

---

# 肝臓外科における硬変肝構成細胞の 特性に関する基礎的および臨床的研究

---

(60480296)

昭和62年度科学研究費補助金〔一般研究(B)〕研究成果報告書

昭和63年3月

研究代表者 水 戸 迪 郎

(旭川医科大学医学部)

## は し が き

昭和60年度から文部省科学研究費補助金（一般研究B）の助成のもとに行なわれた「肝臓外科における硬変肝構成細胞の特性に関する基礎的および臨床的研究」は、3年間の研究期間を終了し、ここに報告書をまとめることになった。研究計画の全てが達成されたわけではないが、細胞レベルでの解析によりいくつかの新しい知見が得られ、肝臓外科の基礎的・臨床的研究が着実に前進したものと考えられる。報告書をまとめるにあたって、各分野の専門家の方々の率直なご批判を願うものである。

## 研 究 組 織

研究代表者：水戸 迪郎（旭川医科大学医学部・教授）  
研究分担者：草野 満夫（旭川医科大学医学部・講師）  
：近藤 啓史（旭川医科大学医学部・助手）  
研究協力者：山口 秀則（旭川医科大学医学部・研究生）  
：木下 透（旭川医科大学医学部・医員）  
：榎部 朗（旭川医科大学医学部・医員）  
：河野 透（旭川医科大学医学部・大学院）  
：紀野 修一（旭川医科大学医学部・大学院）

## 研 究 経 費

昭和60年度	2000千円
昭和61年度	1800千円
昭和62年度	1400千円
計	5200千円

## 研究発表

### 1. 学会誌等

- 1) 草野満夫、水戸迪郎  
肝細胞移植による脾臓内再構築肝組織の形態と機能  
Medical Way 2: 81-85、1985
- 2) 水戸迪郎  
肝細胞移植が提起する諸問題  
日本外科学会誌 86: 993-996、1985
- 3) 林宏一、葛西眞一、矢吹英彦、小原充裕、澤雅之、水戸迪郎  
ヒト肝細胞分離法の開発  
医学のあゆみ 134: 367-368、1985
- 4) 水戸迪郎、葛西眞一、近藤啓史、  
術後肝障害  
外科治療 52: 670-672、1985
- 5) 水戸迪郎、江端英隆、近藤啓史  
肝膿瘍  
外科 47: 1272-1278、1985
- 6) 水戸迪郎  
遊離肝細胞を用いた肝不全への新たな対応  
日本消化器外科学会誌 19: 1087、1986
- 7) 水戸迪郎  
脾内肝細胞移植の臨床への道程  
肝臓病学の進歩 12: 12-23、1986
- 8) 水戸迪郎、草野満夫、棟方隆  
原発性肝癌治療の現況と問題点  
外科治療 55: 75-84、1986
- 9) 草野満夫  
肝臓の解剖・組織・生理  
日本医学放射線学会誌 24 (suppl.) : 1-29、1986

- 10)山口秀則、草野満夫、河野透、紀野修一、水戸迪郎  
肝再生時における肝細胞およびKupffer細胞の細胞回転について  
日本消化器病学会誌 83 (suppl.) : 1846、1986
- 11)水戸迪郎、河野透、森茂美  
肝再生時における中枢神経系の役割  
医学のあゆみ 137 : 861-866、1987
- 12)近藤啓史、永瀬厚、葛西眞一、水戸迪郎  
閉塞性黄疸時における交感神経系の反応特性に関する薬理学的研究  
血管 10 : 15、1987
- 13)紀野修一、草野満夫、河野透、木下透、榎部朗、水戸迪郎  
フローサイトメトリーによる硬変合併肝癌の細胞動態解析。  
北海道外科学会誌 32 : 186、1987
- 14)Kino S, Kusano M, Kinoshita T, Kohno T and Mito M  
Flow cytometric assessment of DNA synthesis during liver  
regeneration, comparison with immunohistochemical assay.  
European Surgical Research 19(suppl.): 32-33, 1987
- 15)木下透、草野満夫、紀野修一、河野透、榎部朗、水戸迪郎  
フローサイトメトリーによるヒト肝硬変、肝癌細胞の cell kinetics  
肝臓 28 (suppl.) : 97、1987
- 16)草野満夫、紀野修一、河野透、木下透、榎部朗、水戸迪郎  
生体内培養肝細胞の増殖及び肝再生因子の影響について  
-BrdU標識S期細胞を指標として-  
肝臓 28 (suppl.) : 163、1987
- 17)紀野修一、草野満夫、木下透、河野透、水戸迪郎、阿久津弘明  
フローサイトメトリーを用いた肝再生の新しい指標 - BrdU-抗BrdU抗体を  
用いた免疫組織化学的方法との比較 -  
肝臓 28 (suppl.) : 163、1987
- 18)水戸迪郎、草野満夫  
脾臓への肝細胞の移植  
サイエンス 17 (6) : 72-81、1987

19)草野満夫、近藤啓史、水戸迪郎

転移性肝腫瘍の治療

外科治療 57:595-602、1987

20)草野満夫

フローサイトメトリーによるヒト肝硬変・肝癌細胞の Cell kinetics 解析

—その有用性と測定上の問題点について—

日本消化器病学会誌 84 (suppl.) : 2065、1987

21)紀野修一、草野満夫、水戸迪郎

フローサイトメトリーによるパラフィン包埋肝組織を用いた肝細胞核DNA量の測定法。

肝臓 29 (5) : 1988、in press

22)木下透、草野満夫、紀野修一、柳部朗、水戸迪郎

AAF短期投与におけるrat肝細胞動態について

フローサイトメトリー 7 : 1988、in press

## 2. 口 頭 発 表

1) 水戸迪郎

肝細胞移植が提起する諸問題 (特別講演)

第85回日本外科学会総会 (仙台) 昭和60年4月3~5日

2) 近藤啓史、矢吹英彦、林宏一、葛西眞一、江端英隆、水戸迪郎

開腹術における肝機能障害の病態と成因に関する臨床的検討

第26回日本消化器外科学会総会 (札幌) 昭和60年7月18日

3) 草野満夫、河野透、紀野修一、山口秀則、水戸迪郎

再灌流式チャンバーによる臨床材料の細胞分散法 —ヒト肝組織—

第4回FCM・Cell Biology研究会 (東京)

昭和61年6月29日

4) 山口秀則、草野満夫、加藤一哉、河野透、紀野修一、水戸迪郎

肝再生時における肝細胞およびKupffer細胞の細胞回転について

第4回FCM・Cell Biology研究会 (東京)

昭和61年6月29日

- 5) 河野透、紀野修一、山口秀則、草野満夫、水戸迪郎  
 Flow cytometry による肝再生時における肝臓支配迷走神経遮断の影響について -A0染色による-  
 第4回FCM・Cell Biology研究会(東京)  
 昭和61年6月29日
- 6) 水戸迪郎  
 遊離肝細胞を用いた肝不全への新たな対応(宿題報告)  
 第28回日本消化器外科学会総会(青森)昭和61年7月15~16日
- 7) 紀野修一、草野満夫、河野透、木下透、榎部朗、水戸迪郎  
 フローサイトメトリーによる硬変合併肝癌の細胞動態解析。  
 第46回北海道外科学会(札幌)昭和62年2月21日
- 8) 近藤啓史、草野満夫、神谷和則、大江成博、小野寺一彦、棟方隆、松田英郎、江端英隆、水戸迪郎  
 進行肝癌に対するリザーバーによる動注療法の検討 -長期管理上の問題点とその対策について-  
 第87回日本外科学会総会(東京)昭和62年4月1~3日
- 9) Kino S, Kusano M, Kinoshita T, Kohno T and Mito M  
 Flow cytometric assessment of DNA synthesis during liver regeneration, comparison with immunohistochemical assay.  
 The 22nd Congress of European Society for Surgical Research  
 (Aarhus,Denmark) 1987, May 11-13
- 10) 木下透、草野満夫、紀野修一、河野透、榎部朗、水戸迪郎  
 フローサイトメトリーによるヒト肝硬変、肝癌細胞の cell kinetics解析  
 第5回FCM・Cell Biology研究会(大阪)  
 昭和62年6月7日
- 11) 紀野修一、草野満夫、木下透、河野透、水戸迪郎、阿久津弘明  
 フローサイトメトリーを用いた肝再生の評価 - BrdU-抗BrdU抗体を用いた免疫組織化学的方法との比較 -  
 第5回FCM・Cell Biology研究会(大阪)  
 昭和62年6月7日

- 12)木下透、草野満夫、紀野修一、河野透、櫛部朗、水戸迪郎  
フローサイトメトリーによるヒト肝硬変、肝癌細胞の cell kinetics  
第23回日本肝臓学会総会（岡山）昭和62年6月11～12日
- 13)草野満夫、紀野修一、河野透、木下透、櫛部朗、水戸迪郎  
生体内培養肝細胞の増殖及び肝再生因子の影響について  
－BrdU標識S期細胞を指標として－  
第23回日本肝臓学会総会（岡山）昭和62年6月11～12日
- 14)紀野修一、草野満夫、木下透、河野透、水戸迪郎、阿久津弘明  
フローサイトメトリーを用いた肝再生の新しい指標－ BrdU-抗BrdU  
抗体を用いた免疫組織化学的方法との比較－  
第23回日本肝臓学会総会（岡山）昭和62年6月11～12日
- 15)草野満夫、紀野修一、木下透、櫛部朗、河野透、松田英郎、水戸迪郎、  
藤田昌宏  
核DNA量からみた胃・大腸腫瘍の Heterogeneity について  
第5回消化器癌DNA研究会（仙台）昭和62年8月28日
- 16)紀野修一、草野満夫、木下透、櫛部朗、水戸迪郎  
パラフィン包埋組織と凍結組織を用いたDNA flow cytometryの方法の比較  
検討  
第5回消化器癌DNA研究会（仙台）昭和62年8月28日
- 17)紀野修一、草野満夫、葛西眞一、水戸迪郎、阿久津弘明  
フローサイトメトリーにおけるCV値に影響を及ぼす因子の検討  
第6回日本レーザー医学会北海道地方会（旭川）昭和62年9月26日
- 18)草野満夫  
フローサイトメトリーによるヒト肝硬変・肝癌細胞の Cell kinetics 解析  
－その有用性と測定上の問題点について－（シンポジウム）  
第29回日本消化器病学会大会（甲府）昭和62年11月5～7日
- 19)木下透  
AAF短期投与におけるrat肝細胞動態について  
第7回関西フローサイトメトリー研究会（大阪）昭和62年12月5日

