

AMCoR

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

消化器癌の発生と発展 (1991.09) 3巻:395~399.

化学発癌モデルからみた早期肝癌

小野寺一彦、江端英隆、水戸迪郎、上井直樹、高橋昌宏、
Henryk Witmanowski、目黒順一、久木田和丘、米川元樹、
川村明夫

化学発癌モデルからみた早期肝癌

小野寺一彦・江端英隆*・水戸廸郎*・上井直樹・高橋昌宏・Henryk Witmanowski

目黒順一・久木田和丘・米川元樹・川村明夫

札幌北榆病院人工臓器・移植研究所外科, *旭川医科大学第二外科

はじめに

ヒト肝の良悪境界病変については臨床的には未だ確定した見解はないが, Adenomatous hyperplasia, Focal nodular hyperplasia, Adenoma などが肝の前癌病変として注目されてきた。そして超音波下肝生検と各種画像診断による follow up によりこれらの病変の癌化の有無を含めた推移が明らかになりつつあり, 異型度の高い adenomatous hyperplasia は癌として扱われる傾向にある。しかし生検でとらえた病変がミクロレベルでも同一部位であることを断定するのは難しく, 病変の経時的連続変化を追跡した確実な直接的証拠はないのが現状であり, 今後多くの症例の集積結果を待たねばならない。そこで今日においても化学発癌モデルによる動物実験で, 種々の角度から前癌病変より癌化する過程をとらえる意義は高いといえる。

我々はラットの肝硬変・過形成結節・肝細胞癌から採取した肝細胞でも, 脾内へ移植すると確実に生着し, その後の肝細胞の変化を形態的に観察できることを報告してきた¹⁾。そこで今回ラット化学発癌モデルとしてラットに 2-acetylaminofluorene (2-AAF) の断続投与を行い²⁾, 肝に明らかな hepatoma が出現する以前, すなわち 2-AAF 投与後 5~6 ヶ月の late stage に当たる時期の hyperplastic nodule (HN) (ヒト adenomatous hyperplasia³⁾⁴⁾に酷似)の性状を検討し, さらにこれを脾内へ移植して観察することにより, 化学発癌モデルにおける早期肝細胞癌の位置づけを行った。

方 法

10週齢 Wistar 系雄性ラットに化学発癌物質である 2-AAF を 0.025% 含有する MF 飼料 (オリエンタル酵母社製) を 30~35 日間摂取させた後, 1 週間の基礎食投与と 3 週間の 2-AAF 含有食投与を反復し, 5~6 カ月経過した時点の肝に存在する結節を late stage HN とした。

結節の性状は経門脈的肝灌流前後に肉眼的に大きさ・硬さ・色調を観察し, 組織学的には H&E・ γ -GTP 染色⁵⁾のほか Bromodeoxyuridine 染色 (BrdU)⁶⁾を施した。BrdU 染色は犠牲死の 1 時間前に BrdU 50mg/kg を静注したうえで組織を取り出し, 抗 BrdU 抗体を用いて avidin-biotin-peroxidase complex 法によって染色し, 1000 個以上の肝細胞中で BrdU を核内に取り込んだ肝細胞の割合を Labeling Index (L. I) とした。さらに肝を Seglen ら⁷⁾の方法に準じ, 経門脈的にコラゲナーゼ灌流した後, 結節部分を核出し, 各結節ごとに細切, ガーゼ濾過し, Hanks 液に混じり 50G 2 分で遠心し, その 0.1~0.2ml を同系ラットの脾へ直接注入することにより移植した。一部は凍害防止剤 (DMSO) を入れ凍結保存し, これを解凍後, detergent-trypsin 法にて処理しプロピジウムヨードで DNA 染色をして CS-20 セルソータを用いて 3 万個の肝細胞核の DNA 量を測定しヒストグラムを求めた⁸⁾。

結 果

開腹時の肉眼的所見としては, 肝葉は萎縮と肥大が混在し, 線維化により凹凸不整な肝表面に直径 3~8 mm の表面平滑な球状結節が種々の程度の突出をもって 10~20 個認められた。これは横隔葉の下縁から下面

索引用語: Early hepatocellular carcinoma, Hepatocarcinogenesis, Adenomatous hyperplasia, Hyperplastic nodule

