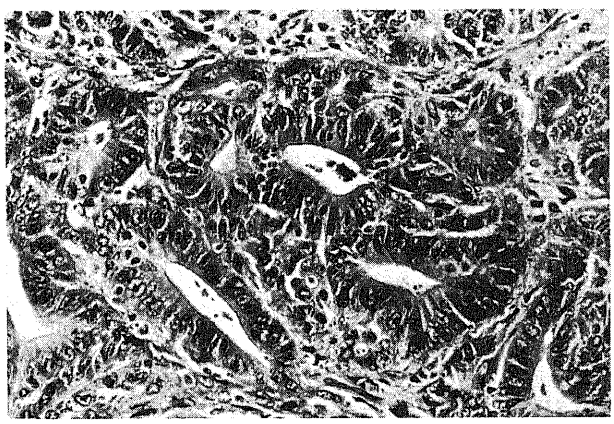

Photo. 8. High power view of the tumor cells in photo. 7, showing well differentiated adenocarcinoma. H&E, ×200.

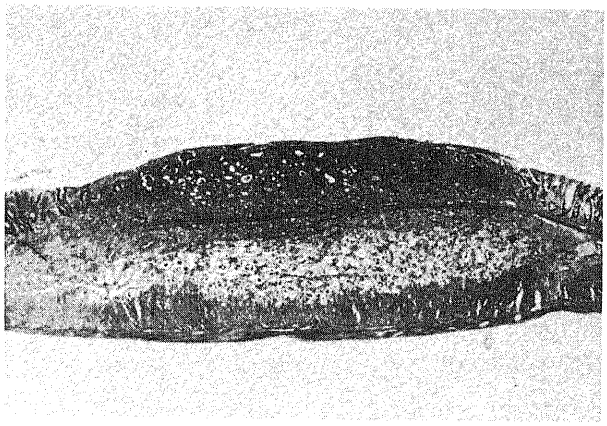

Photo. 9. Case 3, rat No. F-52-1 (colostomy+MNNG+DCA), autopsied at 30 weeks. Histological appearance of the Borrmann 1 type tumor. Tumor cells are invading partially into the subserosal layer and showing mucinous change in the submucosal layer. H&E, ×20.

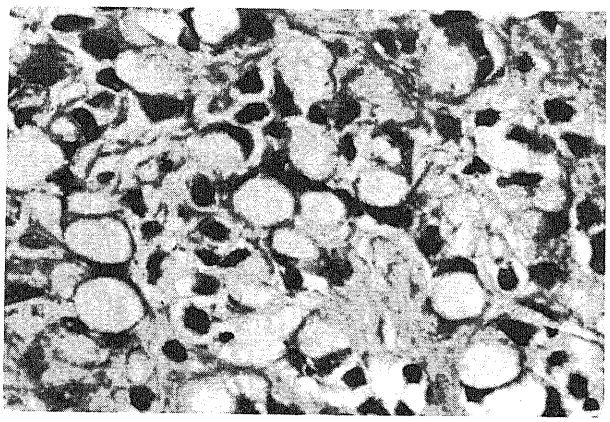

Photo. 10. High power view of the tumor cells in photo. 9, showing signet-ring cell carcinoma. H&E, ×400.

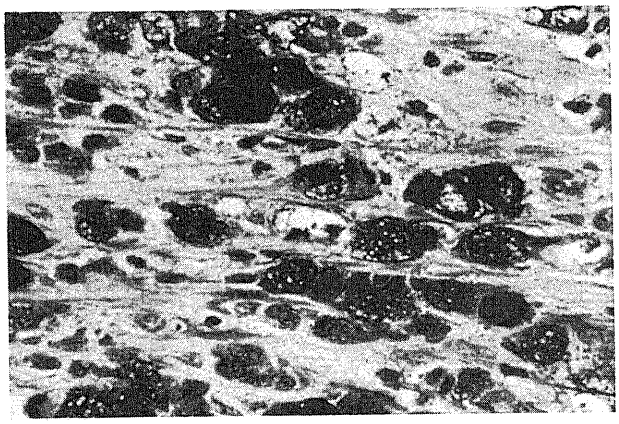

Photo. 11. High power view of the tumor cells in photo. 9, showing cancer cells being PAS positive. PAS, ×400.

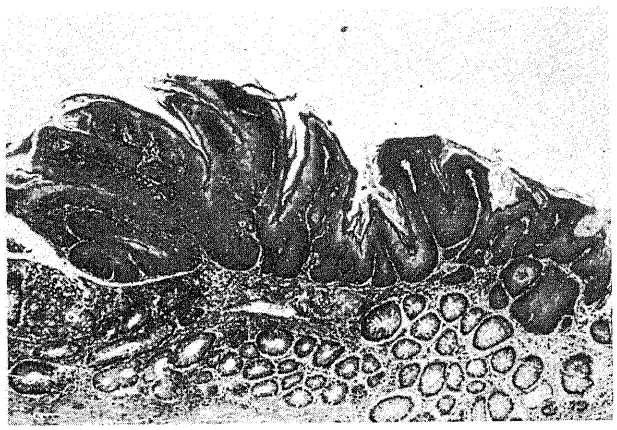

Photo. 12. Case 4, rat No. H-63-1 (colostomy+MNNG+LC), autopsied at 30 weeks. Histological appearance of Is type tumor. Tumor cell proliferation is seen on the mucosa without any gland formation. H&E, ×15.

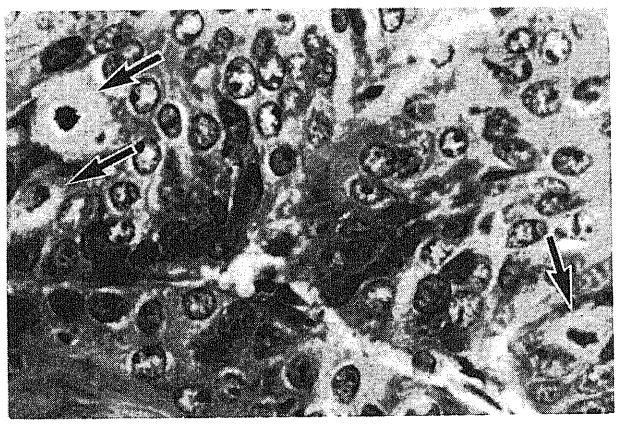

Photo. 13. High power view of the tumor cells in photo. 12, showing squamous cell carcinoma. Note the mitotic figures (arrowed). H&E, ×400.