### 3. 出版物

- 1) Kusano M, Ebata H, Yamaguchi H, Khono T and Mito M  
Interaction between splenic endothelial cells and hepatocytes  
inoculated into rat spleen.  
In; Cells of the Hepatic Sinusoid, Ed. by Kirn, et al. pp505-507  
1985
- 2) 水戸迪郎、草野満夫  
脾臓内肝細胞移植 - 肝細胞の分裂増殖と門脈血 -。  
「肝臓の研究」織田敏次編、同文書院、pp 227-237, 1987
- 3) Mito M, Khono T, Kusano M and Mori S  
Role of the parasympathetic nervous system during liver  
regeneration in rats.  
In; New Trends in Hepatology, Ed. by T.Oda and K.Okuda, pp195-201,  
1987
- 4) 水戸迪郎  
生体内培養モデルでみた肝細胞の分化。  
「消化器の発生と分化」藤田哲也、川井啓市編、大阪書籍、pp 111 -  
129, 1988
- 5) 草野満夫、紀野修一、水戸迪郎  
核DNA量の解析 - 肝硬変、肝臓癌 -。  
「フローサイトメトリー、手技と実際 第2版」太田和雄、野村和弘、高  
本滋編、蟹書房、東京、1988、in press

# 研究成果

## 1. はじめに

肝硬変は肝の線維化を主体とする慢性進行性の肝疾患であるが、現在その進行を阻止するいかなる治療法もなく、肝不全、肝癌、食道静脈瘤などを併発し、死の転帰をとる。また肝癌の多くは肝硬変を合併しており、肝癌の切除を含めた外科的治療法も著しく制限されている。この肝の線維化と並んで、もう一つの肝硬変の病態の特徴は、肝硬変が前癌病変としてとらえられていることである。特にB型肝炎を契機として発生する肝硬変の半数は発癌するといわれており、肝硬変からの発癌の可能性とその予知は内科的領域においては肝癌発症ハイリスクグループのより正確な設定、さらに外科領域においては肝切除後の再発形式、特に多中心性の発癌を予測するうえで、きわめて重要な課題となっている。本研究は、肝硬変細胞が肝硬変に特徴づけられている2つの主たる特性、すなわち肝線維化に果たす肝硬変細胞の関与、および前癌病変としての肝硬変細胞の発癌ポテンシャルを解析することを目的とした。前者についてはわれわれが独自に開発した肝細胞の生体内培養モデルである肝細胞脾内移植実験系で検討し、後者についてはフローサイトメトリー法を用い、実験肝硬変細胞、ヒト肝硬変細胞の核DNA量、そのヒストグラムパターン解析による細胞生物学的なアプローチを試みた。

そして、これらの肝硬変細胞の細胞レベルでの特性と臓器全体、すなわち臨床例における肝硬変症の病態を対比検討することによって、肝硬変症に対する理論的かつ合目的な診断・治療法の開発を意図したものである。

## 2. 脾臓内移植硬変肝細胞の形態と線維産生について

四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 投与により作成したラット肝硬変より硬変肝細胞を分離し、同系ラット脾臓内に移植し、その生着、分裂、増殖過程が正常肝細胞移植といかなる相違がみられるかを検討した。この研究はすでに報告しているが、ここではその概要について述べる。

肝細胞浮遊液 0.2 ml を脾臓内に注入移植するが、浮遊液中の硬変肝細胞はその収率、viability から換算すると、正常肝細胞移植時の 300~400 分の 1 ときわめて少ない硬変肝細胞が移植されたことになる。しかしながら、脾臓内での生着状態は正常肝細胞の場合と同様の生着状態を示す(図1)。4から5ヶ月目より分裂増殖を開始するが、この分裂増殖は正常肝細胞より旺盛で移植一年後の肝組織も正常肝細胞移植時より脾臓内占拠率も大きいものが多い。このように硬変肝細胞も脾臓内にて生着、1年後には正常肝細胞移植と同様の肝組織を形成するが、その索構造は不整であり、また一部には腺腫様構造を示す部分もみられる。また類洞構造の構築も正常肝細胞移植の場合、移植6ヶ月目から形成されるが、硬変肝細胞移植の場合、それより2~3ヶ月遅れて形成され、その形態も不完全なものが多い。硬変肝細胞移植によって構築された肝組織を鍍銀などの染色、アザン染色にて観察しても特に線維成分の増加を認める所見は得られない。しかしながら電顕にて観察すると、移植4~5ヶ月目には細胞間隙に膠原線維の増生を認め、さらに移植9ヶ月目の硬変肝細胞移植肝組

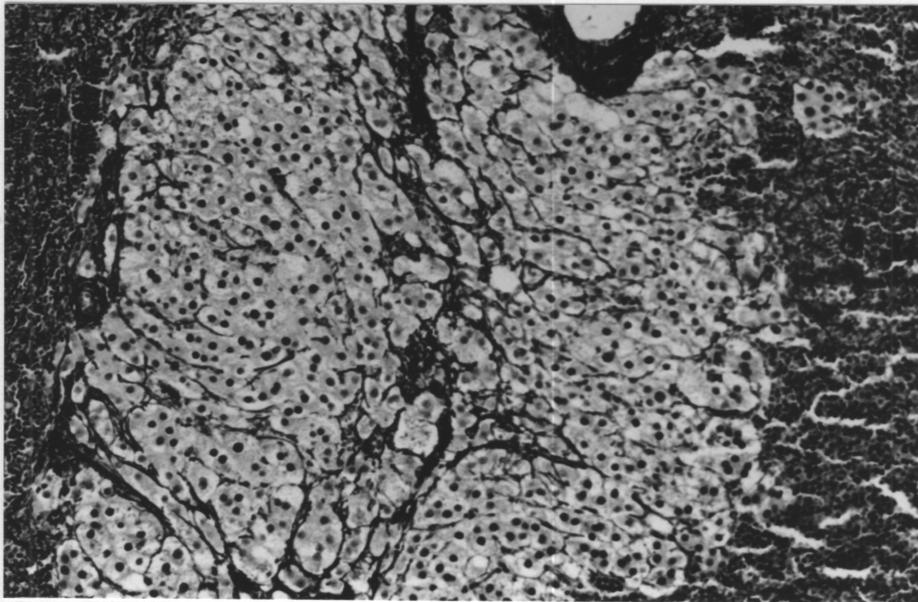
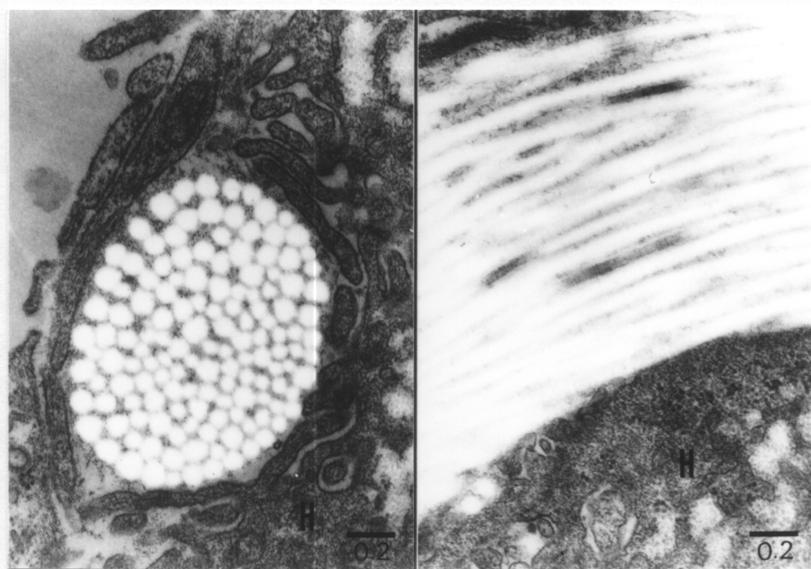


図1：硬変肝細胞移植21ヶ月目

硬変肝細胞も正常肝細胞と同様に脾臓内で増殖し、肝組織を再構築する。

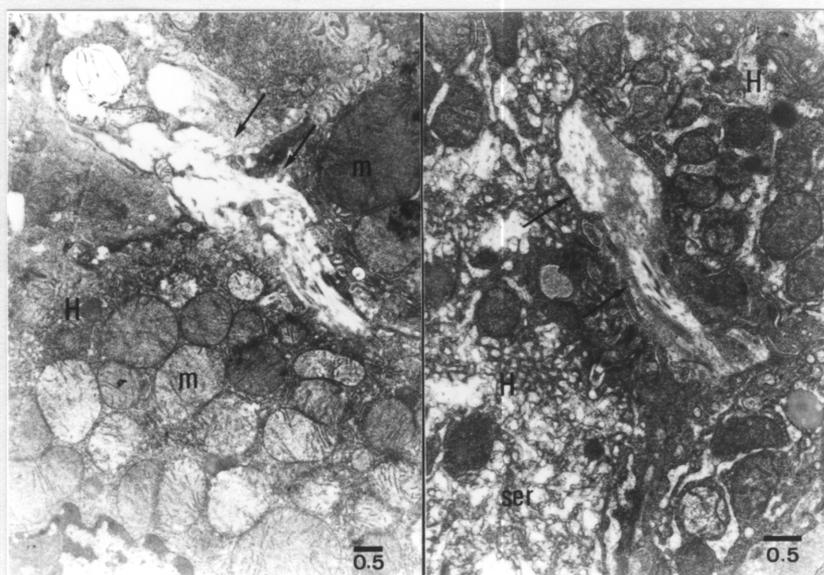
織内、特に Disse 腔内に膠原線維をしばしば検出し、その増生部位、微細構造は宿主肝硬変と変わるところがない(図2)。Disse 腔内の微絨毛はこの増生した膠原線維により、変形または消失するものもみられた。さらに灌流固定を行なった移植9カ月目の硬変肝細胞について詳細に観察すると、その出現部位は Disse腔内が最も多く、ついで肝細胞間隙、さらに毛細胆管内にも認められた(図3-a, b)。この膠原線維は数十本の同一方向にほぼ平行に走る線維束として認められ、一本の太さは  $580\sim 600\text{ \AA}$  で膠原線維特有の約  $600\text{ \AA}$  の横紋構造を有し、さらにその間に10本前後の subband を確認し得た。また興味ある所見として、幅約  $0.1\mu$  の無定形構造を示す基底膜様構造も、部分的ではあるが比較的細胞障害の強い肝細胞類洞面にみられた。