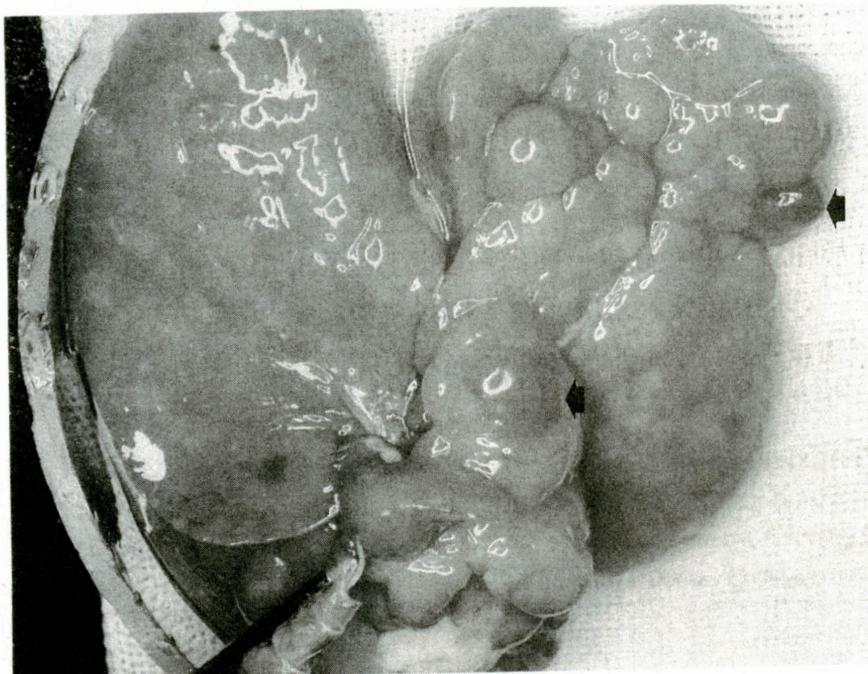


図1 経門脈的肝灌流後
結節の色調から早期の肝癌を識別した

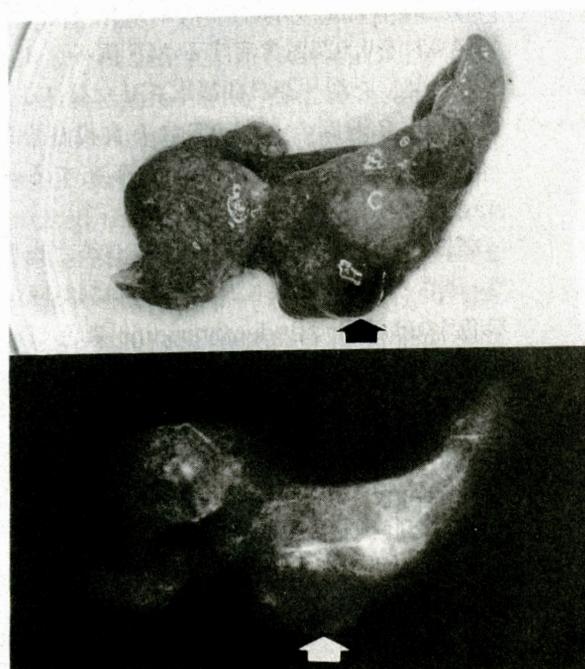


図2 経門脈的バリウム造影
色調の差は、肝癌に門脈血行の閉塞があることに起因した



黄白色調の結節 (左下)



赤色調の結節 (左2/3)

図3 H. E 染色 (×40)

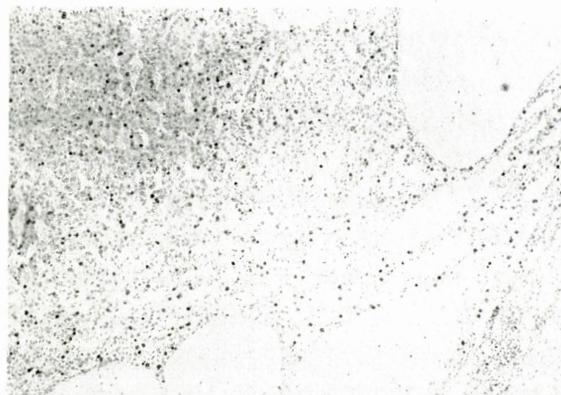
に多く存在する傾向があったが、結節の色調や硬度は周囲肝組織と同様であり、結節どうしも識別は不可能だった。ところが経門脈的肝灌流後には、多くの結節は血液がフラッシュされることにより黄白色になるのに対し、約1割の結節は赤色を保った(図1)。すなわ

