

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

消化器癌 (1991.06) 1巻2号:223～229.

ラット肝hyperplastic noduleと早期小肝癌の肝灌流法による鑑別

小野寺一彦, 江端英隆, 水戸迪郎

ラット肝 hyperplastic nodule と 早期小肝癌の肝灌流法による鑑別

ORIGINAL ARTICLE

JJCDO

小野寺一彦・江端英隆・水戸迪郎*

ラット化学発癌モデルを用いて、肉眼的にはまだ同定しえない肝細胞癌が、hyperplastic nodule のなかに発生しはじめる時期の門脈血行について検討した。経門脈的肝灌流前には、まったく区別できない多数の肝表面結節のなかで、灌流後に赤色調を帯びることで、他と識別できる結節が約1割存在し、それは増殖能の旺盛な高分化型肝細胞癌を内包していた。この結節を細胞分離して、同系ラット脾臓内へ移植すると、急速に膨張性に増殖し結節を形成した。

Differentiation of early cancers from hyperplastic nodules in rat liver by liver perfusion via portal vein

To distinguish early cancers from hyperplastic nodules induced in rat liver after intermittent 2-acetylaminofluorene feeding, portal supply was studied. The hyperplastic nodules found at 5-6 months were grossly divided into two groups clearly after liver perfusion via portal vein. One of them were reddish because of obstruction in portal branch, and the others yellowish by flushing out of blood. Only the former were histologically proved to include well differentiated hepatocellular carcinoma with increasing proliferative activity, and proliferated rapidly to form cancer nodules after transplanted into rat spleen.

Kazuhiko Onodera・Hidetaka Ebata・Michio Mito*

key words: experimental hepatocarcinogenesis, hyperplastic nodule, early hepatocellular carcinoma, liver perfusion via portal vein, intrasplenic hepatocytes transplantation

画像診断の進歩により肝臓の小結節性病変が検出される機会が多くなったが、その悪性診断にはいまだ困難を伴うといわざるをえない。たとえエコー下肝生検が行われても、採取部位に癌が含まれない可能性があるし、adenomatous hyperplasia (AH)^{1,2)}と高分化型肝細胞癌の異型度の判定にしても、主観的要素がみられる。そもそも、肝前癌病変とされるAHが肝細胞癌を内包するAH、さらには病変すべてが癌で占められる小肝細胞癌と一連の病変であるのか、また、AHの癌化する確率がどの程度なのかについて一定の見解はない。これを臨床的に研究するには、個体を別にする多数の結節性病変を形態的に検討し、その進

展形式を類推していくしかない。そこでヒト肝AHと高分化型肝細胞癌に類似した病変をつくるラット実験肝癌モデル(2-acetylaminofluorene 断続投与)を用い、発癌過程にあるhyperplastic nodule (HN)の各段階の肝細胞を区別して採取し移植することにより、別個にその後の変化を観察するという新たな方法が、肝前癌病変とそれへのpromotionの役割を解明するうえできわめて有用と考え、その確立に向けた基礎的研究を行ったので報告する。

方法

(1) ラット肝癌作成 regimen

10週齢雄性Wistar系ラット(静岡県実験動物農業協同組合)120匹を用い、Teebor & Becker³⁾の方法を一部変更し、2-acetylaminofluorene (2-AAF)を0.025%含有するMF飼料(オリエンタル酵母)を4週間自由摂取させ、その後1週間2-AAFを含有しない基礎飼料で飼育した。その後は3週間の2-AAF含有飼料投与と1週間の2-AAF非含有飼料投与を反復した。

(2) hyperplastic noduleの肝灌流による観察と組織学的検索

regimen開始後1カ月ごとにエーテル麻酔下でラット10~20匹ずつ開腹し、肝の性状を肉眼的に観察したうえ、下大静脈切開下で経門脈的にHanks液にて30~40 ml/minの流量で肝を1分間灌流し、再度肉眼的に観察した。一部には、経門脈性バリウム造影も施行した。肝結節について

*The Second Department of Surgery, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan 旭川医科大学第二外科

