

DEN によるラット肝化学発癌実験における 前癌病変および肝癌の免疫組織学的検討 ——ヒト早期肝細胞癌との比較——

ま さか あきら
真坂 彰

(受付: 平成 4 年 8 月 20 日)

抄 錄

すでに確立されている化学発癌剤である diethylnitrosamine (DEN) を用いてラット肝発癌実験を行い発癌過程における病理組織学的变化、各種腫瘍マーカーの組織における染色性および血清 α -fetoprotein 値の変動を観察、現在話題となっているヒト早期肝細胞癌のモデルになりうる可能性について検討した。

材料および方法は、Fisher 系、雄性ラットに、発癌剤として DEN 100 ppm 水溶液を 12 週間自由に飲水させ、その後 4 週間水道水で飼育した。経時的变化を観察するため 2 週毎に採血後屠殺、肝臓を摘出しホルマリン固定後パラフィン包埋、肝各葉より連続切片を作成した。HE, periodic-acid-Schiff (PAS), Masson 染色などの一般染色の他、avidin-biotin-peroxidase complex method (ABC 法) を用いた免疫組織化学的染色を α -fetoprotein (AFP), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP), glutathione S-transferase placental form (GST-P), について行った。

これらの切片について病理組織学的变化と各種免疫組織学的染色所見を検討したところ 2 週において酵素変異巣を、6 週において過形成結節を認めた。8 週ではほとんどの肝実質が過形成結節となり、組織学的に 5 種類に分類し得た。また、一部で異型度の高い部分や明らかに高分化型の肝細胞癌の部分も認めた。10~12 週にかけて高~中分化型肝細胞癌は増加した。14 週以降は低分化型の肝細胞癌、および混合型肝癌の出現を認めた。

また、血清 AFP 値の経時的变化では DEN 投与群で組織学的に肝細胞癌を認めない 4 週から上昇し、6 週から急激に増加を認めた。

以上の検討により本実験においてはその 8~10 週においてヒトの早期肝細胞癌に類似した病変を認めた。従来報告してきた化学発癌剤によるラット肝発癌モデルに比べ短期間でヒト早期肝細胞癌に近い組織像が多く認められたことで有用な実験モデルになると考えられた。

索引用語

化学発癌, ラット実験肝癌, ヒト早期肝細胞癌類似病変

緒言

昨今、医療技術の進歩とともにヒトの肝細胞癌についても腫瘍の小さい早期に発見されるようになり、また percutaneous ethanol injection therapy (PEIT) など新しい治療法の普及に伴い予後の向上が期待されている。同時に病理組織学の分野においても、超音波ガイド下肝生検で得られた小さな材料から、きわめて高分化型の癌や境界病変の診断を迫られることが多くなった。このように小さく高分化な初期の肝細胞癌の組織像が問題となっており原発性肝癌取扱規約の新版(第3版)¹⁾においても“初期の高分化型肝細胞癌とその境界病変の診断基準”の項目が新たに付け加えられたが確定的な基準ではない。

一方、肝臓は多くの外来性化学物質の代謝に関わる臓器であるため、多くの癌原性化学物質が証明されている。代表的なものとして、アゾ色素系物質、芳香族アミン類、ニトロソアミン、アフラトキシン、などがある。

これらの中でニトロソ化合物は前駆体が広く環境発癌物質として存在すること(味噌、醤油、肉、ベーコン、ハムなどの食品、ビール、日本酒などのアルコール類)、2級、3級アミンと亜硝酸から胃内の酸性条件下で容易に生合成されること、薬品として多くのアミン系化合物が頻用されること、などからヒトの肝細胞癌の原因として社会的に関心が高い。

ニトロソ化合物のひとつである diethylnitrosamine (以下 DEN) は、経口投与でラットに高率に肝癌を発生させることができ肝発癌実験に広く用いられている^{2~5)}。また、DEN は動物の種や雄雌に関係なく癌原性を有する。

アゾ色素系の癌原性物質では、3'-Me-DAB が最強力であるが oval cell の高度の出現、AFP の primary reaction の出現など種属間の相違によるヒトとは異なった反応を呈する。

肝前癌病変のマーカー酵素として広く使われている glutathione S-transferase 的 placental type (以下 GST-P) は、Sato et al.⁶⁾ が多機能酵素である一群の

glutathione S-transferase (以下 GST) の分子種の中で、肝化学発癌の過程で正常肝に存在せず、前癌病変を含む肝で著明に出現する酵素として発見したもので、現在、前癌病変のマーカー酵素として多く使用されている。また、遺伝子学的にも発癌過程に増加する蛋白から GST-P の遺伝子が確認されている⁷⁾。その出現率は発癌物質の投与に関連して増加し、発癌率とも相関している⁸⁾。

この酵素の各種ラットの肝発癌実験における感受性では Fisher 系が良好との報告がある⁹⁾。Fisher 系のラットは、自然発癌率もきわめて低く¹⁰⁾、大きさなどからも扱いやすい。

γ -glutamyl transpeptidase (以下 γ -GTP) は、ラット正常肝ではその活性は低く、胆管上皮にわずかに存在するのみで¹¹⁾、GST-P が発見される以前から前癌病変のマーカー酵素として使用してきた。

α -fetoprotein (以下 AFP) は 1963 年マウス肝癌で発見され¹²⁾ RIA 法が確立されて以来、臨床において広く腫瘍マーカーとして用いられている。

現在、多くの肝発癌モデルがあるが、その代表的な Solt and Farber のプロトコル¹³⁾、Ito et al.¹⁴⁾ の発癌中期検索法は部分肝切除という操作が加わるため、手技的な問題を伴う。これらのモデルは比較的短期間で発癌剤、および抑制剤の評価を行うのが目的であり、肝細胞癌発生の自然経過の観察を主目的としたものではない。