(a)

(b)

図2：  $\text{CCl}_4$  投与後の宿主肝 Disse 腔に産生した膠原線維  
H；肝細胞



(a)

(b)

図3-a : 移植硬変肝細胞の間に認められた膠原線維 (↓)  
 (移植12ヶ月目、浸漬固定)

b : 毛細胆管内にみられた未熟な膠原線維様構造 (↓)  
 (移植9ヶ月目)

m ; ミトコンドリア、ser ; 滑面小胞体

### 3. フローサイトメトリーによる硬変肝細胞の核DNA量の解析

#### ① 検索法…新鮮、凍結、パラフィン包埋試料について

硬変肝細胞の核DNA量の測定にあたっては、硬変肝の組織構築上の特徴を考慮した細胞分散法、裸核精製法を確立する必要がある。また、多くの試料の核DNA量を測定した成績を解析するためには、再現性があり、かつ簡単な手順で測定用検体を作成する方法を確立する必要がある。そこで、まずヒト肝組織、ラット肝組織を用いて検体作成法を検討した。試料には、新鮮組織、凍結組織、パラフィン包埋組織を用いた。これら検討の詳細については、参考論文-1を参照されたい。

#### 1) 新鮮組織からの検体作成法

##### A. 肝細胞分散法

ラットでは、門脈内カニューレション・コラゲナーゼ酵素灌流法を用いて肝細胞を分散する。ヒト肝組織から肝実質細胞を分散するために、独自に顕微鏡のレンズ入れを加工して再灌流式チャンバーを作成した(図4)。すなわち、レンズ入れの中に隔壁をもうけ、そこに数個の側孔をあけた注射針を5~6本組み込んだもので、チャンバーの両側にチューブを接続し、酵素液(コラゲナーゼ)が灌流するようになっている。針の部分に肝組織を刺入装填し、ミニポンプを用いて酵素液を閉鎖灌流する。この方法を用いると、0.5gの肝組織から測定に必要な細胞を分散できる。図5にヒト肝硬変組織から分散した硬変肝細胞の塗末標本を示す。

##### B. 裸核精製法

###### a) 分散した肝細胞からの裸核化

分散した肝細胞に0.5% NP-40を加え、シリンジングにより裸核化した。そして、蔗糖密度勾配遠心法を用いて核を精製した。

###### b) 組織からの裸核化

約2mm角の肝組織に0.5% NP-40を加え、ホモジナイズした。そして、核を上述の方法で精製した。

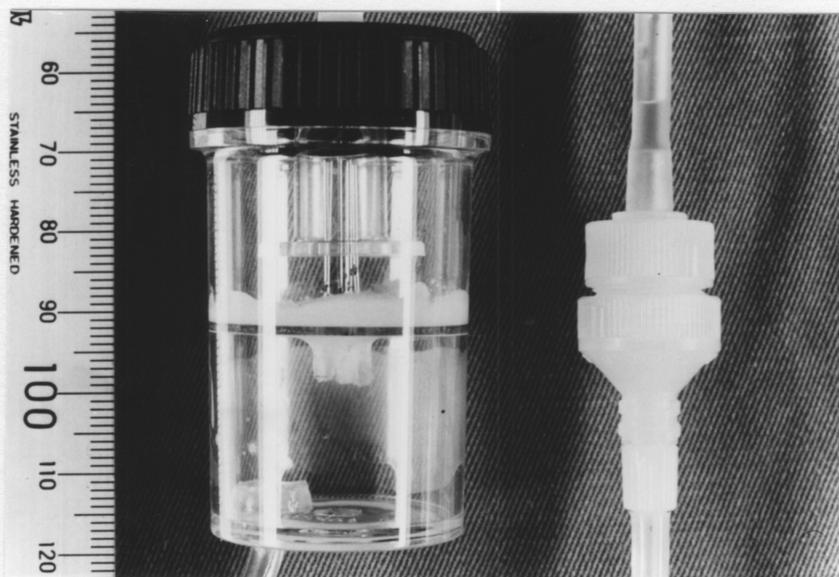


図4：再灌流式チャンバー

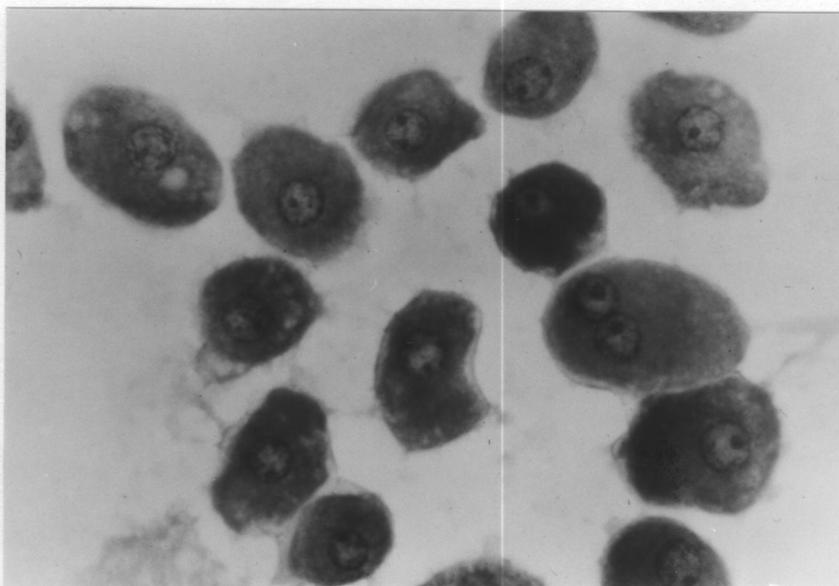


図5：再灌流式チャンバーを用いて分散したヒト硬変肝細胞

## 2) 凍結組織からの検体作成法

凍結組織、または新鮮組織から分散し凍結保存した肝細胞からの検体作成は Vindelovらの detergent-trypsin 法を用いた。

## 3) パラフィン包埋組織からの検体作成法

パラフィン包埋組織からの検体作成法をラット肝組織を用いて、基礎的に検討した。その詳細については、参考論文-2を参照されたい。

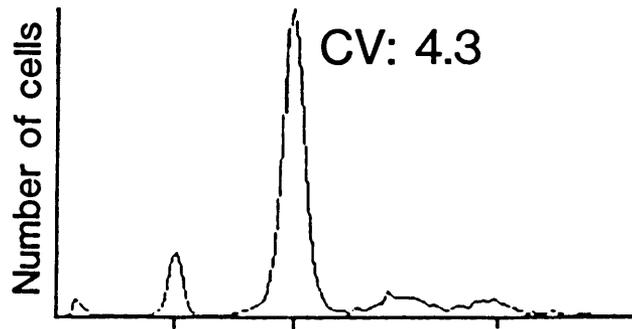
## 4) DNAの染色とフローサイトメトリーによる測定

検体は、RNaseで処理したのち、プロビジウムヨードを用いて染色した。測定にはCS-20セルソーターを用い、3万個の細胞または核を測定した。

## 5) 各検体作成法の特徴と選択

ヒトを含む哺乳類の肝細胞には、細胞学的に2核細胞の存在と多倍数体核の存在という、他の臓器を構成する細胞にはみられないふたつの特徴をもつ。そのため、フローサイトメトリーでDNA量を測定した場合、同一の検体を細胞レベルで測定した結果と核レベルで測定した結果を比較すると、DNAヒストグラム上、明らかに差が認められる(図6)。また、その差異を表1にまとめた。すなわち、DNA aneuploidyやDNA合成期の割合など細胞周期の各分画の割合を解析するためには、CV値の良好な核レベルでの測定が適しており、ソーティング法を用いて2核細胞の割合を解析するような場合には細胞レベルでの測定が適している。表2に、各検体作成法の長所・短所と解析可能な項目などをまとめた。この表より明らかのように、肝細胞の細胞学的特徴を考慮し、解析したい項目をあらかじめ設定して、細胞分散法、裸核精製法を選択する必要がある。すなわち、2核細胞の割合や細胞内蛋白量とDNA量を同時に測定する場合には、新鮮組織から細胞分散する方法が適しており、DNA aneuploidyを解析するためには、再現性があり、かつ簡単な手順で測定用検体を作成できる凍結組織からの検体作成法が適している。また、retrospective に検討する場合にはパラフィン包埋組織からの検体作成法が選択される。

## Cellular level



## Nuclear level

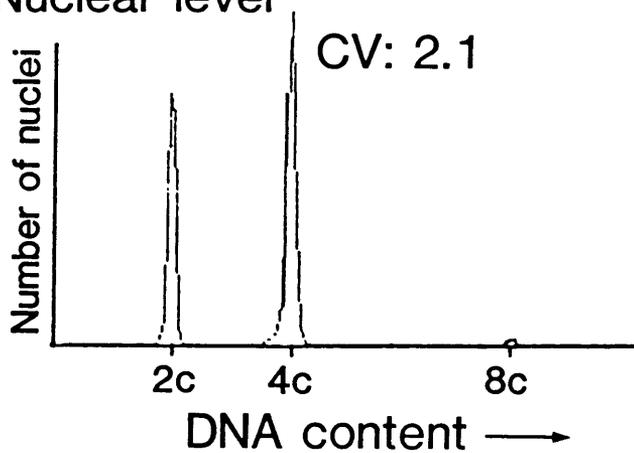


図6：細胞レベルで測定したDNAヒストグラムと核レベルで測定したDNAヒストグラム  
(2c；二倍体のDNA量、4c；四倍体のDNA量、8c；八倍体のDNA量、CV；Coefficient of Variation)