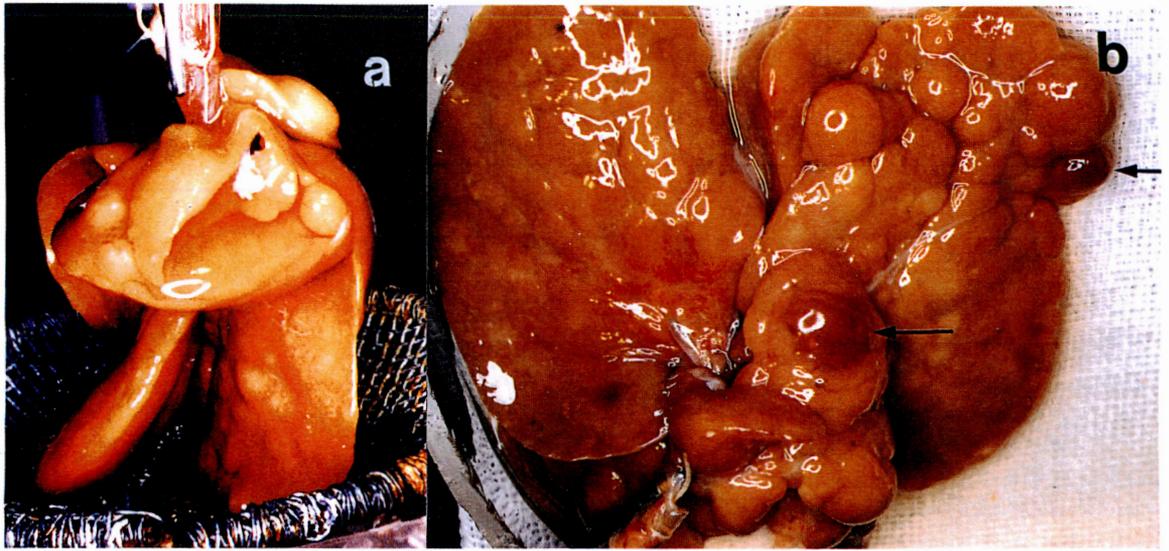


図1 経門脈的肝灌流後の肉眼像

a: early stage HN

b: late stage HN (矢印は赤色調の残った結節)

は、hematoxylin-eosin (HE), 鍍銀, γ -glutamyltranspeptidase (γ -GTP)⁴⁾, bromodeoxyuridine (BrdU)⁵⁾染色などにより組織学的に検索した。なお、BrdU染色については犠牲死の1時間前に BrdU 50 mg/kg をラットに静注し、組織は1昼夜4°C 70%アルコールで固定し、抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた abidin-biotin-peroxidase complex 法によって染色した。そして、肝細胞1,000個以上を数え BrdU を核内に取り込んだ肝細胞をS期細胞として、その割合を labeling index (LI)として示した。

(3) hyperplastic nodule 肝細胞の移植方法

Seglen⁶⁾の方法に準じ、先述の灌流に引き続き肝を摘出して0.05%コラゲナーゼ含有 Hanks 液による灌流を15分間行ったあとで結節部分を核出し、ハサミで細切しガーゼで濾過することにより肝細胞を分離し、50 G で遠心した suspension 0.2 ml を水戸⁷⁾の方法で同系雄性ラットの脾臓内へ直接注入することにより移植した。recipient ラットは、各月10~20匹ずつ使用し、移植前後とも基礎飼料で飼育した。

(4) 移植後の検索

移植後3週と3カ月に犠牲死させ脾を組織学的に検索した。また、一部には^{99m}Tc-N-pyridoxyl-5-methyltryptophan (^{99m}Tc-PMT)⁸⁾11 MBq/kg

静注後、肝・脾・軟部組織における経時的放射能消失曲線とシンチ画像を求めた。

成績

(1) 肝表面結節の肉眼的所見

regimen 開始後1~3カ月のラットのいずれにも肝表面に半球状に突出した境界明瞭な直径2~7 mm の表面平滑な結節が数個~10数個形成され、これを仮に“early stage HN”とよんだ。その硬度は周囲の肝組織と同程度であった。そして、経門脈的肝灌流後はいずれの結節も周囲肝と同様に血液が flush out され黄白色になった(図1 a)。