今回の肝発癌実験の実験系は、各種マーカー酵素の免疫組織化学染色を用いた前癌病変の消長、発癌過程などを観察するために比較的短期間で確実に発癌し、手技的にも実験者の熟練度に左右されないように組み行った。そして、その実験系がヒト早期肝細胞癌類似病変モデルとして有用であるか否かをみるため病理組織学的に検討した。

材料および方法

1. 実験動物

動物は購入時 5 週齢の Fisher 系、雄性ラット(日本チャールズ・リバー社、厚木) 56 匹を用い、1 ゲー

ジに5匹ずつ入れ24°Cの空調動物舎で7日間予備飼育したのち以下の実験に供した。飼料は日本クレア(株)製固体飼料C-2を使用し自由に摂取させた。

2. 実験方法

実験方法はFig. 1に示したごとく、発癌剤としてDEN(東京化成工業株式会社製、東京)を用い、蒸留水に溶解、100 ppm水溶液としたものをラットに12週間自由に飲水させ、その後4週間水道水で飼育する実験群と、水道水を16週投与する対照群を用意した。この経時的变化を観察するため、各実験群5匹、対照群2匹ずつを2週毎にエーテル麻醉下で採血後肝臓を摘出し、10%緩衝ホルマリンで固定後パラフィン包埋、肝各葉より連続切片を作成、HE、periodic-acid-Schiff(以下PAS)、Masson染色などの一般染色、およびavidin-biotin-peroxidase complex method(ABC法)を用いた免疫組織化学的染色を α -fetoprotein(以下AFP)、 γ -glutamyl transpeptidase(以下 γ -GTP)、glutathione S-transferase placental form(以下GST-P)について行った。1次抗体として抗AFP抗体(腫瘍研究所平井秀松博士より供与)、抗 γ -GTP抗体(大阪大学谷口直之教授より供与)、抗GST-P抗体(弘前大学佐藤清美教授より供与)、いずれもポリクロナール抗体を使用した。発色には、DAB溶液(3,3'-diaminobenidine tetrahydrochloride)を用い、核染色はヘマトキシリソで行った。陰性コントロールとして1次抗体の代わりに正常ウサギ血清、正常ヤギ血清を用いて反応させ陰性を確認した。これらの切片についての病理組織学的变化と各種免疫組織化学的所見を検討した。

また、血清AFPを経時的に測定し、組織学的所見との比較検討を行った。

3. 用語および組織像の判定について

ラット肝発癌過程に出現するさまざまな病変についての呼称および判定基準は研究者により一致していないのが現状である。その代表的な分類にNIHの試案¹⁵⁾がある。しかし、この試案ではラット肝の癌腫はすべて肝細胞性であるとし、胆管細胞癌を否定、さらに結節性変化をすべて腫瘍性のものとし、過形成性病変を否定しているため矛盾点が多い。そこで、今回の実験では須永¹⁶⁾と同様にWilliams¹⁷⁾、Pitot and Sirica¹⁸⁾に準じてひとつの肝小葉以上の大きさを持つ増殖性病変か、周囲への圧排発育像が明らかである病

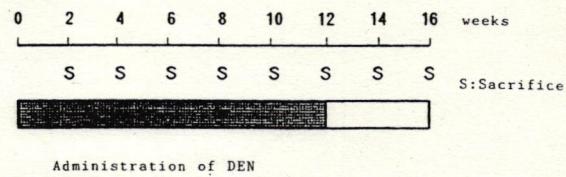


Fig. 1 Experimental protocol.

変をhyperplastic nodule(過形成結節)とし、これ以下の大きさでGST-P、 γ -GTPなど、酵素の偏倚を伴うものをenzyme-altered foci(酵素変異巣)とした。さらに、ヒト類似の早期肝細胞癌の診断基準は以下のごとくヒトの肝癌取扱い規約(第三版)¹¹⁾に準じて、1. 細胞密度の増加、2. 不規則な細索状構造、3. 細胞質の好酸性および好塩基性の増加、4. 腺房様、偽腺管構造の出現、5. 脂肪化、透明細胞化、6. 胞体内凝集、7. 間質浸潤などの所見の有無を検討した。

発生した肝癌は、その組織型、分化度などヒトの肝癌取扱い規約¹¹⁾に準じて判定した。

また、組織変化の判定については経時的变化をとらえやすくするため、認められないものを-、認められるものを+とし、さらに、占拠率により3段階に分けた(Table 1)。

免疫組織化学染色の結果は、陰性を-、陽性を+とし、さらに陽性の中で淡陽性を±、強陽性を++とした(Table 2)。

結 果

1. 肝肉眼所見

1) 対照群

全経過において肝表面は平滑で腫瘍を認めなかった(Fig. 2a)。

2) DEN投与群

すべてのラットで週数とともに肝表面が不整となり、6週で結節性病変が明らかとなり、一部に白色の充実性結節を認めた(Fig. 2b)。8週では、白色の結節が増加し、12週になると肝被膜下に出血を伴う腫瘍も認められた(Fig. 2c)。

2. 病理組織学および免疫組織学的所見 (Table 1, Table 2)

1) 対照群

対照群では、全経過において肝細胞の胞体内の凝集

Table 1 Histopathological findings during DEN carcinogenesis

week (S)	rat No.	degenerated hepatocyte	oval cell and/or renewed hepatocyte	enzyme- altered foci	hyperplastic nodule	small hepatocyte proliferation	HCC
2	1	+	-	+	-	-	-
	2	+	-	+	-	-	-
	3	+	-	+	-	-	-
	4	+	-	+	-	-	-
	5	+	-	+	-	-	-
4	1	++	+	+	-	-	-
	2	++	+	+	-	-	-
	3	++	+	+	-	-	-
	4	++	+	+	-	-	-
	5	++	+	+	-	-	-
6	1	++	+	++	+	-	-
	2	++	+	++	+	-	-
	3	++	±	++	+	-	-
	4	++	+	++	+	-	-
	5	++	+	++	+	-	-
8	1	++	+	++	++	+	-
	2	++	+	++	++	+	-
	3	++	+	++	++	+	-
	4	++	+	++	++	+	-
	5	++	+	++	++	+	-
10	1	++	+	+	++	+	+
	2	++	+	+	++	+	+
	3	++	+	+	++	+	+
	4	++	+	+	++	+	+
	5	++	+	+	++	+	+
12	1	++	+	+	++	+	+
	2	++	+	+	++	+	+
	3	++	+	+	++	+	+
	4	++	+	+	++	+	+
	5	++	+	+	++	+	+
14	1	+	±	+	+	+	++
	2	+	±	+	+	+	++
	3	+	±	+	+	+	++
	4	+	±	+	+	+	++
	5	+	±	+	+	+	++
16	1	±	±	+	+	+	++
	2	±	±	+	+	+	++
	3	±	±	+	+	+	++
	4	±	±	+	+	+	++
	5	±	±	+	+	+	++

