

大腸を標的とする中・短期発がんモデルの開発に関する研究

研究分担者 吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学講座 教授

研究要旨

大腸粘膜における発がん試験の指標として、前がん病変の病理組織学的な意義を、ラット AOM 大腸発がんモデルで経時的に検討した。その病理組織像の推移から、従前より前がん病変と考えられている変異陰窩巢(aberrant crypt foci ; ACF)よりも早期から粘液染色で陰性の粘液枯渇陰窩巢(mucin-depleted foci ; MDF)が腺腫ないし腺癌に類する所見の有無を検討した結果、ACF と遜色なく、より特異性の高い病変であることが明らかとなった。同時に検討を行った、簡便で再現性の高い、大腸前がん病変標本の組織学的検討法について、ホルマリン充填法が有用であることも確認された。ACF 及び MDF をバイオマーカーとした中・短期での大腸発がん試験法が期待された。

A . 研究目的

ヒト大腸発がん過程において、腺腫・癌連鎖仮説で説明がつかない平坦型大腸癌が最近注目されている。動物モデルでみられる mucin-depleted foci (MDF)は平坦型の前がん病変の可能性がある。そのため、従前から動物モデルでの前がん病変として認識され、発がん予測バイオマーカーとして利用されている aberrant crypt foci (ACF)との病理組織学的な経時的な変化に関して検討し、本研究目的である中短期での発がん試験への利用の可能性を検討した。

B . 研究方法

(ア) 前がん病変の組織学的検索

4週齢のF344ラットに対し、発癌剤azoxymethane (AOM; 15 mg/kg体重)を投与して大腸発癌を誘発し、5、7、10週でと殺を行い、大腸粘膜表面における前がん病変に関して検討した。メチレンブルー染色によってACFないしアルシアンブルー染色で粘液涸渇巢 mucin-depleted foci (MDF)を個々に観察し、その後、大腸粘膜に対し水平に薄切したパラフィン包埋組織標本作製した。大腸粘膜組織標本をHE染色で確認した後、スライドガラスデジタル化装置(バーチャルスライド)により組織標本画像をデータベース化し、インターネットでの観察・閲覧可能な状態を構築した。このバーチャルスライド組織標本を本研究班の病理医に依頼診断してもらい、回答をアンケート形式で募った。

(イ) 大腸前がん病変標本からの組織学的な検索方法の開発

本前がん病変の組織学的検索のための方法論の標準化を目指して、標本作製方法における固定条件・薄切方法等に関して検討した。具体的には固定条件として、ガラス棒挿入法とホルマリン液充填法(それぞれ 5, 15, 20, 30 ml 充填別)での薄切標本での伸展度を比較した。(倫理面への配慮)

倫理面の配慮については、琉球大学動物実験施設の実験動物委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

C . 研究結果

(ア) 前がん病変の組織学的検索

5週目の採取標本において、大腸粘膜表面の観察にて ACF の出現を確認し、同じ領域での組織標本の回答結果は腫瘍性(腺腫)47.4%、過形成病変26.7%、炎症性病変21.1%、病変特定不可15.8%であった。MDFでは、腫瘍性(腺腫)20%、過形成病変33.3%、炎症性病変20%、病変特定不可26.3%であった(図2)。7週目の採材標本において、ACFでは腫瘍性(腺腫)12.5%、過形成病変75%、炎症性病変12.5%であった。MDFでは、腫瘍性(腺腫)38.5%、過形成病変46.2%、炎症性病変0%であった(図3)。10週目の採取標本において、ACFでは腫瘍性(腺腫)54.5%、過形成病変18.1%、炎症性病変9%、病変特定不可18.1%であった。MDFでは、腫瘍性(腺腫)77.7%、腫瘍性(癌腫)16.6%、過形成病変5.5%、炎症性病変0%であった(図4)。結果として、前がん性病変と考えられている ACF や MDF でも早期腫瘍性病変として病理組織診断が可能であると考えられた。特に10週目の MDF の判定では、腫瘍性と診断される一致率が90%を越えていた。

(イ) 大腸前がん病変標本からの組織学的な検索方法の開発

ラット大腸固定法では、ガラス棒法について、腸管壁を強制的に伸展するため、腸管壁の断裂が生じてしまい、病変の評価を十分に行うことが困難であった。ホルマリン充填法の5mlおよび30mlにおいて、腸管はそれぞれ、伸展不十分、過伸展気味であり、形態学的評価を行うには不十分であった。15mlと20mlでは、前者が前がん病変の評価を行うのに適切であると判定された(図5,6)。