ち、色調の変化で2種類に識別できた。これは経門脈的バリウム造影により門脈枝の閉塞に起因すると考えられた(図2)。

組織学的には、HN内の肝細胞の密度はやや高く、異型度の低いほぼ均一の肝細胞で構成され、索状構造

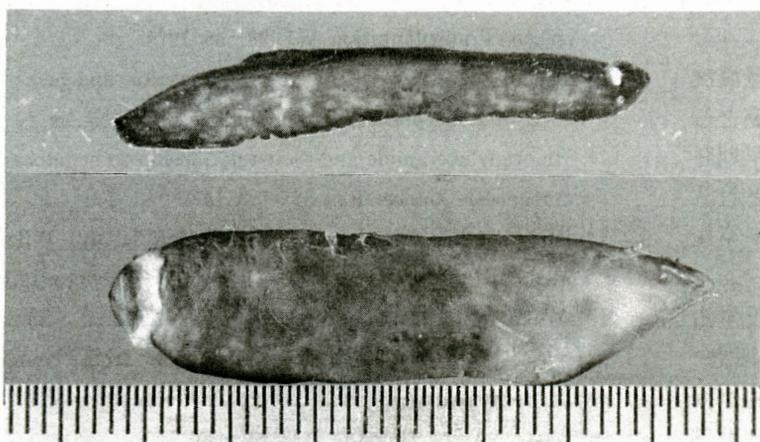


黄白色調の結節

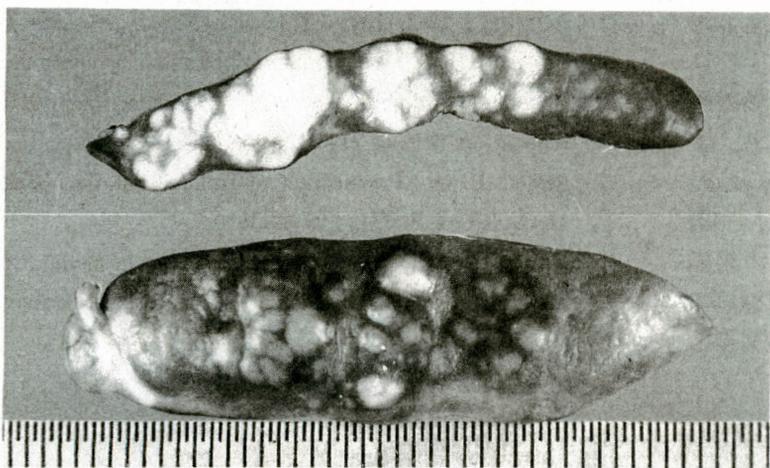


赤色調の結節

図4 BrdU染色(×40)核が濃染しているのがS期細胞



黄白色調の結節の肝細胞を移植しても生着はするが結節は形成しなかった。



赤色調の結節の肝細胞を移植すると、急速に増殖し肉眼的に認められる結節を形成した。

図5 移植後3週の脾剖面・表面

を保っているがその厚さは不均一で、Edmondson I型に近い部分もみられた。偽腺管などの構造異型は赤色調のHNの方に多く見出された。また、HNは被膜を持つことが多く、周囲肝組織を圧排し、なかに明瞭なグリソン鞘をもたなかった(図3)。 γ -GTP染色ではまだらに不均一に染色されるのも含めると、黄白色調も赤色調のHNも共に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、黄白色のHNはL.Iが $0.6 \pm 0.3\%$ と低く、赤色調HNのL.Iはすべてあるいは少なくともその一部において $5.5 \pm 0.3\%$ と高値であった(図4)。一方、HNの周囲の肝組織のL.Iは0.1%以下であった。脾内移植後の変化としては、赤色調HNの場合は、移植後3~4週で直径数mm以上の結節が多数形成され、組織学的にも癌であることが証明されたが、黄白色調HNを移植した場合は肉眼的に認められる結節は形成されずマイクロレベルの生着にとどまり、組織学的にも癌は証明されなかった(図5, 6)。ヒストグラムでは両HNとも全例が2C超優位のDiploidであり、周囲肝組織と同様であった。