Table 2 Results of immunohistochemical staining

	AFP	γ -GTP	GST-P
Oval cell or Renewed hepatocyte	+~±	+~±	-
Enzyme-altered foci	-	+~-	++~+
Hyperplastic nodule	-	+~-	++~+
HCC well diff.	+~-	+~-	+~-
moderately diff.	-	+~-	+~-
poorly diff.	++	+~-	-

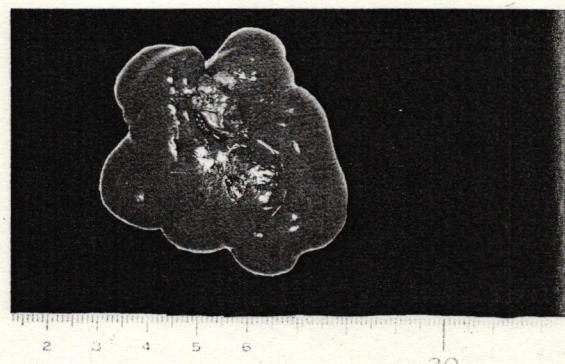


Fig. 2a Macroscopic view of control rat liver.
Liver surface is smooth.



Fig. 2b Macroscopic view of rat liver after 6 weeks administration of DEN.

Whitish nodules are noted.

物がヒトの肝細胞に比べ目立ち、核の分裂像も散見された。実質では、小葉構造は保たれ過形成性変化および腫瘍性病変を認めなかった。間質への炎症性細胞の浸潤は認められなかった。

GST-P 染色では、陽性巣を認めず、 γ -GTP 染色では、細胆管上皮に陽性となった。AFP 染色でも、細胆管上皮の一部に陽性像を認めた。

2) DEN 投与群

a) 2週目

HE による光顕像では、散在性に肝細胞の変性、壊死の所見、とくに好酸体が中間帯優位に認められた。巣状壊死は少數で、グリソン鞘の炎症は目立たなかつた。

GST-P 染色では、HE 染色では判定困難な 1, 2 個からの酵素変異細胞の出現を同定できた (Fig. 3)。

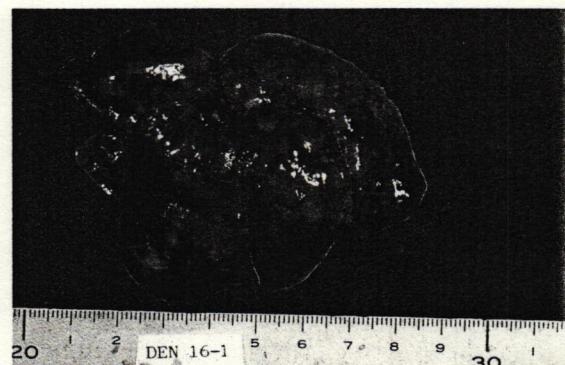


Fig. 2c Macroscopic view of rat liver after 12 weeks administration of DEN.

Nodules and subcapsular hematomas are noted.

γ -GTP 染色では、ごくわずかに淡染性を示す部分があつたが、GST-P 染色ほどはっきりとした陽性像は認めなかつた。

b) 4週目

変性像が中心で、好酸体を中間帯に認め、巣状壊死がやや目立ち、細胞質の凝集傾向、脂肪変性が目立つようになった。また、oval cell を疑わせる小型の細胞群を少数散在性にみるも典型像は認めなかつた。

GST-P 染色では、陽性巣（酵素変異巣）は数、面積ともに増し、一小葉を超える大きさの陽性巣も出現したが、周囲への圧排傾向は認めなかつた。

c) 6週目

各葉により差はあるが、Masson 染色で門脈域と中央静脈、門脈域と門脈域の間に細繊維の伸長を認め、一部では結節様になつてゐた (Fig. 4)。HE 像では、

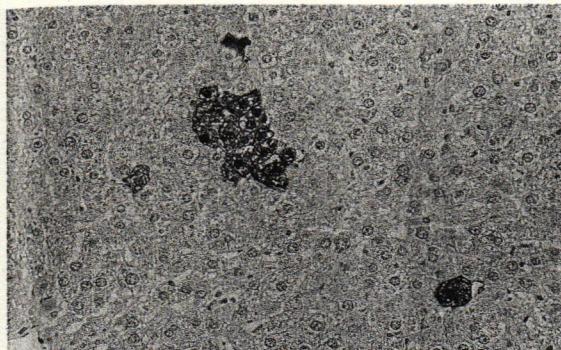


Fig. 3 Liver from a rat administered DEN for 2 weeks.

Immunoperoxidase staining for GST-P (ABC method, $\times 200$).
Strong reaction of GST-P in enzyme-altered focus.

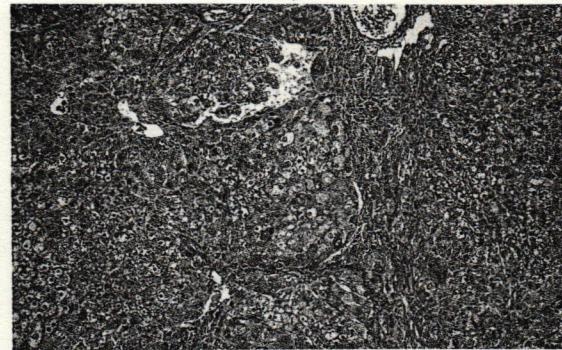


Fig. 4 Liver from a rat administered DEN for 6 weeks.