さらに5~6カ月後では、肝葉自体が萎縮と肥大で変形し肝表面の凹凸も強くなり、肝硬変様になるが、やはりラット1匹当たり数個~10数個の径3~9 mm の結節が肝表面、特に肝下面から種々の程度の突出をもって認められた。この時期のHNを仮に“late stage HN”とよんだ。その結節どうしには、色調、形、硬度、表面性状などに差異は見出されなかった。しかし、肝灌流後は多数の肝結節のうち9割は、early stage HN と同様に flush out されたが、約1割に灌流前の赤色調が明瞭に残ることが判明した(図1 b)。これに経門脈的バリウム造影を行うと、赤色調の結節内にはバリウムが入っていないが結節は avascular な像

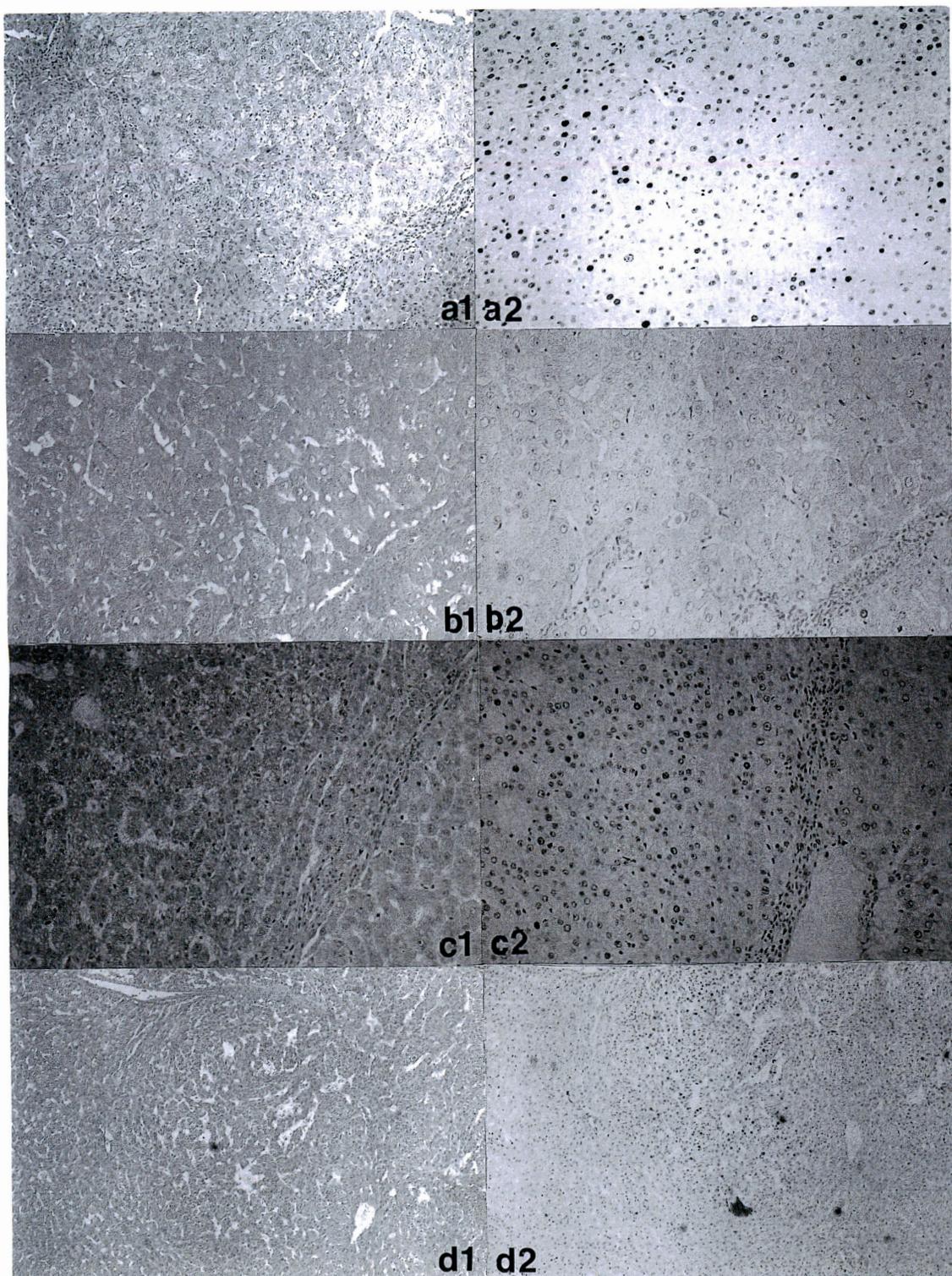


図2 HNの組織像(a₁, b₁, c₁, d₁: HE染色)(a₂, b₂, c₂, d₂: BrdU染色, 核が濃染しているのがS期細胞)
 a₁・a₂: early stage HN (a₁: 40倍, a₂: 200倍). b₁・b₂: flush outされた late stage HN (100倍)
 c₁・c₂: 赤色調の残った late stage HN (100倍). d₁・d₂: 赤色調の残った late stage HN 中の nodule (40倍)

を呈した。したがって、赤色調になることの原因は、門脈枝の閉塞によることが確認された。

さらに7~9カ月後では、肝の変形は著明となり、late stage HNと同様の形の肝表面結節に出血や白斑を伴うものがみられた。また、他の結節とはまったく様相を異にした表面不整な硬径2 cm前後の灰白色の大型の癌結節も、ラット1匹当たり0~3個出現し、これは肉眼的に容易に識別できた。また、肝灌流後赤色調が残る結節の数は、月数がたつほど多くなる傾向が認められたが、肝結節が多彩な像を呈するため、その判別は困難になっていった。