考 察

本モデルにおけるlate stage HNのうち、門脈灌流で赤色調を帯びたHNは、移植することにより癌として増殖し、ラットを死に至らしめたことから早期肝細胞癌と位置づけられる。すなわち、前癌病変と目されていたlate stage HNのうち実際に癌ポテンシャルを持っていたのは1割にすぎないことになる。

この2種類のlate stage HNを形態的に比較すると、hepatomaになる方のHNはcellularityや細胞・構造異型度が相対的に高いけれども、他方と一線を画すほどではなかった。しかしBrdU染色によるS期細胞の標識ではLabeling Index (L. I)が他方に比し有意に高値を示した。 γ -GTP染色では両者とも陽性であり、flow cytometryを用いた核DNA ploidy patternの検索でも共にdiploidであった。

これより、早期の高分化型肝細胞癌は組織形態やploidy patternだけでは診断できないと思われる。また、L.Iについてもhyperplastic fociやearly stage HNにも極めて高値を示す部分もあることから、一過性のregenerativeな増殖と腫瘍の自律的増殖の組織学的な鑑別には困難を伴うと思われる。結局、腫瘍の増大の経緯を考慮したうへ、組織学的には構造異型と

L. Iの両面から慎重に悪性を判定すべきと考える。

おわりに

もちろんラット肝化学発癌とヒト肝発癌を同一視はできないが、組織学的にも発癌過程からみてもヒトにおけるadenomatous hyperplasiaがラットのlate stage HNに相似すると考えられる。そこで、late stage HNから早期HCCに至る構造異型などの形態変化は連続的なものであって一線を画すことはできなかった点と、late stage HNのごく一部だけがHCCに進展するポテンシャルを有していた点は、ヒトにおけるadenomatous hyperplasiaと早期高分化型HCCとの関係を論ずるうえで重要な参考となろう。加えて両者の鑑別においてL. Iや門脈血行が有力な手がかりを与える可能性も示唆された。

文 献

- 1) Mito, M., Ebata, H., Kusano, M., et al.: Morphology and function of isolated hepatocytes trasplanted into rat spleen. *Transplantation* 28: 499-505, 1979
- 2) Teebor, G. W., F. F. Becker: Regegression and persistence of hyperplastic hepatic nodules induced by N-2-fluorenylacetamide and their relationship to hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 31: 1-3, 1971
- 3) Peters, R. L.: *Hepatocellular carcinoma*. 117-121, Wiley Medical Puplications, New York, Sydney, Toronto, 1976
- 4) 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
- 5) Rutenburg, A. M., et al.: Histochemical and Ultrastructural Demonstration of γ -Glutamyl Transpeptidase Activity. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 517-526, 1969
- 6) Gratzner, H. G. Monoclonal antibody to 5-bromo-and-5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-476, 1982
- 7) Seglen, P. O.: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 13: 29-83, 1976
- 8) Vindelov, LL., et al.: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flowcytometric DNA analysis. *Cytometry* 3: 323-327, 1983

Early Hepatocellular carcinoma from the view point of chemically induced hepatocarcinogenesis

Kazuhiko Onodera, Hidetaka Ebata*, Michio Mito* Naoki Kamii,
Masahiro Takahashi, Henryk Witmanowski, Jun-ichi Meguro, Kazutaka Kukita,
Motoki Yonekawa, Akio Kawamura,

Department of Surgery, Sapporo Hokuyu Hospital, Artificial Organ & Transplantation Hospital,

*Second Department of Surgery, Asahikawa Medical College

Hyperplastic nodules were induced in Wistar rats by the modified procedure of Teebor and Becker. Nodules harvested at 22-24 weeks after initiation were isolated, diced, and transplanted into the spleen of normal rats, and observed for periods up to three months. Only 10% of animals developed hepatocellular carcinoma (HCC). The nodules which developed HCC can be distinguished from other nodules which didn't develop HCC by liver

perfusion via portal vein. The former were reddish after liver perfusion because of obstruction of portal branch, and histologically proved to include structural atypia with increasing proliferative activity. But there is no difference in γ -GTP stain and DNA ploidy pattern between them. And it is rather difficult to distinguish them only by H-E stain microscopically.