評価項目	測定レベル	
	細胞レベル	核レベル
二核細胞	保存される	保存されない
多倍数体	細胞レベル	核レベル
CV値(%)	4~8	2~3
DNA aneuploidy	検出しにくい	検出しやすい
細胞周期解析	検体によって 解析困難	ほとんど全ての 検体で解析可能

表-1：測定レベルでの差異

組織	測定レベル	長所	短所	解析項目
新鮮組織	細胞	<ul style="list-style-type: none"> <li>肝細胞のみを測定できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>組織量が最低0.5g必要</li> <li>抽出後直ちに細胞分散する必要がある</li> <li>手技に慣れるまで時間を要する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>二核細胞の割合</li> <li>細胞周期解析</li> <li>多倍数体</li> </ul>
	核			<ul style="list-style-type: none"> <li>DNA aneuploidy</li> <li>多倍数体</li> </ul>
凍結組織	核	<ul style="list-style-type: none"> <li>手技が簡単</li> <li>組織の保存ができる</li> <li>針生検組織でも可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>非実質細胞の混入</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>DNA aneuploidy</li> <li>細胞周期解析</li> <li>多倍数体</li> </ul>
パラフィン包埋組織	核	<ul style="list-style-type: none"> <li>retrospectiveな検討が可能</li> <li>保存が可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>デブリスの割合が高い</li> <li>非実質細胞の混入</li> <li>手技を確立するために基礎的な検討が必要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>DNA aneuploidy</li> <li>多倍数体</li> <li>細胞周期解析には工夫が必要</li> </ul>

表-2：検体作成法の長所・短所と解析項目

## ②実験肝硬変

現在実験的肝硬変モデル作成には、thioacetamide (TCA) を飲料水に溶解して自由に摂取させる方法と、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) を皮下、腹腔内または吸入によって投与する方法がある。われわれは、Edward and Proctor らの方法に準じ、初回 0.04 ml の CCl<sub>4</sub> を基本単位として胃ゾンデから経口投与し、体重の増減にともなって投与量を変化させながら、週1回、合計10週間投与することによって、実験肝硬変を作成した(加えて、肝細胞の cytochrome P<sub>450</sub> を活性化させ、CCl<sub>4</sub> に対する感受性を高めるために、初回投与後10日目より飲料水に 35 mg/dl に調整したフェノバルビタールナトリウムを混じて使用した。)

10週間投与後、1週間経過したラット肝は、肉眼的に硬く腫大し、組織学的にはグリソン鞘および中心静脈領域を中心として線維化および細胞浸潤が認められ、小葉構造改築が必ずしも肝全体に及ばないものの、偽小葉形成の像が支配的な軽度肝硬変の所見を呈した。

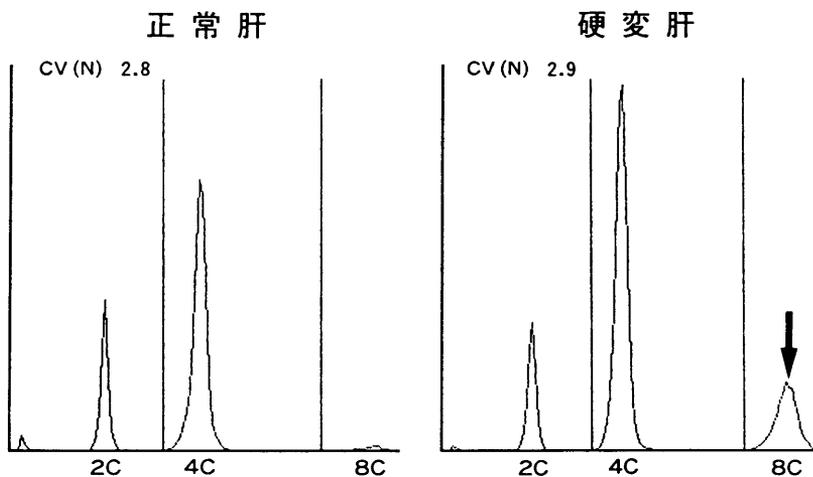


図7：ラット正常肝・硬変肝細胞核のDNAヒストグラム

フローサイトメトリー測定検体としての硬変肝細胞はコラゲナーゼ灌流法によって分離した(0.1% collagenase, 20分間)。得られた硬変肝細胞のviabilityは70~80%であった。検体処理方法は、detergent-trypsin法を用い、3万個の核DNA量を測定した。

図7右は、9週齢(体重200~250g)よりCCl<sub>4</sub>投与を開始して実験肝硬変を作成した21週齢のラットの肝細胞核DNA量のヒストグラムパターンである。図7左は、同週齢の未処置コントロールラットのものである。これらふたつのDNAヒストグラムパターンを比べると、肝硬変ラットの8Cに相当する多倍数体核の増加が特徴的である。各多倍数体の割合は、肝硬変ラットでは、2C; 16.4%、4C; 61.4%、8C; 20.3%で、未処置コントロールラットでは、2C; 23.3%、4C; 72.0%、8C; 2.3%であった。表3には、21週

		2C	4C	8C
正常肝 (n=4)	1	36.0	55.8	2.74
	2	23.3	72.0	2.33
	3	32.5	64.5	1.24
	4	26.7	69.6	1.88
	平均	29.6%	65.5%	2.05%
硬変肝 (n=10)	1	32.2	52.9	13.8
	2	35.7	48.2	14.7
	3	24.4	54.2	19.3
	4	26.7	57.2	14.3
	5	12.4	65.7	20.4
	6	15.6	63.5	19.7
	7	16.4	61.4	20.3
	8	17.8	56.1	23.7
	9	25.3	56.6	15.7
	10	16.7	68.6	14.4
平均	22.3%	58.4%	17.6%	

表3：正常肝・硬変肝の各倍数体の割合

齢のラットの正常肝DNAヒストグラム (n=4) と 硬変肝モデル (n=10) の解析結果を示した。正常肝では平均で、2C ; 29.6%、4C ; 65.5%、8C ; 2.1%であった。一方、硬変肝では、2C ; 22.3%、4C ; 58.4%、8C ; 17.6%と2C、4Cの割合の軽度の減少と8Cの割合の著明な増加を認めた。

以上のような肝細胞核レベルでのDNA量の測定に加え、肝細胞レベルで核DNAをプロビジウムヨードで、細胞内蛋白をFITCで染色し、すなわち二重染色を施し、two parameter 解析を行なった。図8右は、硬変肝細胞の2次元 dot plot 表示である。横軸は核DNA量、縦軸は細胞内蛋白量を表わす。図8左の同週齢ラットの正常肝細胞のものと比較すると、8C細胞の増加が明らかであるとともに、各倍数体構成細胞の全体的な蛋白量の低下が認められた。

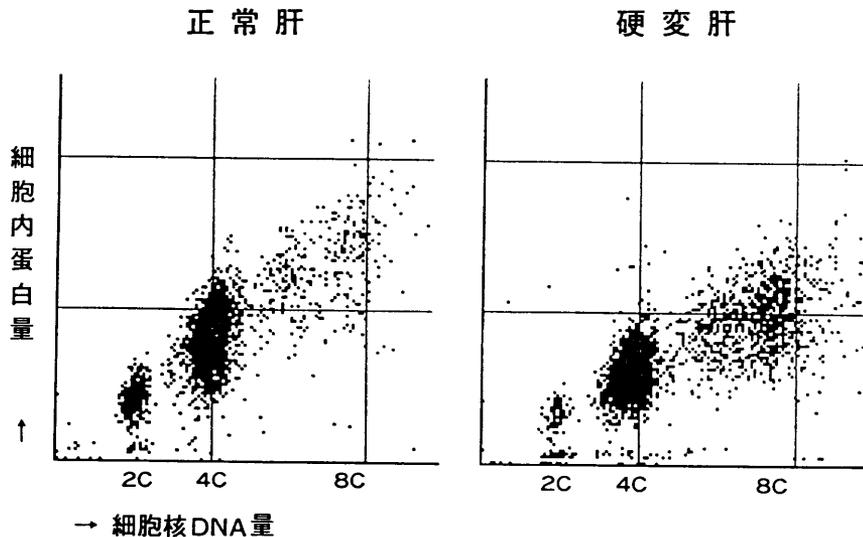


図8

次に肝硬変を作成したラットに、70%肝切除を加えた場合の変化を検討した。肝切除後24時間、27時間、48時間、72時間、7日目に再生肝硬変細胞を分離し、その細胞核のDNAヒストグラムを正常ラットのそれと比較した。図9は正常ラット肝の70%肝切除24、48時間後、7日後のDNAヒストグラムである。肝切除後24時間目に2C-4C間に3.45%、4C-8C間に7.37%のS期に相当する細胞が認められた。一方、図10は硬変肝70%肝切除後のDNAヒストグラムである。肝切除24時間目では、2C-4C間に1.1%、4C-8C間に5.0%のS期細胞が認められるのみであった。さらに、2C-4C間、4C-8C間に、肝切除27時間後ではそれぞれ0.92%、3.48%、48時間後では0.95%、2.41%、72時間後では0.73%、0.44%のS期細胞が認められた。硬変肝70%肝切除後のDNA合成のピークは、正常肝70%肝切除と同様に肝切除24時間後にあるようだが、細胞増殖相にはいる細胞の絶対数は減少していることが明らかになった。一方、硬変肝肝切除72時間後においても、緩徐にDNA合成が続いていることが示され、硬変肝肝切除後の肝再生の遅延を解明する手がかりになるものと推定された。