(2) 肝表面結節の組織学的所見

HE染色では、early stage HNは淡明な大型肝細胞で構成され、その核は大きく淡明で核小体は明瞭であり、なかには核分裂像も散見された。また、HN内にはグリソン鞘がなく小葉構造は消失しており、HN全体は周囲肝組織を圧排しており、その境界には薄い線維性被膜の形成されていないものが多かった(図2 a₁)。鍍銀染色では、索構造の乱れと類洞の拡大が明瞭に示された。γ-GTP染色では、HNを24個検索したうち16個に陽性であった。BrdU染色では、各HNによりLIがいちじるしくばらつき、3~8%と幅があり、個々のHN内においてもBrdU陽性肝細胞の分布は必ずしも均一でなかったが、特に細胞の異型性との間に関連は見出されなかった(図2 a₂)。なお、HN以外の部分の肝細胞のLIは0.1%以下であり、正常肝のLIに匹敵した。

つぎに、late stage HNのうち、肝灌流によりflush outされた結節の組織所見としては、HN周囲肝細胞とほぼ同大の肝細胞でHNは構成され、その細胞密度はやや高かった。また、完全なグリソン鞘が存在せず、周囲肝組織を圧排する点はearly HNと同じであった。索状構造は保っているが、その厚さは不均一で、軽度な構造異型を持つEdmondson I型に近い部分もみられた(図2 b₁)。γ-GTP染色では、まだらに染色されるのも含め30個全例に陽性であった。BrdU染色では、多少のばらつきはあるものの、HN全体としてのLIは $0.6 \pm 0.3\%$ と低く、周囲肝組織のLIは0.1%以下であった(図2 b₂)。