Moderate fibrosis is seen. (Masson stain section, $\times 200$)



Fig. 5 Liver from a rat administered DEN for 8 weeks.

Moderately differentiated HCC (trabecular type).
(H. E. stain section, $\times 200$)

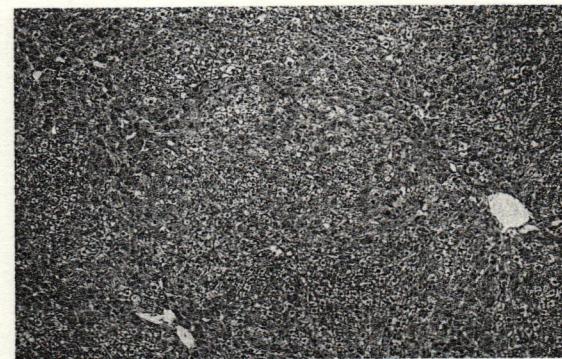


Fig. 6 Liver from a rat administered DEN for 8 weeks.

Hyperplastic nodules, composed of various cells.
(H. E. stain section, $\times 200$)

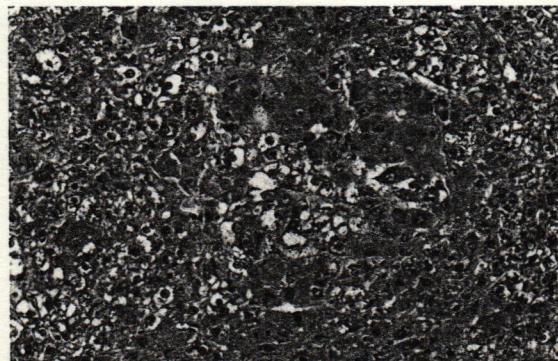


Fig. 7 Liver from a rat administered DEN for 8 weeks.

Proliferation of small hepatocyte foci.
(H. E. stain section, $\times 200$)

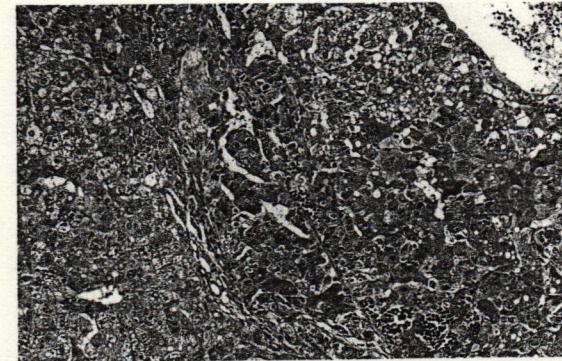


Fig. 8 Liver from a rat administered DEN for 8 weeks.

Disappearance of interstitial component.
(H. E. stain section, $\times 200$)



Fig. 9 Liver from a rat administered DEN for 10 weeks.

Well differentiated HCC. (H. E. stain section, $\times 200$)

索状構造の乱れ、胞体のすりガラス状変化、核の小型化、濃染像、核の大小不同を認めた。全体としては、肝細胞の変性と再生が混在した組織像を呈していた。また、oval cell は、はっきりしなかった。

GST-P 染色では、酵素変異巣が融合し、一小葉をはるかに超えるようになるが、輪状化は不完全で、周囲への圧排も部分的であった。AFP 染色では、細胆管に濃染、小型再生細胞に陽性となり、広範に不規則な分布で淡染性を示した。

d) 8週目

5 匹全部で 6 週同様線維化を認め、過形成結節も認められた。ただしこの変化は、その占める面積が 30~90% 程度と各葉により差が認められた。1 匹では過形成結節の中に、胞体内の硝子化、vascular lake、髄外造血巣を認め、周辺に高分化な部分を伴う中分化型肝細胞癌を認めた (Fig. 5)。過形成結節を構成する細胞は細胞質がやや大きく核は比較的小型のものが主体を占めるが、単一の細胞で構成されているものは少なく、周辺にシート状に配列する小型再生細胞を伴うものや、変性と思われる脂肪化、細胞質の凝集傾向を認める細胞集団を含むものなど多彩であった (Fig. 6)。また、細胞密度がやや増し、核胞体比の増大、軽度の核および構造の異型を伴う小型の好塩基性の強い細胞集団の出現を認めた (Fig. 7、後述する小型肝細胞増殖巣)。また、間質浸潤あるいは圧排による間質成分の部分的な消失を認める異型細胞巣を 2 カ所認めた (Fig. 8)。GST-P 染色は、ほぼ全体が過形成結節となっている葉では、実質域にび漫性に淡染性



Fig. 10 Liver from a rat administered DEN for 10 weeks.

Clear cell foci. (H. E. stain section, $\times 200$)

を示し、過形成結節の少ない葉では酵素変異巣、過形成結節の一部の核および胞体に濃染を認めた。AFP 染色では、中分化型肝細胞癌の細胞の類洞側に強陽性となり、過形成結節においても部分的に胞体に淡陽性を示した。

間質においてはグリソシン鞘への中等度の単核球の浸潤と胆管の増生が多く認められた。

e) 10 週目

各葉により病変に差が認められるが、過形成結節の面積の増加が目立った。過形成結節は、1. 大きな好酸性の胞体からなり、核および細胞の異型に乏しいおとなしい細胞群、2. 変性と再生が混在し大小の細胞からなり各々の境界がはっきりしないもの、3. 小型の好塩基性細胞で構成されるもの、4. 結節内に好塩基性の小型肝細胞増殖巣を含むもの、5. 比較的大きな好酸性の細胞からなり、核分裂像、偽腺管構造など構造異型が少し強いもの、と大きく 5 種類を区別できた。また、高分化型～中分化型肝細胞癌も 5 匹全部に認めた (Fig. 9)。間質浸潤あるいは間質の部分的消失は、明らかな癌部をはじめ過形成結節と思われる部分においても数カ所認められ、淡明細胞巣も認めた (Fig. 10)。