以上、フローサイトメトリーを用いた実験肝硬変の細胞動態的变化をまとめると、①CCl<sub>4</sub>投与により作成された肝硬変構成細胞は、多倍数体化(polypliodization)が進行すること、②硬変肝細胞内の蛋白量が減少していること、③硬変肝70%肝切除後のDNA合成のピークは、正常肝70%肝切除後と同様に肝切除24時間後に認められるが、増殖相にはいる細胞数は少なく、緩徐なDNA合成が長時間継続することが明らかとなった。

# 肝切除後の肝細胞動態

Control (未処置) 群

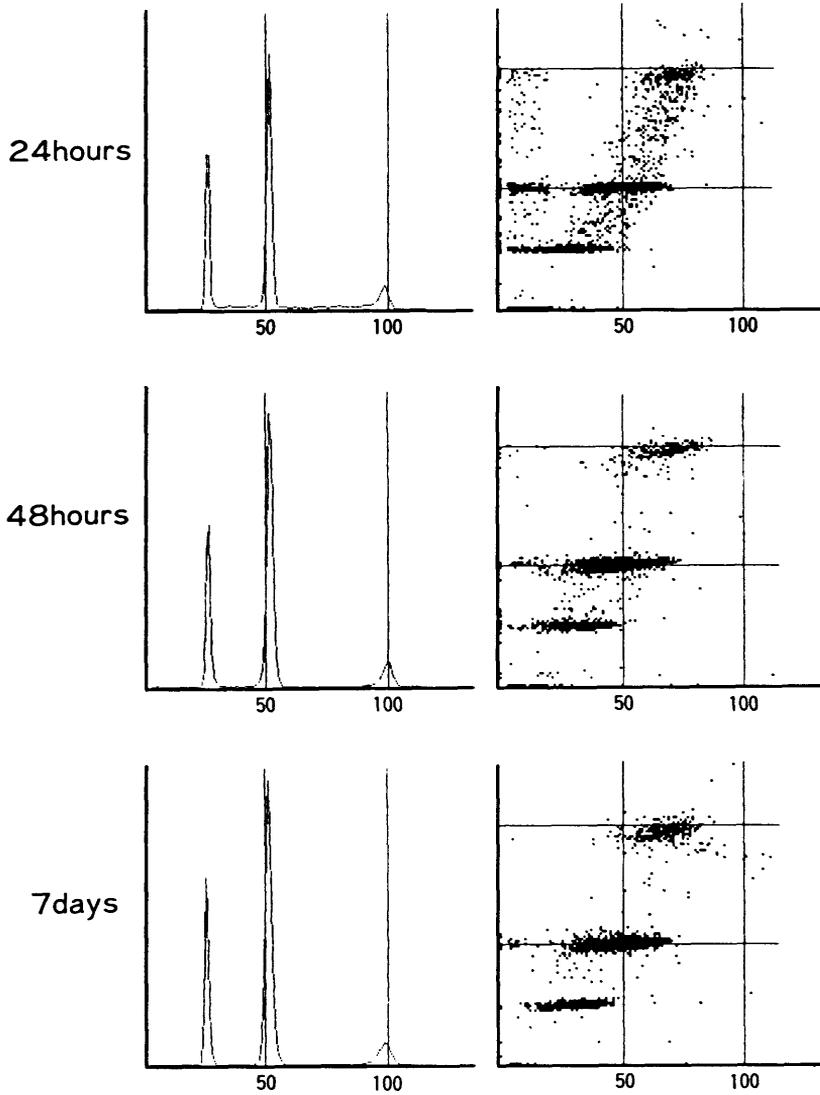


図9

肝切除後の肝細胞動態  
CCL<sub>4</sub>実験硬変群

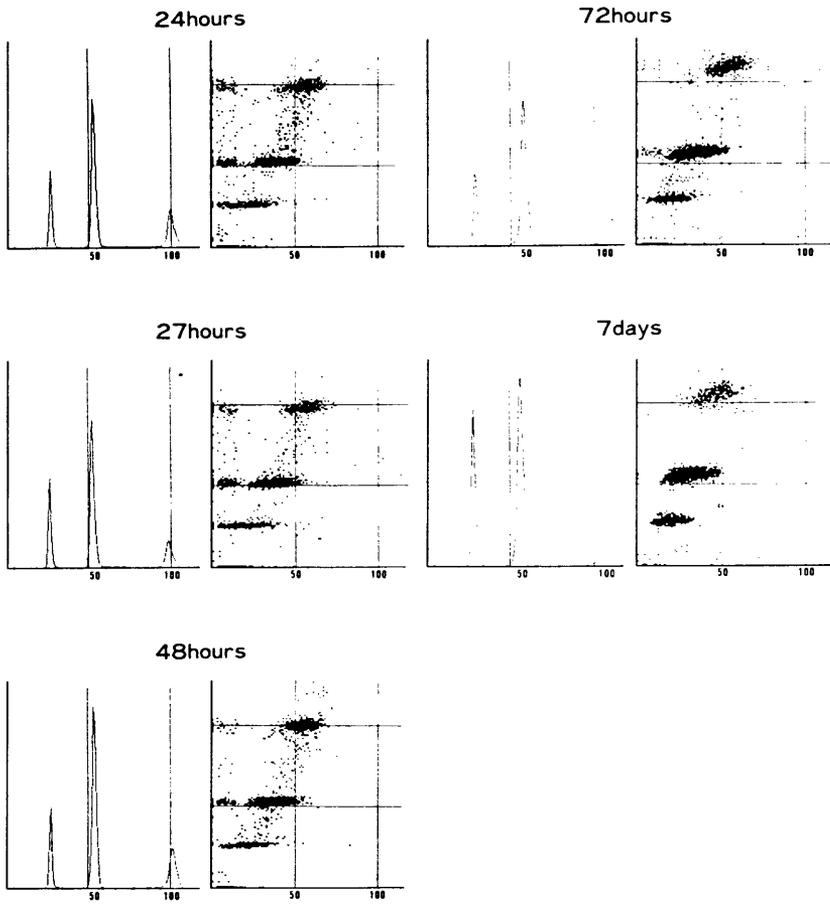


図 10

### ③実験肝癌

実験肝癌モデルとしては芳香族アミン類と並んでよく用いられる 2-acetylaminofluorene (2-AAF) を用いた。長期投与によって過形結節さらには肝癌が生じる。Digernes はこのモデルを用い、1984年に初めてフローサイトメトリーによって肝細胞動態の解析を行なった。彼は、発癌前状態の過形結節の集族を、組織学的に周囲肝組織と明瞭に区別されることから”Cirrhotic nodules” と呼称し、臨床的に肝硬変を母体に発癌する肝癌との類似性を指摘している。われわれはAAFの長期投与によって作成される肝癌の発癌に至るまでの経過の細胞動態解析を行なうとともに、AAF投与後早期の細胞動態解析を合わせて行なった。そして、結果的にこの細胞動態が前述したCCl<sub>4</sub>投与により作成された実験肝硬変と異なることを見いだした(参考論文-3)。

#### [材料と方法]

細胞周期の安定した8週齢のWinstar系雄生ラットを用い、長期投与群では0.005% AAFを含有させた餌料を2週間投与、その後1週間休養させることを1サイクルとし、最長9ヶ月間(計12サイクル)投与した。投与開始3ヶ月目(4サイクル)以降より発癌のinitiatorとして35 mg/dlの濃度に調整したフェノバルビタールを飲料水に混じて与えた。また、長期投与と併行して投与開始後早期の肝細胞動態を知るために以下の3群を用い実験を行なった。  
実験1: 0.05% AAFを連日投与し、ラットの生存曲線と死亡直前のヒストグラムパターンを観察した(n=10)。

実験2: AAF投与開始後3日、5日、10日、14日目の経日的なヒストグラムパターンの変化を観察した(n=30)。

実験3: AAF投与で知られている肝細胞増殖抑制作用を明らかにし、さらに発癌のpromotionとしてこのモデルで位置づけられている70%肝切除後の細胞動態解析を行なうために、AAF投与後5日、10日、14日目に70%肝切除を行ない、24時間、48時間、7日後の肝再生現象をcontrol群と比較検討した(n=18)。肝細胞分離は非実質細胞の混入を避けるためにコラゲネース灌流法にて行い、得られた肝細胞はdetergent-trypsin methodにて処理し、プロビジウムヨードで染色後、フローサイトメトリーで核DNA量を測定した。

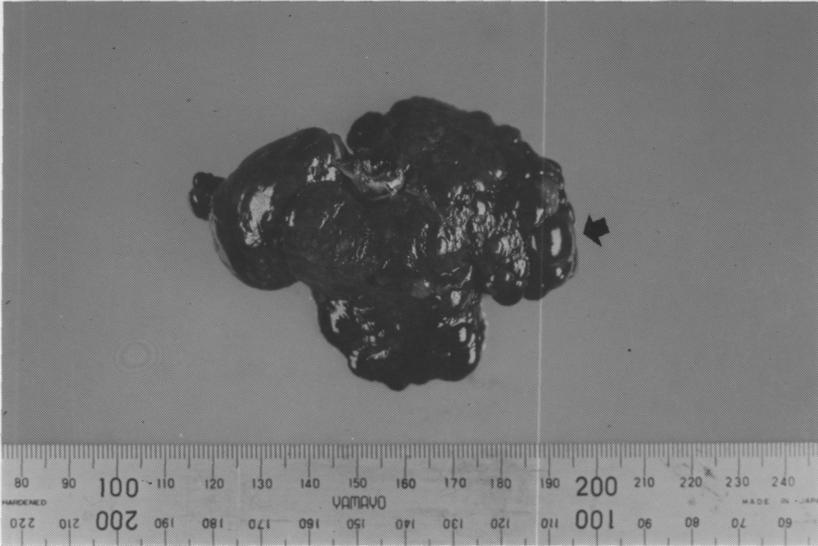
## 【結果】

### I. 長期投与群

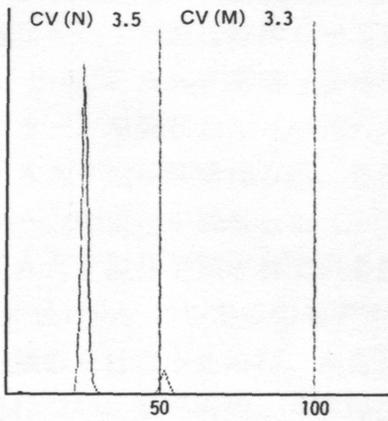
6カ月間（計8サイクル）の投与ではラット肝には、大小不同の多数の結節を生じ（図11）、組織学的には大型肝細胞で構成される過形結節であり、この時点では肝癌の発生は認められなかった。図11下段に示したように非過形結節部分のヒストグラムパターンは2C（89.2%）、4C（8.03%）、8C（0.37%）であった。一方、過形結節部分のヒストグラムパターンは2C（69.1%）、4C（27.8%）、8C（0.48%）で、過形結節部分にわずかに4C、及び8Cピークの増加を認めるものの、両者とも2C超有意のヒストグラムパターンを示し、4C有意の同週齢未処置ラットのヒストグラムパターンとは大きく異なっていた。また、8Cはごくわずかに認められるのみである。