一方、肝灌流後赤色調が残ったほうの肝結節のHE染色による所見は、flush outされた結節とほ

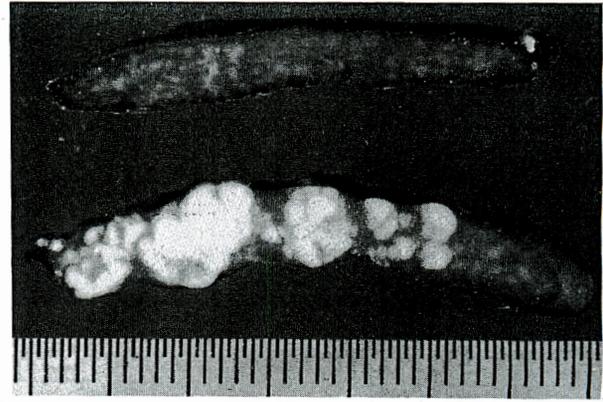


図3 脾内移植後3週の脾剖面像

上: flush outされたHNを移植

下: 赤色調HNを移植

とんど同様であるが、索状構造を基調としているが、広い腺腔や偽腺管構造を持つ部分が高頻度に見られた(図2 c₁)。γ-GTP染色では、すべて陽性であった。BrdU染色によると、そのいずれの結節にも全体あるいは一部にきわめてS期細胞が多く、そのLIは $5.5 \pm 0.3\%$ であった(図2 c₂・d₂)。

また、肉眼的に容易に識別した癌結節は大小さまざまな角ばった異型性の高い肝細胞から構成され、結節全体に明らかな構造異型がみられる分化度の低い肝細胞癌であった。

(3) 脾内移植後の検索

flush outされたearly~late stageの各月ごとのHNを、それぞれ複数個核出し、細胞分離後脾内へ移植されたラット(n=65)には、その3週後も3カ月後も肉眼的には脾臓の大きさ・表面性状に著変はなかった(図3上)。

しかし組織学的には、白脾髄の周辺に肝細胞が孤立散在性あるいは索状をなして生着している像が全例にみられ、その生着量は、3週後より3カ月後のほうが増加していた。また、脾内肝細胞の増殖様式はearly stage HNでは、ほとんどsinusoidalであったが、late stage HNでは集塊をなしているところが多かった(図4 a・b)。しかしこの中に癌と考えられるような異型性のある肝細胞は見られず、構造異型を形成した部分もなかった。そしていずれもγ-GTPは陽性であり、LIはearly stage HNでは移植前より低く、late stage HNでは移植前と変わらなかった(図4 a・

