

# AMCoR

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

モデル動物利用マニュアル（書籍）（2012）【疾患モデルの作成と利用…がん】:331～345.

第3章 消化器系  
第2節 肝臓  
第2項 誘発モデル

小川 勝洋

## 第2節 肝 臓

# 第2項 誘発モデル

### 1. はじめに

動物を用いる肝発がんモデルは、肝発がんメカニズムの解明やリスク因子の評価などの研究に有効であり、そのメリットとしては、

- 1) 比較的短期間で肝がんを誘発でき、かつ肝臓サイズは人の1/100から1/1000であるために時間的、スペース的に絞り込んで研究できること。
- 2) 肝発がん過程の初期から全過程を研究できること。
- 3) 様々な肝発がんモデルの中から研究目的に沿ったものを選択できること。
- 4) 肝病変の数や大きさを測定することにより発がんリスク因子を数量的に評価できること。
- 5) 肝発がんに対する修飾因子を解析できること。
- 6) 新鮮な材料が入手しやすいこと。
- 7) 肝腫瘍から比較的細胞株が得られやすいため *in vivo* と *in vitro* の研究を平行してできること。
- 8) 肝発がん感受性に関して遺伝学的解析ができること。

等があげられる。肝がんを誘発する方法としては、化学発がん物質を投与する方法、がん遺伝子やウイルス遺伝子などを組み込んだ遺伝子改変動物を用いる方法、およびそれらを組み合わせる方法があるが、この本項では主に化学物質を投与して誘発する肝発がんモデルについて述べる。

### 2. 化学物質投与による肝発がんモデル

#### 2.1 動物種、系統、性、年齢

肝発がん実験には我が国では伝統的にラットが用いられてきたが、マウスは小型であるため一定スペースに多数飼育できること、遺伝子改変が容易なこと、遺伝子情報が豊富なことなどにより近年では特に多く用いられている。一方、ラットモデルは研究の蓄積があるほかに、肝臓が大型であるために多量の組織材料が必要な場合や、手術手技を必要とする研究に有利である。肝発がん物質にはラットとマウスに共通のものも多いが、一方のみ強い発がん性を発揮するものもある。例えば、2-acetylaminofluorene (2-AAF) を食餌中に混入して投与する方法では、ラットでは有効であるが、マウスでは発がん性は低い<sup>1)</sup>。一方、diethylnitrosamine (DEN) を新生仔マウスに投与すると約1年後に高率に肝がんが誘発されるが、同じ処置をラットに加えても前がん病変は生じるものの肝がんまで発展する頻度は低い<sup>2), 3)</sup>。また、同じ動物種でも系統によって肝発がん感受性が異なり、例えばラットではF344系は感受性が高く、Sprague Dawley系は低く<sup>4)</sup>、マウスではC3H/HeJ, B6C3F1系は高く、BALBc, AKR系では低い<sup>5)</sup>。このような動物種や系統差は主に肝臓における薬物代謝の違いによると考えられており<sup>1)</sup>、肝発がんに関わる背景遺伝子の遺伝学的解析に利用されている<sup>5)</sup>。ヒトでは肝がんは男性に多く、女性の2-3倍頻度が高いが、この違いは実験動物でも同様である<sup>6), 7)</sup>。一方、動物の年齢は発がん感受性との関連が深く、

特に胎仔期後期および新生仔期には感受性が高い。その理由としては、増殖している肝細胞は肝発がん物質による DNA 障害が突然変異に繋がりやすいことと、この時期に薬物代謝酵素が発達し始めることが関係すると考えられている<sup>2)</sup>。また、成熟した動物では部分肝切除後の肝再生中に発がん処理を行うと高いイニシエーション効果が得られる<sup>8)</sup>。一方、高齢化動物では後述のように正常肝細胞の増殖能が低下して前がん肝細胞の増殖が優位になり、そこに増殖刺激が加わると前がん肝細胞が選択的に増殖する<sup>9)</sup>。

## 2.2 肝発がん物質

佐々木・吉田により o-aminoazotoluene の肝発がん性が証明されて以来、数多くの肝発がん物質が発見されている。肝がんを誘発するためにはそれらを食餌中または飲水中に加えて投与する方法や腹腔内または皮下に注射する方法が行われる。肝臓は解毒代謝の中心であるため外来性、内因性の毒性物質は肝臓に集積して代謝される。肝発がん物質の多くは肝細胞内で酵素的に代謝される過程で活性化して中間代謝物が生じ、それらが細胞内高分子と結合して障害する<sup>1)</sup>。肝発がん物質は遺伝毒性物質 (genotoxic substances) と非遺伝毒性物質 (nongenotoxic substances) に大別される<sup>10)</sup>。遺伝毒性物質はイニシエート細胞 (initiated cell) の誕生ならびにそれらが肝がんに進展することに関連する遺伝子変異を誘発し、非遺伝毒性物質は前がん肝細胞の増殖を促進すると考えられているが、両者ともに肝細胞に対する直接作用のほかに、代謝過程で生じる活性酸素 (reactive oxygen species : ROS) が DNA を障害して遺伝子変異を誘発することも知られている<sup>11)</sup>。一方、肝発がん物質はほとんどのものは肝障害作用を有しており、その結果生じる肝再生刺激が前がん肝細胞の増殖を促進する。肝発がん物質の多くはイニシエーション作用とプロモーション作用の両方を有しており、そ