9カ月間投与ラットでは図12に示すように、黄白色小豆大の硬い腫瘍が発生し、組織学的には胆管細胞癌に類似する高分化肝癌であった。この肝癌部のDNAヒストグラムパターンは、2C（64.3%）、4C（23.8%）と2C超有意であり、DNA aneuploidyは認められなかった。しかし、同一肝非癌部組織のDNAヒストグラムパターン（2C；87.0%、4C；8.87%）に比べ、4C成分の増加と2C-4C間のS期の増加（2.69%）が特徴的であった。

AAF 6ヶ月間投与ラット肝



非過形結節部



過形結節部

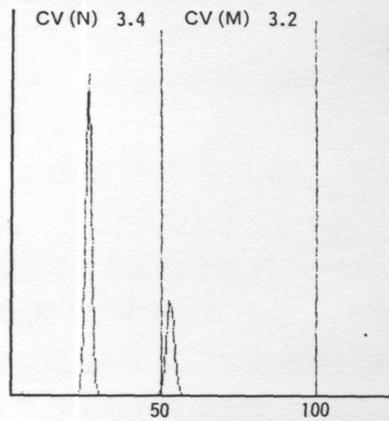
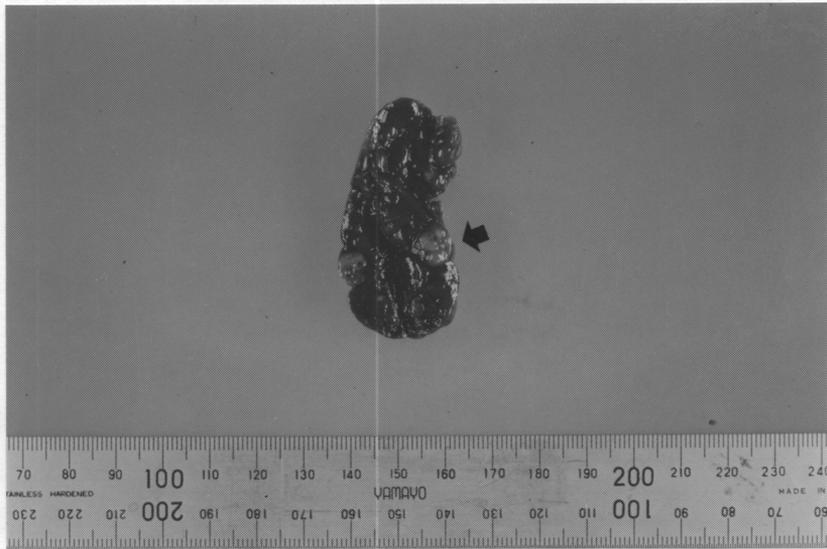


図 1 1

AAF 9ヶ月間投与ラット肝



非癌部

肝癌部

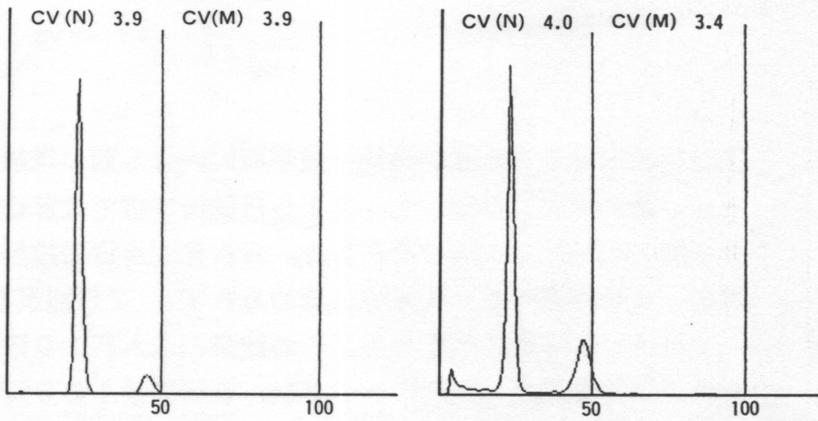


図 12

## II. 短期投与群

### 実験1：(図13)

AAF投与後28日目からラットは体重減少、腹水貯留、肝萎縮が著明となり、50%生存日数は投与開始後29日、最長生存例は投与開始後42日であった。死亡直前のラット肝には黄色粟粒大の過形結節が全例に3~4個出現していた。非過形結節部肝組織のヒストグラムは図13下段右に示したように、長期投与実験の結果と同様に2C超有意であった(2C; 85.7%、4C; 9.88%、8C; 0%)。図13下段左は同週齢の未処置ラットのヒストグラムで、2C; 17.6%、4C; 74.0%、8C; 5.3%であった。またAAF投与ラットでは2C-4C間に1.41%のS期を認めた。

### 実験2：(図14)

経日的なヒストグラムパターンの変化では、投与開始後20日までの観察では、2C; 52.0%、4C; 45.6%、8C; 0.38%と2C、4Cの逆転現象と、8Cの減少消失を認めた。しかし、この変化は投与日数に比例した連続的变化ではなく、投与開始後3日目で、2Cの増加と4C、8Cの減少(2C; 51.1%、4C; 45.2%、8C; 0.48%)が認められ、非常に早期からAAFの作用が発現することが示唆された。

### 実験3：(図15)

AAF5日間投与群では70%肝切除後、観察期間内にS期の増加は認められなかった。しかし図に示すように、AAF10日間投与群では肝切除後7日目に2C-4Cの間に3.96%のS期が存在した。AAF14日間投与群では、肝切除後24時間、48時間ではS期細胞は認められず、7日観察群(n=2)では肝切除後、4日目、5日目に死亡した。この結果、AAF10日間投与ラットでの70%肝切除後のDNA合成のピークは、肝切除後168時間目に発現することが明らかになった。

# 生存曲線

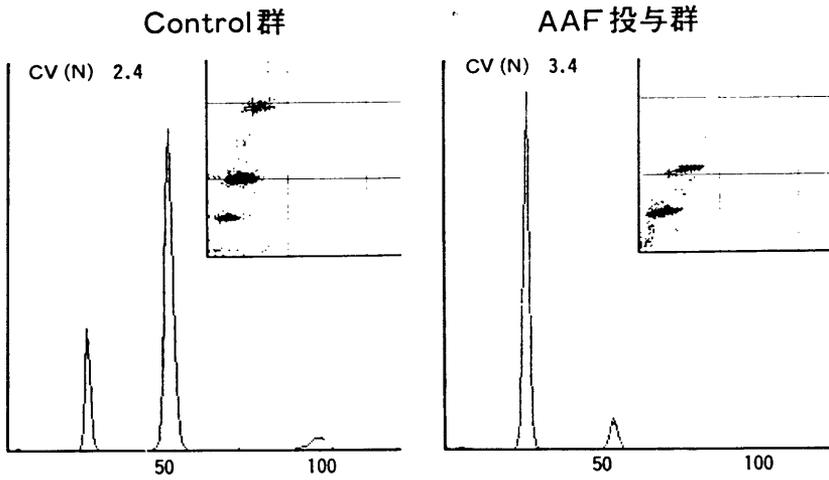
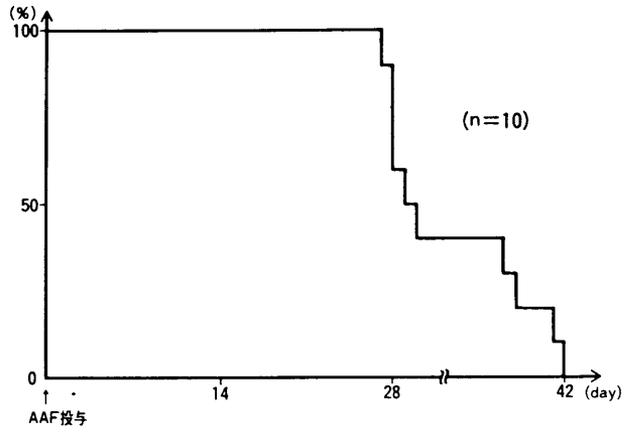


図13

### AAF 投与日数と肝細胞DNA量の変化

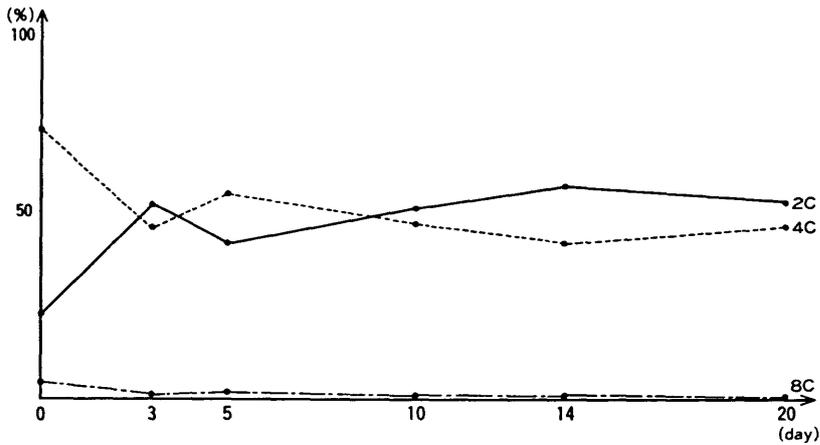


図 1 4

#### [まとめ]

AAFの発癌機序としては、肝内でふたつの代謝産物を経た後、発癌の initiator として直接肝細胞核DNAに結合して癌が誘発されるとされているが、その詳細は明らかでない。今回の実験成績から、AAFは投与開始後早期に8C、4CとDNA量が多い肝細胞核を標的とすることが示唆されており、その結果として、2C超有意のDNAヒストグラムパターンが得られる。この成績は、先に述べたCCl<sub>4</sub>で作成した実験肝硬変の polyploid 現象とはきわめて対照的である。長期投与によって生じた肝癌や過形結節のヒストグラムパターンからは、AAFによる肝細胞の変性消失と2C-4C間の新たな再生増生の繰り返しのよって、過形結節の発生や発癌が促進されるものと考えられる。