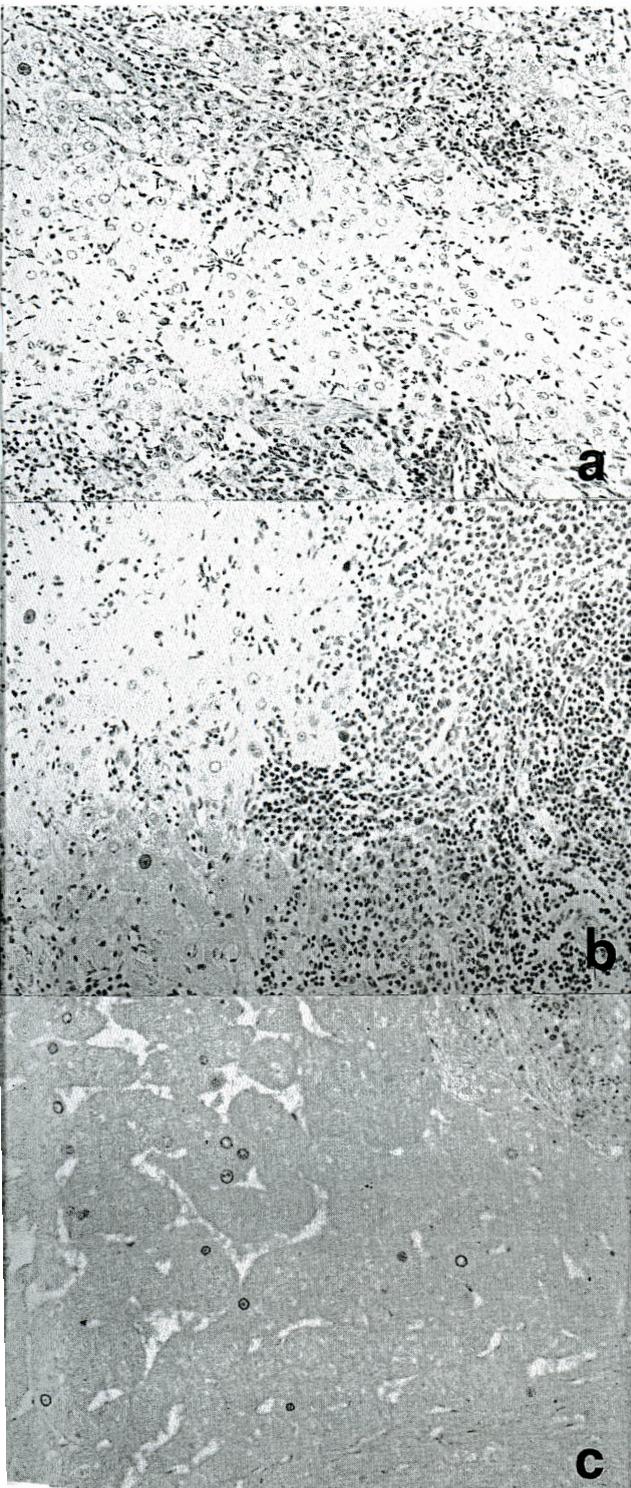


図4 脾内移植後3カ月目の組織像 (BrdU染色, 100倍)

- a: early stage HN
- b: flush outされた late stage HN
- c: 赤色調の残った late stage HN

b). 3カ月後の ^{99m}Tc -PMTシンチ画像では、ほとんど脾への集積は認められず、脾における放射能消失曲線も頸部軟部組織とほぼ同一の減衰を示した。

一方、肝灌流後も赤色調を残した結節を集め、細胞分離して移植されたラット(n=14)では、3週後も3カ月もすべての脾表面に肉眼的に明らかな結節が多数存在した。その各結節の大きさは、3週後で径3~5mm 3カ月後では径7~10mmにもなり、断面は境界明瞭な均一な肝臓色の腫瘤であった(図3下)。3カ月後では脾自体が巨脾といえる状態を呈した。3カ月後の ^{99m}Tc -PMTシンチ画像では明らかな脾への集積が認められ、脾における放射能消失曲線も減衰のない特異なもので、10分後には肝における値を上回り、ヒトにおける肝細胞癌の転移所見と一致した(図5)。組織学的にもこの脾結節は構造異型の明らかな肝細胞癌で、 γ -GTPはすべて陽性、LIも高値を持続していた(図4c)。この癌は、自律的に増殖し、しだいに肝転移も起こし、移植後5カ月以降にrecipientラットは死亡した。また、この脾内肝細胞癌は細切しただけで、同系ラットの脾内へ直接あるいは経門脈的に肝内に移植して継代することができた。

考察

種々の成因が考えられるヒト肝細胞癌を、ラットの2-AAF単独投与による化学発癌と同一視はできないが、今回のラット肝表面結節の肉眼的・組織学的所見と、それらの移植後の経緯に基づいて発癌過程の一連の病変を総括しヒトと比較してみた。

early stage HNについては、regimen開始後1~2カ月以降に完全に基礎飼料に戻してしまうと、ラットの肝結節は次第に消失していくことや、脾内移植後の生着像が正常肝細胞や再生肝細胞を移植したのと同じであることなどから、このHNは2-AAF肝障害に対する肝の再生増殖であり、ヒトでいう再生性結節⁹⁾のようなものと考えられる。

late stage HNについては、形態的にヒトAHに類似すると思われ、regimen開始後5カ月で高分化型肝細胞癌がHNのなかからnodule in noduleの形で出現しはじめ、経時的にその出現率を