の程度は個々の肝発がん物質によって異なる。したがって、先にイニシエーション効果の高い発がん物質を投与し、その後プロモーション効果の高い物質を連続投与すると効率よく肝発がんを誘導できる。

## 3. 発がん過程

### 3.1 組織発生

肝発がん剤の処置を開始してから肝がんの発生に至るまでには通常 10 ヶ月から 2 年の期間を要する。この間、肝臓内では複雑な組織および細胞変化が起こっており、それらは動物種、発がん剤の種類、濃度、投与方法などにより異なるが、共通の変化が見られる。肝発がんに関連する最初の形態変化は過形成巣 (hyperplastic foci) の出現で、これらは通常好塩基性肝細胞からなるが (図 1)、細胞質にグリコーゲンや中性脂肪を蓄積しているために淡明に見える場合や滑面小胞体が発達しているために好酸性を示すこともある。これらの病変は軽度に周囲圧排性を示すが、細胞配列は正常肝組織と大きく変わらない。これらの病変はイニシエート細胞ないしはそれに近い細胞から成ると考えられ、最も初期の前がん病変である。高齢化動物の肝臓ではしばしば同様の病変が見られることから正常の代謝過程で生じる ROS のような内的因子によっても自然発生すると考えられ<sup>12)</sup>、またマウスでは系統により肝がんが自然発生することから特定の遺伝子背景のもとでは肝がんまでに発展する<sup>5)</sup>。過形成巣は肝発がん剤やプロモーター処置により増殖して過形成結節 (hyperplastic nodule) を形成する。過形成結節は周囲圧排性を示し、肝細胞素が多列化するが、初期の段階の過形成結節は発がん剤やプロモーション処置を中止すると多くのものは過形成巣ないしは正常肝組織に近い性質を示すようになり、一部のもののみが過

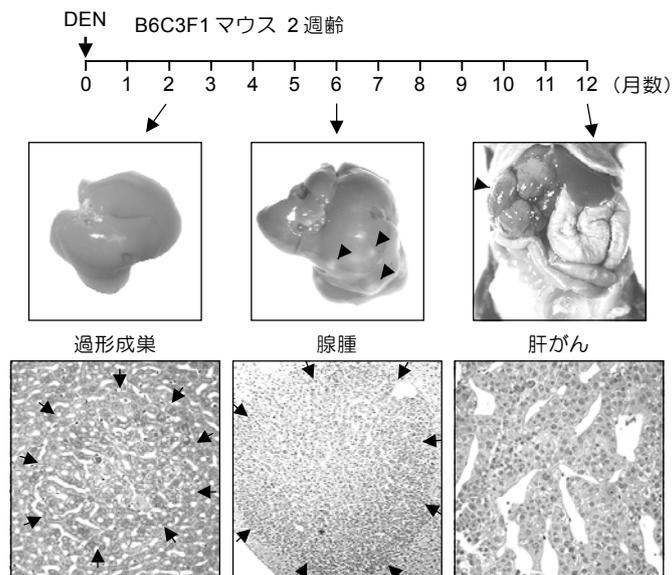


図1 新生仔雄性 B6C3F1 マウスのDEN(5 $\mu$ g/g 体重)1回投与により誘発された肝病変

左：過形成巣(DEN 投与後約2ヵ月目)。中央：肝腺腫(DEN 投与後約6ヵ月)。  
右：肝がん(DEN 投与後約12ヵ月)。

形成結節の性質を維持する<sup>13), 14)</sup>。しかし、過形成結節は決して消失することなく、肝組織内に存在しつづけて再び増殖刺激が加わると増殖を開始する。過形成結節の一部は自律増殖能をもつアデノーマ(adenoma)に進展する。初期の微小肝がんはアデノーマのなかに見つかることが多く、肝がんがアデノーマを母地として発生することを示している(図2)。

### 3.2 前がん肝細胞の特性

前がん肝細胞では遺伝子発現が正常肝細胞と異なっており、これらには正常よりも高く発現しているものと低く発現しているものがあり、薬物代謝、エネルギー代謝、ライソゾーム機能、細胞間コミュニケーション、鉄代謝、細胞周期に関わるものなど様々なものが含まれる<sup>15)</sup>。これらの変化はごく初期の過形成巣から見られることから前がん肝細胞の誕生の時点から起こっているものと

思われる<sup>16)</sup>。また、これらの遺伝子発現異常は肝がんにも共通しており、発がん過程を通して持続する<sup>15)</sup>。cDNAアレイのような網羅的方法を用いて前がん肝細胞と正常肝細胞の遺伝子発現を比較することにより非常にたくさんの遺伝子で発現異常を示すことが明らかになった<sup>17)-19)</sup>。それらの機能的な意義は多くものについては不明であるが、前がん細胞の増殖・生存に関わるほかに、後述のようにパラクリン因子として前がん肝病変内の新たな微小環境の形成に関わるものも含まれる。