フローサイトメトリーによる肝切除後のS期相当細胞の評価に関してはいまだ問題点はあるが、フローサイトメトリーは多倍数体細胞によって構成される肝臓の硬変、発癌などのメカニズムを解明するうえで有効な方法と思われる。本研究期間内に明らかにできた点はそのメカニズムの一部ではあるが、今後もこの手法を十分に活用し、とくにAAF投与ラットに対する肝切除が発癌といかなる関係があるのかをさらに検討したい。

# 肝切除後の肝細胞動態

AAF10日間投与群

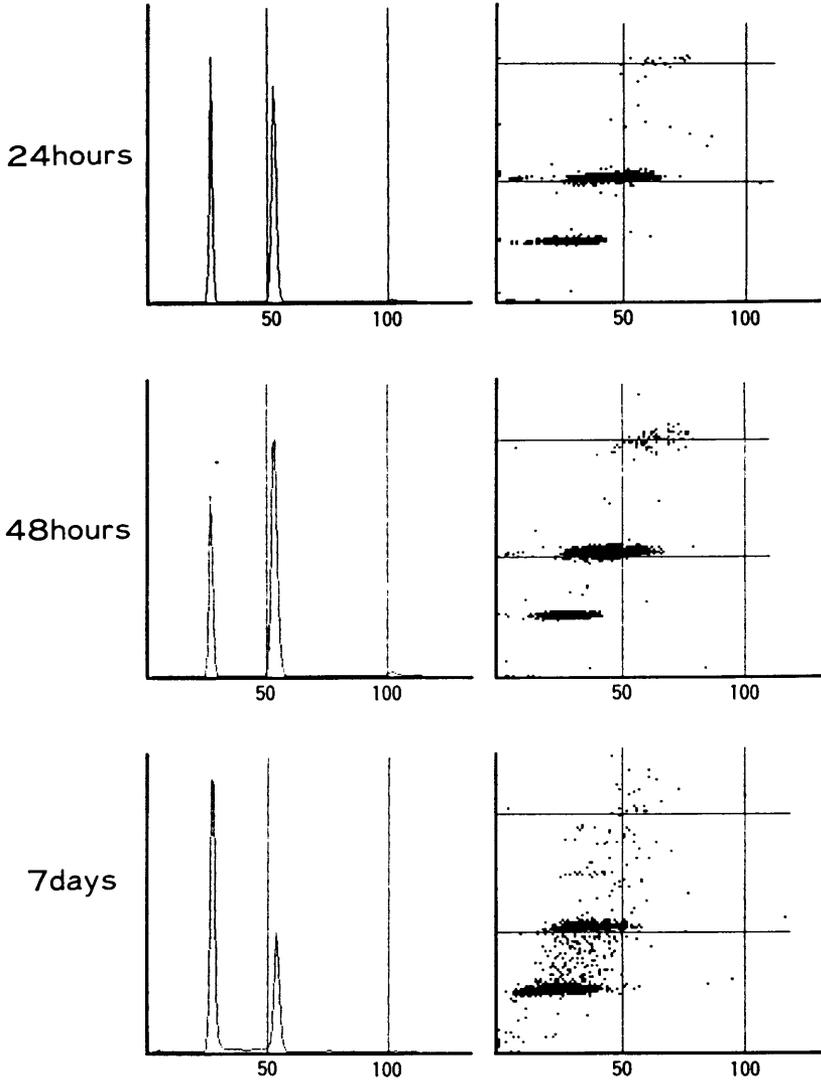


図 15

#### ④ヒト肝硬変

肝硬変、特にB型肝炎を契機に発生した炎症性肝硬変の半数は肝癌を併発するといわれている。このように肝硬変は肝癌の前癌病態としてとらえられており、この肝硬変がどのようなDNA histogramを示すかはきわめて興味のあるところである。これまで肝癌非合併肝硬変14例、肝癌合併肝硬変21例について核DNA量を測定し、2例にDNA aneuploidyを認めた(図16)。また、フローサイトメトリーにて測定した組織に近接した組織を病理学的にも検討した結果では、核細胞異型をともなう肝硬変像が認められたものの、肝硬変組織には癌組織は含まれていなかった。

われわれは、現在までに約500の消化器系臨床検体についても同様に検討しているが、非癌病巣でDNA aneuploidyを示したものは直腸癌を合併する潰瘍性大腸炎の1例のみである。また、胃のdysplasiaでDNA aneuploidyを示したとする報告もある。したがって、DNA aneuploidyを示した肝硬変は、DNA histogram上、発癌リスクの高い肝硬変と考えられる。

F.K. 38y. ♂

肝硬変合併肝癌

HBsAg (+)

硬変部 (LC)

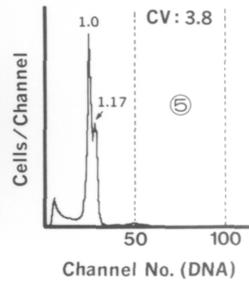
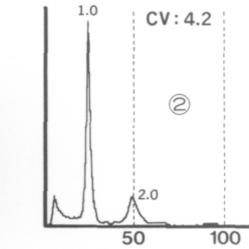
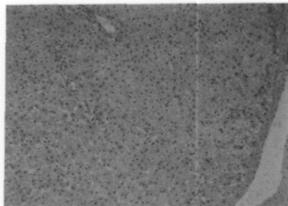
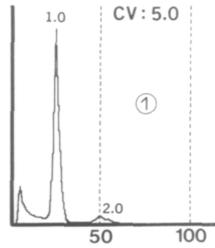
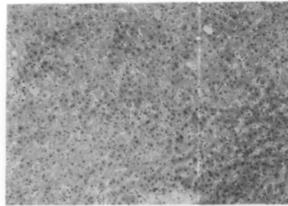


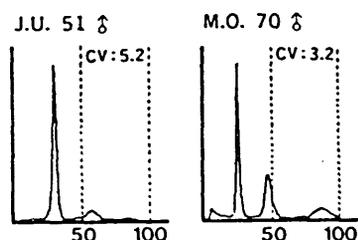
図16: DNA aneuploidy を示した肝硬変例

## ⑤ヒト肝癌

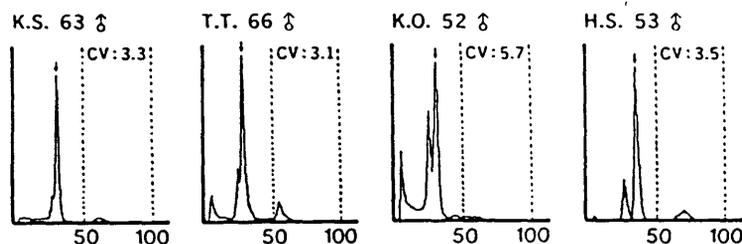
固形癌を中心にこれまで多くの腫瘍の核DNA量がフローサイトメトリーを用いて測定・報告されているが、ヒト肝癌についての報告は本邦、欧米においてもみられていない。

### ヒストグラムパターン — 原発性肝癌 —

#### 1) 2倍体型



#### 2) 2倍体近傍型



#### 3) 4倍体近傍型

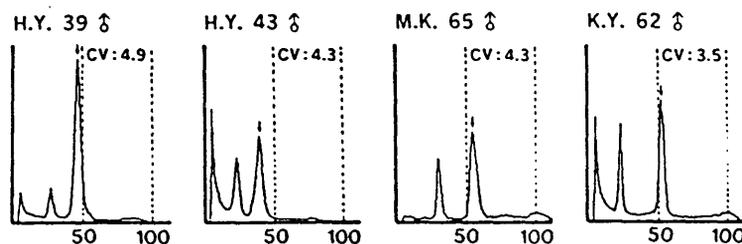


図17：典型的な原発性肝癌のDNAヒストグラム

典型的な原発性肝癌の DNA histogram を示す (図 17)。肝癌においても他の腫瘍と同様に DNA histogram は、DNA diploidy と DNA aneuploidy を示すものに大別された。後者をさらに DNA index が 1.5 以下の 2 倍体近傍型と 1.5 以上の 4 倍体近傍型に分類し、臨床像、腫瘍マーカーであるアルファ・フェトプロテイン、HBs 抗原などとの関連性について検索した (表 4)。明かな DNA aneuploidy は 18 例中 13 例、72% に認められ (表 5)、DNA index は 1.2~2.1 であった。またその半数がアルファ・フェトプロテインが 200 ng/ml 以上であった。また、DNA aneuploidy を示した 12 例中 8 例が、HBs 抗原は陰性であった。現在のところ症例数が少ないため、Edmondson 分類、発育形式などとの関連性は見いだせていない。