D . 考察

各臓器別で早期癌病巣を特定できる中短期モデルの開発を目標に進行しているが、大腸では比較的多くの前がん病変が知られており、特に ACF は従前より、がんの化学予防のバイオマーカーとしても利用されるとともに、ヒトにおいても動物で提唱された前がん病変

の存在が大腸癌の内視鏡的なマーカーとして認識されている。加えて、MDF は中期(10 週)では腫瘍性と病変として認識される率が 9 割以上であり、これらの早期の病理組織学的検索は発がん性試験として十分に利用できると考えられた。また、併せて行った、大腸前がん病変標本からの組織学的な検索方法の検討において、ホルマリン充填法の有用性が確認された。今後、MDF をバイオマーカーとした中・短期での大腸発がん試験法の開発に向け、前がん病変の部位および個数、また、実験に必要とされる動物の最少数を明らかにすることが喫緊の課題である。

E . 結論

大腸発がん試験の代替法として、全大腸粘膜での病理組織学的検索を施行することで、肉眼的な検出できない微小病変の早期病巣の有無の検出方法のシステム化への前段階を行った。

F . 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Sakai E, Yoshimi N et al. Identification of preneoplastic lesions as mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer. Cancer Sci. 103: 144-149, 2012.
 - 2) Cui C, Yoshimi N et al. The re-neoplastic lesion, mucin-depleted foci, reveals as *de novo* high-grade dysplasia in rat colon carcinogenesis Oncology Reports, 27: 1365-1370, 2012.
2. 学会発表
特になし。

G . 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

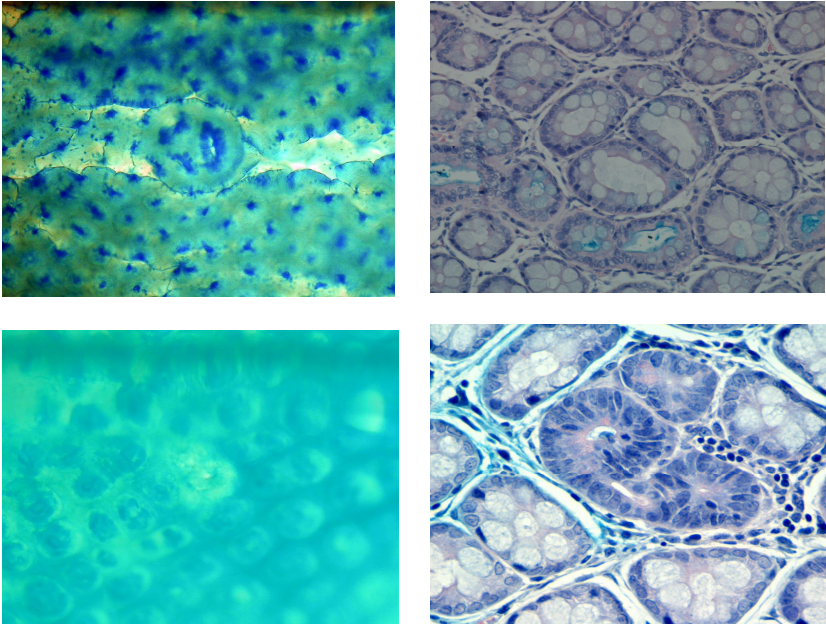


図 1 ACF(上段)と MDF(下段)