GST-P 染色では、非癌部で間質を除き広範に (大半は過形成結節) 淡染性を示し、癌部では陰性から淡染性を示した。 γ -GTP 染色では、類洞周囲に細胞単位で陽性となる部分が多く、癌部でも不規則な分布で淡染性を示した。AFP 染色では、 γ -GTP 染色と似た局在と染色性を示した。

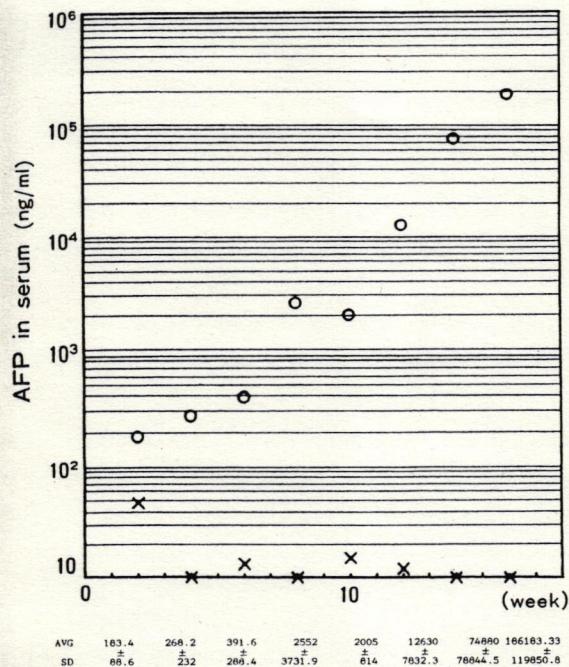


Fig. 11 Variability of serum AFP level.

f) 12週目

各葉により差はあるが、肝細胞の変性と脱落像を引き続き認め、10週で認められた種々の結節が入り混じり、中分化度の肝細胞癌の数と面積は増加、偽腺管型や混合型のやや低分化な肝癌も認められるようになり、脈管への浸潤も多く認めた。Masson染色では、門脈域一門脈域、門脈域一中心静脈域を結ぶ線維化が進んだ。

GST-P染色では、間質を除くほとんどの部分で核および胞体に淡染～濃染性を示し、AFP染色と γ -GTP染色では、細胆管、門脈および中心静脈周辺の肝細胞に局在を示した。AFP染色ではおもに細胞膜に、 γ -GTP染色では、胞体に陽性像が認められた。

g) 14週目

各葉による差が目立たなくなり、全体としては変性像が減少し、小型肝細胞増殖巣、高分化および中分化型の肝細胞癌の数が増した。肝細胞癌は索状型が多く、一部に偽腺管型を認めた。非癌部は、ほとんどが過形成結節となり、8週からみられた5種類の結節を認めたが、変性による脂肪化を伴う結節は減少傾向にあった。

GST-P染色では、酵素変異巣が濃染性を示したの

に比べ、過形成結節では、全体として淡染傾向を示し、癌部では一部で濃染する多くは淡染性を示していた。 γ -GTP染色およびAFP染色では、12週と同様の染色性を示した。

h) 16週目

ほぼ14週と同様の組織像で、肝細胞癌の数と面積が増加し、低分化型のものが増えた。癌部は AFP染色で陽性となり、GST-P染色で陰性を示した。 γ -GTP染色では、淡陽性を示した。

全経過中発生した肝癌に被膜の形成はみられなかつた。

PAS染色では、対照群に比べると癌部の淡明細胞化した部分などに局在を示した。

3. 血清 AFP (Fig. 11)

DEN投与群における血清 AFP 値は 6 週で平均 391.6 ng/ml と対照群の約 30 倍の値を示した。その後、急激に上昇し 10 週では平均 2,005 ng/ml を示し、16 週では 186,183.3 ng/ml と著高を呈した。

対照群の血清 AFP 値はいずれも 15 ng/ml 以下で正常範囲内であった。

考 察

これまでの結果をもとに DEN ラット肝発癌過程の経時的組織変化、免疫組織化学的染色性および血清 AFP の変動についてヒト肝細胞癌との比較を交えて考察を行った。

1. 経時的变化について

1) 酵素変異巣および過形成結節について

2週がら出現した酵素変異巣は、局在は不規則で、4週、6週とその面積を増した。6週になり出現した過形成結節は大きく5種類に分けることができた。過形成結節は広義の前癌病巣と考えられているが、現在では肝癌へ直接進展していくものと、やがて消失していくものがあると考えられており¹⁹⁾、肝癌へ移行は、約1～2%との実験報告もある²⁰⁾。出口²¹⁾は肝化学発癌過程における過形成結節をモルフォメトリーにより大型肝細胞結節と小型肝細胞結節に分け、前者は発癌との関連は低く、後者は癌に進展していく可能性が強いと報告している。今回の実験では、後述する好塩基性の小型肝細胞増殖巣や好塩基性細胞より成る過形成結節が狭義の前癌病変と考えられた。今回は、過形成

結節の消長を確認するには至らなかったが、胞体が大きく異型性の少ない、いわゆるおとなしい型の過形成結節の何割かが消失していくのではないかと推察される。

2) Oval cell と小型肝細胞増殖巣について

今回の実験では、典型的な oval cell は認められなかつたが、4週以降、シート状配列は示さないものの、oval cell 様の細胞と小型の肝再生細胞が門脈域およびその周囲に認められた。これらの細胞は週数とともに増加傾向を示し、8週では好塩基性の増殖を伴った細胞の集簇を認め、小型肝細胞増殖巣と名付けた。この病変はヒトの腺腫様過形成に相当する病変と思われたが、一部に異型を伴う部分も認めたため、癌との境界病変と考えられた。