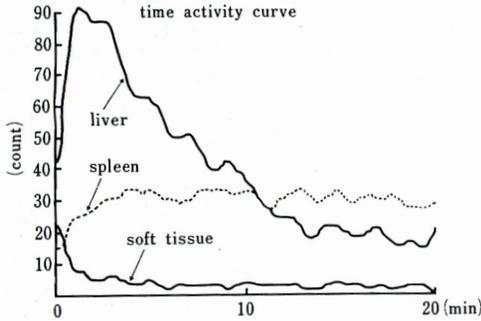
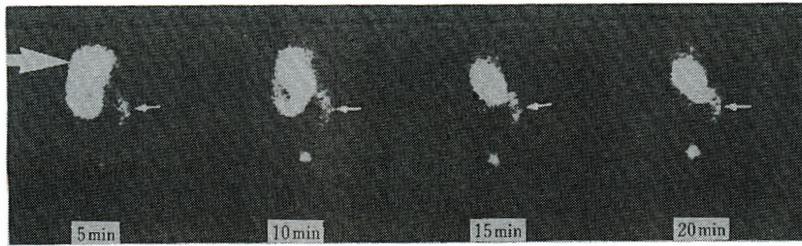


図5 赤色調の残ったlate stage HNを脾内へ移植した3カ月後の ^{99m}Tc -PMTシンチグラフィ(→:肝, →:脾)

増すことから、late stage HN と高分化型肝細胞癌は一連の病変と考えられる。ヒトでいえばAHからいわゆる“癌を内包するAH”が出現するのに当たると考えられる。

しかしlate stage HNのすべてが、その後癌化していくわけではなかった。また、肝灌流でflush outされたlate stage HNの肝細胞を基礎飼料で飼育されている他のラットの脾に移植し、3カ月間経過をみても脾内で癌化はみられなかったことから、late stage HNそのものに自動的に癌化していくpotentialはなく、癌化していくのに少なくとも2-AAFの断続的投与が必須条件であることがうかがえる。これが、ヒト肝発癌でも当てはまる条件ならば、肝炎ウイルスやなんらかの肝障害物質の前癌肝細胞への持続的作用が発癌に不可欠なのかもしれない興味深い。

regimen開始後7~9カ月には明らかな癌結節が出現し、8~10カ月目になると、るいそうと腹水貯留を認め、死亡していったことから、この時期がヒトの末期癌に当たると思われる。

late stage HNのなかに門脈枝閉塞を伴うものが出現してくる理由としては、HNのなかに癌が発生して急速にその体積を増すために、結節内へ入る門脈枝が圧排されることが推測される。今回示した肝灌流による悪性の判定法が、完全なもの

か否かについて再検討するため、regimen開始後5~6カ月目の時点に限った追試を行ったところ、その組織の判定結果からfalse positiveが15% (2/13) 存在するが、false negativeがなかった (0/130) ことより、flush outされた結節を非癌細胞として移植することには信頼がおけるものといえる。たとえ、この時期のflush outされたlate stage HNの中に組織学的に見出されなかった微小な高分化型肝細胞癌が存在していたにしても、癌細胞がごく微量だったために、複数の結節を集めて細胞分離し、混合してから移植した今回の方法では、癌細胞の濃度がきわめて薄いため、脾内で生着しなかったかまたは組織学的に検出しかねたと考えられる。

また、肝灌流後赤色調になった結節自体は、組織学的に高分化型肝細胞癌として矛盾せず、そのLIも明らかに高いかあるいは結節内に高い部分を持ち、移植後の生着態度も癌として説明できたことから、初期肝細胞癌として位置づけられる。もちろん灌流手枝自体が不良で、赤色調が残った場合は、それを癌細胞としてその後の移植実験に使わないように注意すべきである。

また、regimen開始後7~9カ月の肝に対する肝灌流では、赤色調結節の判定において明らかなfalse negativeやfalse positiveがみられたり、前灌流では赤色調であったものがコラゲナーゼ灌流中にflush outされたりするため、正確な判定はできなかった。その理由として、この時期の肝結節には出血や変性を伴うことが多いことや、癌の新生血管が門脈血行に影響してくることが考えられる。

いずれにせよ、regimen開始後5~6カ月の時期のラット肝HNには前癌病変とごく早期の肝細胞癌が混在しており、それを区別したうえ、移植法を用いてその後べつべつに観察していくことができたわけであり、その有用性は高い。つまり、

promotion, progression, regression といった癌の多段階説を担う多くの物質や生体条件を recipient に働かせて、移植前に評価の定まった肝細胞の変化を直接みられる。これは従来のように、もとの組織像が判明していないある時点の肝結節を対象として、発癌過程を推測したものとはまったく違う方法といえる。