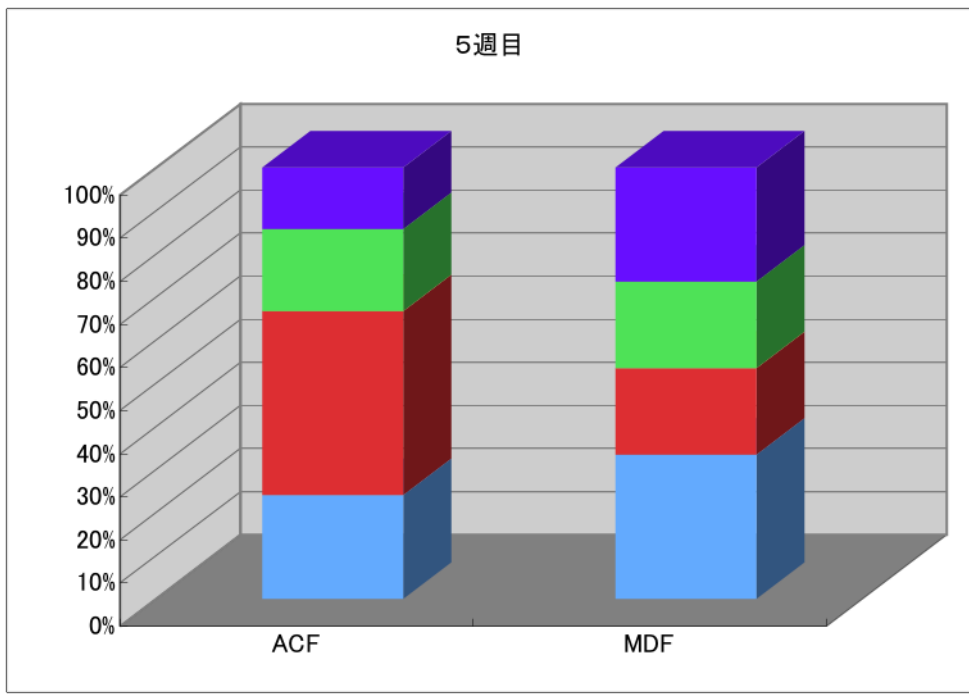


図 2

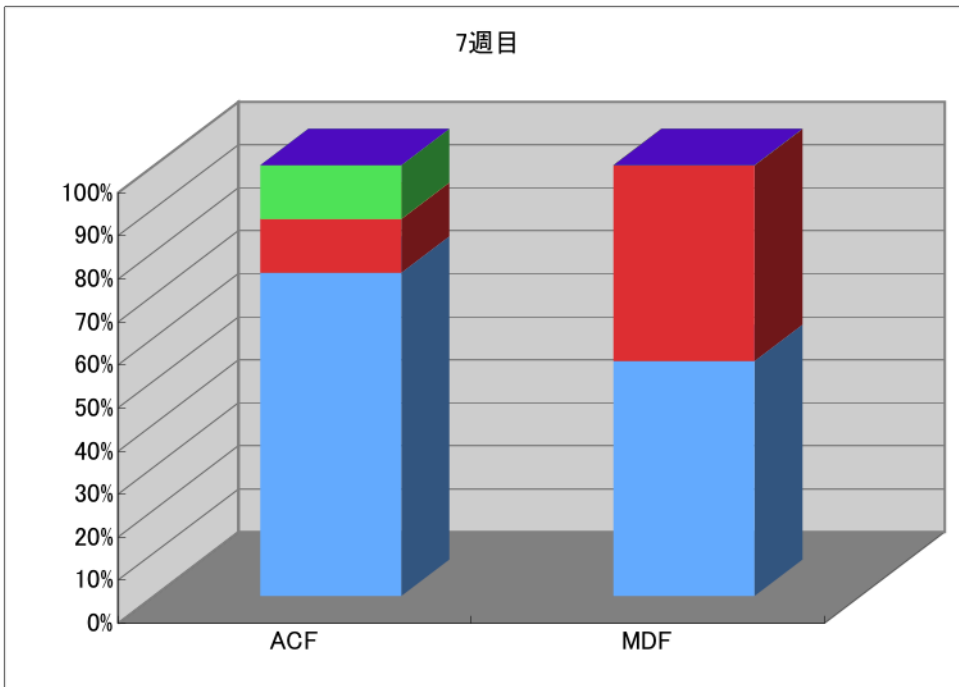


図 3

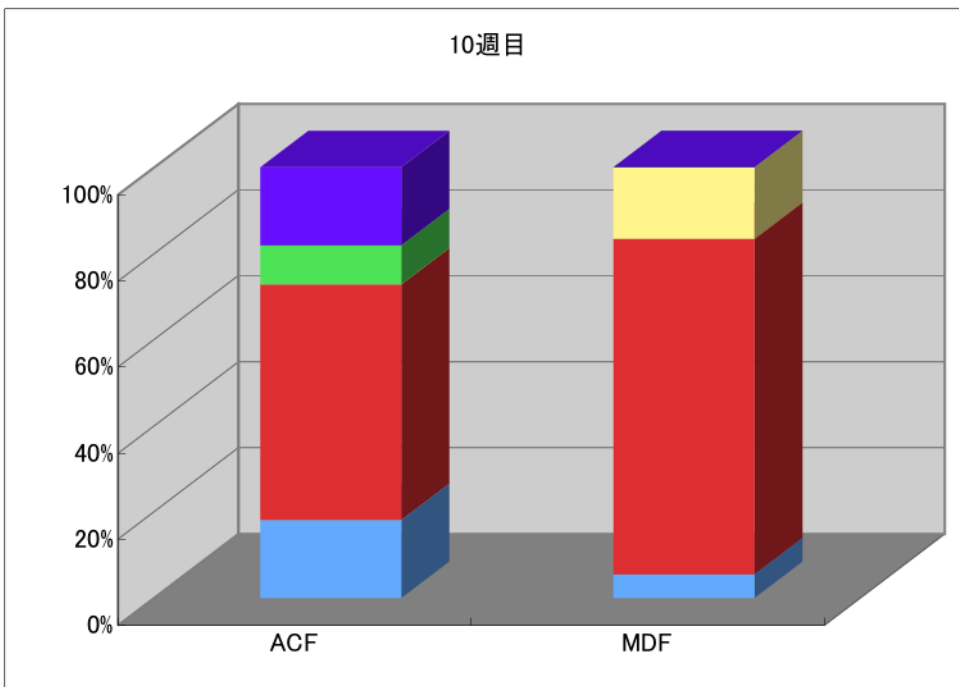


図 4



図 2-4. 前がん病変(ACF と MDF)の組織学的診断の各週でのまとめ