3) 癌について

ヒトの肝細胞癌についても近年、過形成結節の中の異型性の強い部分を前癌病変として捉え、発生早期の癌という意味から早期あるいは初期の肝細胞癌と呼ぶよう提唱された²²⁾。ヒトにおける初期肝細胞癌の発育に関しては、“高分化型の癌細胞結節内に低分化型の肝細胞癌の結節が生じ增大、高分化型を圧迫し発育する”という手術、剖検材料からの研究報告がある²³⁾。今回の実験でも、背景に肝硬変がみられない点においては多くのヒト肝細胞癌とは異なるが、大半は肝硬変の偽小葉に類似の過形成結節によって占められていた。その結節の中からヒトの腺腫様過形成に相当すると思われる小型肝細胞増殖巣 (Fig. 7) が認められた。この所見はヒトの前癌病変に良く似ているとともに過形成結節から肝細胞癌に進展する発癌ルートが存在すると考えられた。

過形成結節の中でも、好酸性で大きな胞体からなり異型性のある結節は、その組織像 (Fig. 12) および8週でいきなり中分化型肝細胞癌 (Fig. 5) が出現した事実から、直接、中分化型の肝細胞癌に移行する可能性も推察された。

10週にみられたような高分化型の肝細胞癌については、おそらく従来から存在していたものの、ヒトの肝細胞癌の組織とを比較していなかった点および発癌してからかなり時間が経過した時点での観察が多かつたため報告が少ないものと思われた。事実、本実験でも12週以降、低分化型および混合型の肝癌が出現、増加してきている。

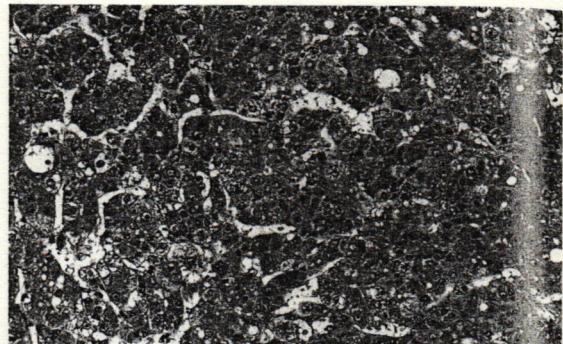


Fig. 12 Liver from a rat administered DEN for 8 weeks.

Basophilic hyperplastic nodule with atypism.
(H. E. stain section, $\times 200$)

また、ヒト早期肝細胞癌における他の病理組織所見として脂肪化および淡明細胞化が報告されている²⁴⁾。本実験でも、脂肪化および淡明細胞化は12週から一部の癌で認められた。また、16週では一部の癌結節でび慢性に脂肪化を認めた。さらに、間質浸潤を伴う病変あるいは間質浸潤様にみえる病変が認められたが、最近ヒトの肝細胞癌では、“間質浸潤を伴う境界病変は、悪性と判断する²⁵⁾”との考え方もあり悪性を判定する重要な因子と考えられている。しかし、一口に間質浸潤といっても、浸潤細胞にはおとなしいものから異型を伴うものまであり、また周囲肝組織による圧迫や循環障害による間質成分の消失も考慮にいれる必要があると考える。すなわち、前述のような狭義の前癌病変の部分における間質浸潤は悪性を強く支持する所見になると考えられたが、それ以外の部分では悪性でない間質浸潤様にみえる門脈域の消失もありうると考えられた。

このように本実験で得られたラット肝癌の病理組織所見は、ヒトの早期肝細胞癌との類似点が多く興味深い。

2. 免疫組織化学的染色について

GST-P は、クロフィブレートなどの遺伝子非傷害性の発癌剤による前癌病変を除いて²⁶⁾ 優れた前癌病変としてのマーカー酵素であることが知られている。本実験においても γ -GTP に比べより早期から陽性と

なり、発現性も安定しており再度そのマーカー酵素としての有用性が確認できた。しかし、高分化型～中分化型肝細胞癌では、淡染性から陰性を示し、低分化型では陰性であった。 γ -GTP および AFP 染色は、4 週以降、門脈域周囲の oval cell 様細胞および小型の肝再生細胞に陽性となり、癌部では 8 週の高分化型～中分化型肝細胞癌の癌結節周囲の小型異型細胞からなるきわめて高分化な部分に一部陽性となり、14 週以降のやや低分化な肝細胞癌で明らかに陽性となった。その他の中分化型の肝細胞癌では一部で陽性となるが一定の傾向はみられなかった。一般的には、分化度が低いほど AFP は陽性を示すとされているが、肝細胞癌のきわめて高分化な部分に陽性となり、小型再生細胞が同様の形質を示したことは興味深い。

また、GST-P 陽性酵素変異巣は局在が明らかでなく、門脈域周囲の AFP 陽性の再生細胞集団とは異なるものと考えられた。

今回、DEN による主要肝病変は、肝細胞の変性壞死、再生、脂肪変性、胆管の増殖、線維化、過形成結節、および肝細胞癌などであった。肝細胞の変性、壞死像は、非癌部における肝細胞の変性、壞死像が 12 週以降減少したことから、DEN による初期の肝細胞障害と考えられた。また、oval cell の典型的なものは認めなかつた。これは発癌剤と実験動物の組み合わせによるものと思われ、oval cell がヒトで出現しないため、ヒト類似の病理組織所見が得られるという点から、この組み合わせは有用であると考えられた。

3. 血清 AFP について

AFP は、1963 年、Abelev et al.¹²⁾ のマウス肝癌での発見以来、日常臨床においても広く利用されている。また、多くのラット肝化学発癌実験においては、今回の実験と同様に明らかな肝腫瘍を認めない時期に血清 AFP の増加が観察されており²⁷⁾²⁸⁾、肝癌発生過程における AFP 産生の場についても議論されてきた。Okita et al.²⁹⁾ はその産生の場を Farber³⁰⁾³¹⁾ により前癌性病変として強調された肝過形成結節を構成する細胞群であるとした。しかし、Sell³²⁾、Onoe et al.³³⁾ はその主たる産生の場を卵円形細胞 (oval cell) とし、前癌性病変としての意義を強調してきた。現在、oval cell は一種の再生細胞あるいは細胆管上皮細胞であり真の前癌性病変ではないと考えられている³⁴⁾。今回の短期実験においても組織学的に oval cell は非