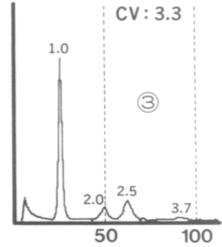
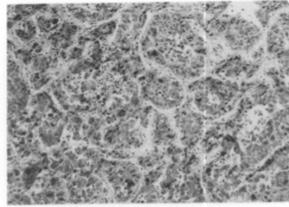
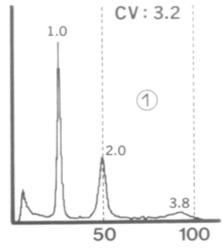
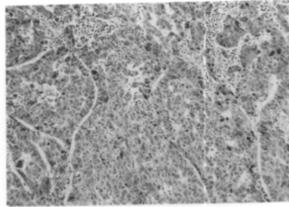
	2 倍体型	Aneuploidy 出現例	
		2 倍体近傍型	4 倍体近傍型
総 数	5/18	4/18	9/18
平均年齢	52.8 才	58.5 才	56.7 才
HBs-Ag			
(+)	3/14	1/3	3/9
(-)	1/14	2/3	6/9
α-Fp (ng/ml)			
200 ↑	2/5	1/3	5/9
200 ↓	3/5	2/3	2/9
Edmondson 分類			
I ~ II	4/5	3/3	6/9
II ~ III	1/5	0/3	3/9
発育型式			
膨脹型	3/5	3/4	5/9
浸潤型	2/5	1/4	4/9

表 4：肝癌のヒストグラムパターンと臨床像

	Diploidy	Aneuploidy	解析不能
正常肝 (n=38)	36	0	2
慢性肝炎 (n=8)	8	0	0
肝硬変			
肝癌合併(-) (n=14)	12	1	1
肝癌合併(+ ) (n=40)	20	1	1
肝 癌 (n=43)	10 (26%)	33 (74%)	0

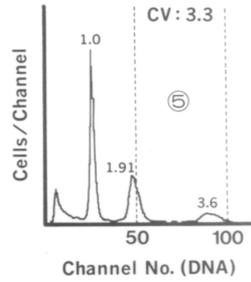
表5：肝疾患別のDNAヒストグラムパターン

DNA aneuploidy を有する肝癌と DNA diploidy を示す肝癌とはその発癌形態、発育速度、進展、再発形式に相違があると考えられる。今後、さらに症例を積み重ねることで、肝切除後の再発が多中心性発癌か脈管内播種によるものかなどの鑑別も可能となり、生命予後、疾患予後判定の重要なパラメーターになり得るとの感触を得ている。この場合、同一の腫瘍内において異なるDNA量をもつ細胞集団 (stemline heterogeneity) が存在することに留意する必要がある (図18)。



F.K. 38y. ♂  
 肝硬変合併肝癌  
 HBsAg (+)

腫瘍部 (HCC)



(12-156)

図18: Stemline heterogeneity  
 ヒストグラム③では、ふたつの stemline を示す。

#### 4. 考案およびまとめ

本研究の当初の課題としては、①ヒト肝硬変に類似した不可逆性の実験肝硬変モデルの確立、②ヒト肝硬変および実験肝硬変からの肝硬変細胞の分離、③生体内培養実験によるこれら分離肝硬変細胞の形態・機能的特性の検討である。しかし、肝硬変の前癌状態としての特性を検索する必要があるとの考えから、61年度より、④の課題として肝硬変細胞の細胞生物学的特性、特にその細胞動態的变化に関しても検索を進めてきた。

##### ①不可逆性実験肝硬変モデルの確立

肝線維化における肝硬変細胞の役割については、四塩化炭素投与により作成した肝硬変ラットの肝硬変細胞を脾臓内に移植した実験成績から、肝硬変細胞が線維形成に関与する主たる担当細胞であることをすでに確認している。本研究は、dimethylnitrosamine (DMN) 投与による不可逆性の肝硬変モデルの作成と、その肝硬変細胞を脾臓内に移植し、脾臓内再構築肝の肝硬変細胞周囲にみられる線維が移植された肝硬変細胞が産生したものであるか否かを検証する目的で行なった。しかし、DMN投与による肝硬変作成法では、ラットの死亡率が約90%と高く、数匹のラットに肝硬変を作成できたものの、肝硬変細胞を分離して脾臓内に移植するまでにはいたらなかった。今後、他の肝硬変誘発性薬剤投与による実験的肝硬変の作成と脾臓内移植、そして本研究で用いた形態学的手法に加え、コラーゲンなどに対するモノクロナル抗体を用いた免疫組織化学的手法を用いて、詳細に検討する必要があると考えられた。

##### ②肝硬変細胞の分離

ヒト肝硬変細胞の分離に関しては独自に開発した多肢灌流法および再灌流式チャンバーを用いることにより、大きな肝組織からでも、0.5g程度のごく少量の肝組織からでも、十分な収量の肝硬変細胞を分離することが可能であった。これら肝硬変細胞分離法の確立により、以後の検索が容易になった。ラットでは、コラゲナーゼ灌流法を用いることで実験肝硬変においても問題なく肝細胞が分離できた。

### ③生体内培養実験によるこれら分離肝硬変細胞の形態・機能的特性

移植生細胞数からみた肝細胞のもつ増殖力は、正常肝細胞移植例では最低  $10^5$  個の細胞数が必要であるが、肝硬変細胞移植例では  $10^4$  個の細胞数で生着・分裂増殖を認めた。したがって、肝硬変細胞には正常肝細胞以上の旺盛な増殖力をもつと考えられた。

障害程度の差による膠原線維増生度の相違については、 $CCl_4$  の投与量を変化させることにより肝硬変を作成し、分離した肝硬変細胞を脾臓内に移植して形態学的に検討した。しかしながら、薬剤投与量が同量であっても脾臓内再構築肝の線維化の程度は一定せず、障害程度の差による膠原線維増生度の相違を定量的に解析することは困難であった。

その他の硬変肝構成細胞（Kupffer 細胞、脂肪摂取細胞）の脾臓内再構築肝組織の線維化、肝硬変細胞の増殖に対する役割は、本研究年度中には明かな成績を出すことはできなかった。しかし、その研究を遂行するうえでの基礎的な方法論を確立できた（参考論文-4）。すなわち、Percoll gradient 法により、Kupffer 細胞を分離することに成功し、さらに FITC-latex beads を貪食させ、フローサイトメトリー法と組み合わせることで、Kupffer 細胞の機能的側面をも評価することが可能となった。

### ④肝硬変細胞の細胞生物学的特性

これまで、肝細胞の細胞動態的变化は、放射性チミジンの DNA への取り込み率やオートラジオグラフィによる標識率、細胞分裂指数（Mitotic Index）を指標として評価されてきた。本研究では、その変化を近年、細胞生物学の研究に広く用いられるようになってきたフローサイトメトリー法を用いて評価することを試みた。その場合、ヒトを含む哺乳類の肝細胞には、細胞学的に 2 核細胞の存在と多倍数体核の存在という、他の臓器を構成する細胞にはみられないふたつの特徴をもつため、まず方法論について基礎的な検討を加えた。

そして、確立されたそれらの方法を用いて正常肝、正常肝の肝切除後、 $CCl_4$  投与により作成した硬変肝、それぞれの肝細胞の細胞動態の変化を検討した。その結果、肝切除後の再生肝細胞、硬変肝細胞では、正常肝細胞に比べ S 期と  $G_2M$  期、すなわち細胞増殖期に相当する分画の細胞が増加していた。さらに、硬変肝細胞では、著明な polyploid 化が認められた。これらの成績は、フローサイトメトリー法を研究方法に導入したことによって、非常に簡単にかつ高

い信頼性をもって得ることができた。

一方、このような肝切除後の再生肝細胞、硬変肝細胞、さらには肝癌細胞は増殖亢進状態にあると考えられ、これら三者に共通する多くの細胞生物学的特性をもっている。しかしながら、共通性と同時に多くの異なった特性も持ち合わせている。その相違を検索することが本研究の課題の一つであった。この点についても、その一部について基礎実験的・臨床的に検討を加えた。肝癌を発生させるためにAAFを投与し、その発癌経過の肝細胞動態を解析した結果では、投与初期に4C主体の細胞集団から2C主体（2C超有意型のDNAヒストグラムを示す）へ変化するという顕著な所見をとらえることができた。この成績は、CCl<sub>4</sub>投与により肝硬変を作成した場合の細胞動態の変化とは明らかに異なっていた。

臨床的検索においては、ほとんどの肝硬変細胞はDNA aneuploidyを示さなかったが、2例ではあるがDNA aneuploidyを示した例を認め、肝硬変が前癌病変としての意味あいをもつものと考えられた。一方、AAFによる発癌過程では、DNA aneuploidyは認められず、AAFによるラット発癌モデルが、ヒトの場合のどのような発癌に対応するものか、今後検討する必要性を感じた。

また、肝癌細胞の臨床的検索において、DNA aneuploidyを示した肝癌患者の生命予後は不良の傾向があり、肝硬変からの発癌予知と肝癌の悪性度を知る新たな指標が生まれる可能性を見いだせた。

以上、肝硬変細胞の線維化と発癌ポテンシャルというふたつの肝臓外科領域に密接に関連する研究課題について、基礎的・臨床的に検索し、近い将来、臨床の場で新たな診断・治療法に寄与し得るいくつかの興味ある知見を得ることができた。

最後に本研究の遂行にあたり、ご助言頂いた、岩手医大産婦人科教室・西谷巖、善積昇先生、山口大学病理学教室・高橋学先生に深謝致します。また、労を惜しまず協力頂いた岡田陽子氏、実験実習機器センター・阿久津弘明技官に感謝致します。

#### 参考論文-1

草野満夫、紀野修一、水戸迪郎：核DNA量の解析-肝硬変、肝臓癌-。「フローサイトメトリー、手技と実際 第2版」太田和雄、野村和弘、高本滋編、蟹書房、東京、1988、in press

#### 参考論文-2

紀野修一、草野満夫、水戸迪郎：フローサイトメトリーによるバラフィン包埋肝組織を用いた肝細胞核DNA量の測定法。肝臓 29(5)：1988、in press

#### 参考論文-3

木下透、草野満夫、紀野修一、柳部朗、水戸迪郎

AAF短期投与におけるrat肝細胞動態について。フローサイトメトリー 7：1988、in press

#### 参考論文-4

山口秀則、草野満夫、水戸迪郎

肝再生時における肝細胞およびKupffer細胞の細胞回転-フローサイトメトリーによる解析-。肝臓：in submission