ガラス棒法

ホルマリン充填法

5 ml

15 ml

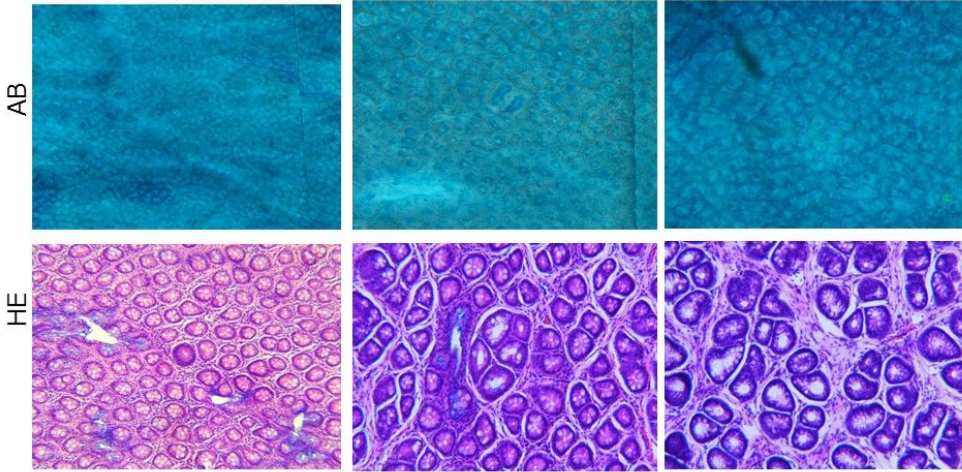


図 5

ガラス棒法

ホルマリン充填法

20 ml

30 ml

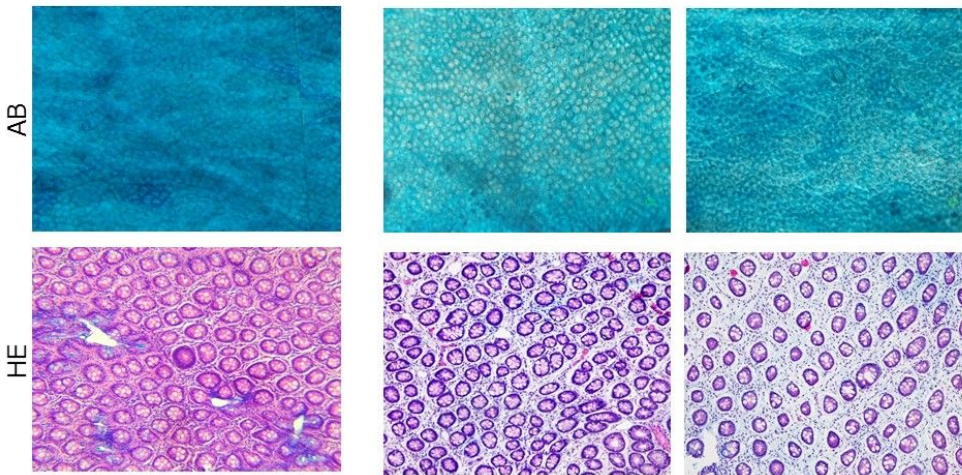


図 6