定型的ではあるが認められた。 AFP 染色では、前述の通り、この oval cell と小型再生細胞およびその他過形成結節内に散在性、不規則に広範に染まり、2 週以降の軽度～中等度の AFP の上昇に一致した。癌が認められた 8 週以降は血清 AFP 値もさらに高値を示し、全経過において組織像との一致を認めた。癌を認める以前での AFP の軽度上昇はヒトにおける肝癌以外の肝疾患における再生性変化に伴う上昇に相当するものと思われる。今回の実験では、3'-Me-DAB、AAF を用いた発癌実験で認められる primary reaction がみられず、腫瘍の急速な発育に比例した血清 AFP 値の上昇などは、再生と壊死を繰り返す過程で発癌を認めるヒトに近い反応と思われた。この反応は前述の一連の報告をうらづけるとともに、本実験モデルがヒト類似早期肝細胞癌を観察するために適している 1 つの理由と考えられた。

4. モデルとしての有用性と今後の実験系の改良について

現在ラット肝発癌実験に用いられている主な癌原性物質には、DEN のほかにアゾ色素系では 3'-Me-DAB、芳香族アミン系では、2-AAF、などがあり、当教室においても須永¹⁶⁾、相田ら³⁵⁾、がそれぞれ報告を行っている。しかし、発癌までの期間はそれぞれ 18 週、30 週と遅く、また、発生した癌の組織型は腺癌が主で、ヒトの肝細胞癌の組織像とは明らかに異なる。

ただし、発癌モデルは発癌剤の種類、量、投与方法、投与期間、実験動物の組み合わせにより発癌までの期間、組織型などが異なってくる。一般に、発癌までの期間は、発癌剤の総投与量に反比例することが知られており（加算説³⁶⁾）、DEN 50 ppm 自由飲水では発癌まで約 17 週かかったという報告がある²¹⁾。本実験モデルでは、8 週前後というきわめて短期間にヒト早期肝細胞癌類似ラット肝癌を作製、現在ヒトの肝病理組織でいちばん混乱している部分を観察できるといいう点に有用性がある。また、部分肝切除などが多く手技が簡便で人工的な外科的侵襲もないため死亡率も低い。

DEN の投与濃度および投与期間に関してはさらに検討が必要と思われ、100 ppm、12 週投与では、やや変性像が強いようにも思われた。ヒト類似早期肝細胞癌をみるためになら 8 週投与で充分と思われ、また、よ

り簡便な実験となろう。さらに、酵素偏異巣および過形成結節の消長をみるために観察期間を長くする必要があると思われた。

結語

ラット肝癌の発生過程における前癌病変として重要な過形成結節の消長を観察する目的で実験系を組んで行ったところヒトにおける早期高分化型肝細胞癌類似病変を8週前後という短期に確実に作成することができた。ヒト肝細胞癌を解明するうえで有用な実験モデルであると考えられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、ご校閲ならびに直接ご指導を賜りました聖マリアンナ医科大学第2病理学 打越敏之教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究に際し多大なご協力をいただきました腫瘍研究所 故平井秀松博士、多賀弘子博士に深く感謝するとともに抗体の供与をいただいた大阪大学生化学 谷口直之教授、弘前大学生化学 佐藤清美教授に厚く御礼申し上げます。また、標本作製にご協力いただいた本病理学教室 大沼繁子女史、林湯都子女史に感謝いたします。

本論文の要旨の一部は、第78回日本消化器病学会総会、第81回日本病理学会総会において発表した。

文献

- 1) 日本肝癌研究会編：原発性肝癌取扱い規約。第3版, p. 38, 1991, 金原出版, 東京。
- 2) 北川和行：ヒトの癌と動物モデル。太田邦夫, 山本 正, 杉村 隆, 菅野晴夫編集, 癌の化学 第4巻, pp. 204-223, 1979, 南江堂, 東京。
- 3) Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., and Schmähl, D.: Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. *Z. Krebsforsch.*, **69**: 103-201, 1967.
- 4) Schmähl, D., Preussman, R., and Hampeal, H.: Leberkrebs-erzeugende Wirkung von Diethyl-nitrosamine nach oraler Gabe bei Ratten. *Naturwissenschaften*, **47**: 89, 1960.
- 5) Takayama, S., Hitachi, M., and Yamada, K.: Histological and cytological studies on hepatocarcinogenesis in rats by administration of diethylnitrosamine. *Gann Monogr.*, **17**: 343-354, 1975.
- 6) Sato, K., Kitahara, A., Satoh, K., Ishikawa, T., Tatematsu, M., and Ito, N.: The placental form of glutathione S-transferase as new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gann*, **75**: 199-202, 1984.
- 7) 酒井正春, 村松正実：肝化学発癌における遺伝子発現。実験医学, **5**: 52-58, 1987.
- 8) 伊東信行：第86回日本医学会シンポジウム記録集・前癌病変, pp. 6-10, 1990, 日本医学会。
- 9) 朝元誠人：各系ラットにおける肝発癌過程でのチトクローム P-450 およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼの誘導に関する病理組織学的解析。名古屋医大誌, **39**: 729-750, 1988.
- 10) Jacobs, B. B. and Huseby, R. A.: Neoplasms occurring in aged fisher rats with special reference to testicular, uterine, and thyroid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, **39**: 303-309, 1967.
- 11) Suzuki, Y., Ishizuka, H., Kaneda, H., and Taniguchi, N.: γ -glutamyl transpeptidase in rat liver during 3'-Me-DAB hepatocarcinogenesis: immunohistochemical and enzyme histochemical study. *J. Histochem. Cytochem.*, **1**: 3-7, 1987.
- 12) Abelev, G. I., Perova, S. D., Khramkova, N. I., Postnikova, Z. A., and Irlin, I. S.: Production of embrional α -globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation*, **1**: 174-180, 1963.
- 13) Solt, D. and Farber, E.: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, **263**: 701-703, 1976.
- 14) Ito, N., Tuda, H., Tatematsu, M., Inoue, T., Tagawa, Y., Imaida, K., Fukushima, S., and Asamoto, M.: Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathion S-transferase placental form positive foci in rat—an approach for a new medium term bioassay system. *Carcinogenesis*, **9**: 387-394, 1988.
- 15) Saquer, R. A. and Lenill, M. H.: Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. *Cancer Res.*, **35**: 3214-3223, 1975.
- 16) 須永達哉：3'-Me-DABによるラット肝発癌過