さらに今回の実験結果を、ヒト肝の小結節性病変の診断に応用できるか否かは不明であるが、前癌病変のなかに肝癌が発生する早期において、その門脈血行が遮断されている可能性もあり、血管造影下連続 CT による門脈相の所見や超音波カラー Doppler 法により、肝結節の門脈血行をみるのが臨床において有用であるかもしれない。

また、ラットの late stage HN のなかで、肝灌流で flush out されたのと、されなかったのを組織学的に見くらべた場合、後者に構造異型の出現率が高かったものの、その異型性の程度が逆転しているケースもあり、異型度と LI も必ずしも相関しないことから、ヒトにおいても細胞異型の概念だけで癌を診断してよいものか疑問である。別実験であるが、今回の肝灌流法でわけた 2 種類の late stage HN の DNA ploidy pattern を flow cytometry (CS-20: 昭和電工)¹⁰⁾ で検索しても、いずれも 2C 超優位の diploid であり、差は見出されなかった。しかし、regimen 開始後 8~9 カ月に肉眼的に容易に識別した癌結節からは、aneuploid が出現した。したがって、ラット肝前癌病変と早期肝細胞癌の生物学的悪性度を判定するには、異型性や DNA ploidy pattern では不可能で、LI がもっとも信頼できると思われた。

結語

① 雄性 Wistar 系ラットに 2-AAF を断続的に投与することで肝発癌過程を惹起した。

② 肝の hyperplastic nodule のなかから肝細胞癌が発生しはじめると考えられる時期 (regimen 開始後 5~6 カ月) に、経門脈的肝灌流を行い、肝結節の色調をみることにより、これらを 2 種類に分類できた。

③ 一方は LI が低く細胞分離して同系ラット脾へ移植しても、全例生着はするが癌にはならなかったことから前癌病変と位置づけられ、他方は LI が高く移植後は急速に増殖し癌結節を形成したことから早期肝細胞癌と考えられた。

④ 本法による前癌病変の識別とその移植による観察は、carcinogenesis における promotion の役割を直接研究するモデルとして役立つと思われた。

文献

- 1) Peters, R.L.: Hepatocellular carcinoma. Wiley Medical Publications, New York, Sydney, Toronto, 1976, p 117-121.
- 2) Arakawa, M., Sugihara, S., Kenmochi, K. et al.: Small mass lesions in cirrhosis: Transition from benign adenomatous hyperplasia to hepatocellular carcinoma? J. Gastroenterol. Hepatol. 1: 3-14, 1986.
- 3) Teebor, G.W., Becker, F.F.: Regression and persistence of hyperplastic hepatic nodules induced by N-2-fluorenylacetylamide and their relationship to hepatocarcinogenesis. Cancer Res. 31: 1-3, 1971.
- 4) Rutenburg, A.M. et al.: Histochemical and Ultrastructural Demonstration of γ -Glutamyl Transpeptidase Activity. J. Histochem. Cytochem. 17: 517-526, 1969.
- 5) Gratzner, H.G.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. Science 218: 474-476, 1982.
- 6) Seglen, P.O.: Preparation of isolated rat liver cells. Methods Cell Biol. 13: 29-83, 1976.
- 7) Mito, M., Ebata, H., Kusano, M. et al.: Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. Transplantation 28: 499-505, 1979.
- 8) 長谷川義尚・他: 肝細胞癌の診断における ^{99m}Tc -(Sn)-N-pyridyl-5-methyltryptophan (^{99m}Tc -PMT) の臨床的評価. 核医学 20: 1355-1359, 1983.
- 9) Wada, K., Kondo, F., Kondo, Y.: Large regenerative nodule and dysplastic nodule in cirrhotic liver. A histopathologic study. Hepatology 8: 1684-1688, 1988.
- 10) Vindelov, L.L. et al.: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 3: 323-327, 1983.