- 程における前癌病変の免疫組織学的検討. 聖マリアンナ医大誌, 17: 627-643, 1990.
- 17) Williams, G. M.: The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. Biochim. Biophys. Acta, 605: 167-189, 1980.
- 18) Pitot, H. C. and Sirica, A. E.: The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. Biochim. Biophys. Acta, 605: 191-215, 1980.
- 19) Teebor, G. W. and Becker, F. F.: Regression and persistence of hyperplastic hepatic nodules induced by N-2-fluorenylacetamide and their relationship to hepatocarcinogenesis. Cancer Res., 31: 1-3, 1971.
- 20) 伊東信行: ラット肝癌の発生と前癌病変. 癌と化学療法, 7: 55-63, 1980.
- 21) 出口武司: 実験的肝癌発生過程における過形成結節の細胞病理学的診断. 京都府立医大誌, 98: 869-880, 1989.
- 22) Kanai, T., Hirohashi, S., Upton, M. P., Noguchi, M., Kishi, K., Makuuchi, M., Yamasaki, S., Hasegawa, H., Takayasu, K., Moriyama, N., and Shimosato, Y.: Pathology of small hepatocellular carcinoma—A proposal for a new gross classification. Cancer, 60: 810-819, 1987.
- 23) 中野雅行, 斎藤明子, 高橋 健, 小幡 裕, 小林誠一郎: 初期肝細胞癌の発育・進展の病理. 肝臓, 30: 754-760, 1990.
- 24) Gibson, J. B. and Sabin, L. H.: Histological typing of tumors of the liver, biliary tract and pancreas. Geneva: WHO, 1978.
- 25) 太田五六, 寺田忠夫: 肝硬変から肝細胞癌へ, その形態学的研究. 肝細胞癌, pp. 128-131, 1989, 富士書院, 札幌.
- 26) 佐藤清美: 化学発癌過程のマーカー酵素. 蛋白質核酸酵素, 31: 921-926, 1986.
- 27) Watabe, H.: Early appearance of embryonic α -globulin in rat serum during carcinogenesis with 4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res., 31: 1192-1194, 1971.
- 28) Kroes, R., Williams, G. M., and Weisburger, J. H.: Early appearance of serum alpha-fetoprotein during hepatocarcinogenesis as a function of age of rat and extent of treatment with 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res., 32: 1526-1532, 1972.
- 29) Okita, K., Gruestein, M., Klaiber, M., and Farber, E.: Localization of alpha-fetoprotein by immunofluorescence in hyperplastic nodules during hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene. Cancer Res., 34: 2758-2763, 1974.
- 30) Farber, E.: Carcinogenesis-cellular evolution as a unifying thread: Presidential address. Cancer Res., 33: 2537-2550, 1973.
- 31) Farber, E.: Hyperplastic liver nodules. Methods Cancer Res., 7: 345, 1973.
- 32) Sell, E.: Distribution of alpha-fetoprotein and albumin-containing cells in the livers of Fisher rats fed four cycles of n-2-fluorenylacetamide. Cancer Res., 38: 3107, 1978.
- 33) Onoe, T., Kaneko, A., Dempo, K., Ogawa, K., and Minase, T.: alpha-Fetoprotein and early histological changes of hepatic tissue in DAB-hepatocarcinogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 259: 168-180, 1975.
- 34) Dempo, K., Chisaka, N., Yoshida, Y., Kaneko, A., and Onoe, T.: Immunofluorescent study on alpha-fetoprotein-producing cells in the early stage of 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene carcinogenesis. Cancer Res., 35: 1282-1287, 1975.
- 35) 相田芳夫, 須永達哉, 前山史朗, 高桑俊文, 打越敏之, 多賀弘子, 遠藤康夫: 2-acetyl-amino-fluorene誘発ラット肝癌の発癌過程における AFP, γ -GTP および GST-P の免疫組織化学的検討. 聖マリアンナ医大誌, 18: 51-56, 1990.
- 36) Druckrey, H.: Quantitative aspects in chemical carcinogenesis. UICC Monograph Series, 7: 60-78, 1967.

Abstract**Sequential Immunohistochemical Study of Early Hepatocellular Carcinoma in Rat Liver During Carcinogenesis Induced by Diethylnitrosamine****Akira Masaka**

This study was designed to observe the histopathology of the early hepatocellular carcinoma in rat liver during carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. Sequential immunohistochemical stainings against α -fetoprotein (AFP), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP), and placental form of glutathione S-transferase (GST-P) were performed.

During the experiment, cell injuries appeared at 2 weeks, enzyme-altered foci at 2 weeks, hyperplastic nodules at 6 weeks, and early hepatocellular carcinoma at 8 weeks after DEN feeding. The appearance of cancer in a nodule, fatty changes, pseudogland formation, and microinvasion of atypical liver cell to portal area were also noted.

These results suggest that this experimental protocol may be useful in studying early hepatocellular carcinoma. (St. Marianna Med. J., 20 : 472-484, 1992.)

The Second Department of Pathology (Director : Prof. Toshiyuki Uchikoshi).
St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 216, Japan.