### 3.3 背景肝の組織変化

肝発がん物質は肝障害作用を持つことから、背景肝組織に様々な細胞および組織変化が起こる。比較的共通に見られる変化は巨核化(megakaryocytosis)で(図3)、DNA複製後の細胞分裂障害によると考えられている。オーバル細胞(oval cell)の増殖も比較的共通に見られる変化で(図4)、こ

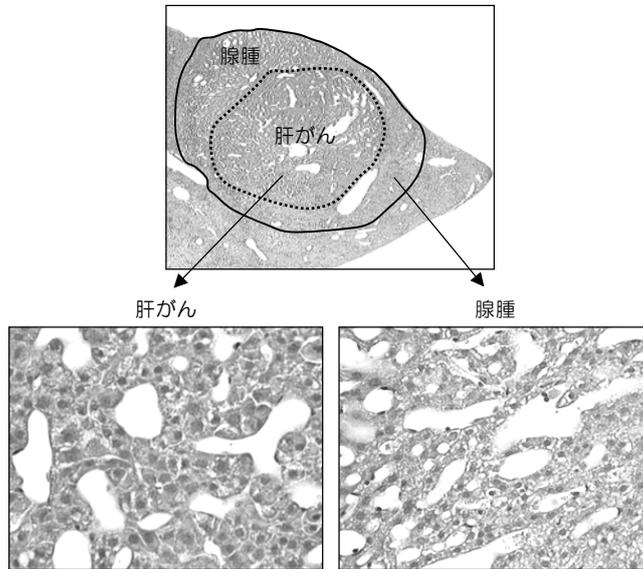


図2 DEN誘発マウス肝腺腫(右)内に観察された微小肝がん(左)

ごく初期の微小肝がんはしばしば肝腺腫内に観察される。

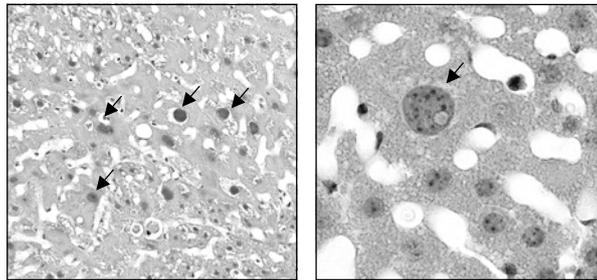


図3 巨核化

チオアセタミド処理肝に見られた巨大核(矢印)を示す肝細胞。

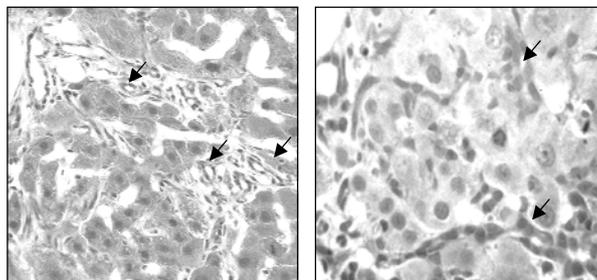


図4 オーバル細胞

オーバル細胞(矢印)は塩基好性小型核を有し、肝細胞索に沿って肝細胞の間を埋めるように増殖し、微小腺管構造を示す。

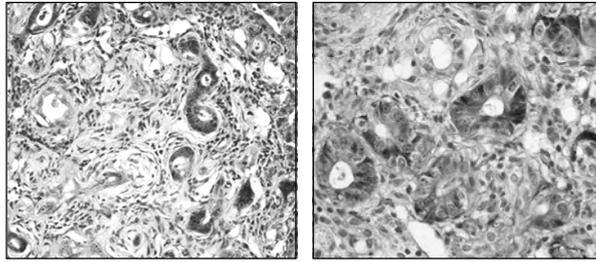


図5 胆管線維症

浮腫性間質と大型異型核を示す胆管上皮からなる。

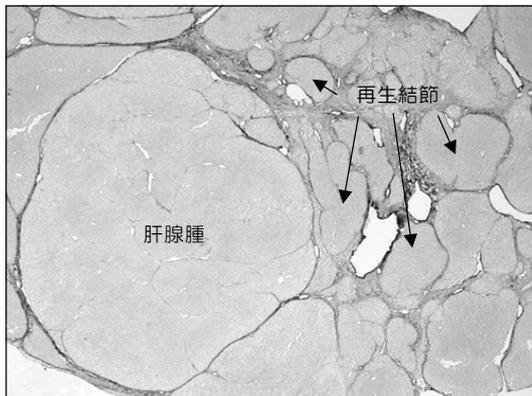


図6 チオアセタミド処理による肝硬変症と肝腺腫

結合織の隔壁に囲まれた様々な大きさの再生結節とともに見られた比較的大型の肝腺腫。

れらは胆管上皮ないしは肝幹細胞に由来するとされている。またオーバル細胞からは異型胆管上皮と浮腫性間質からなる胆管線維症(cholangiofibrosis)と呼ばれる病変が生じ(図5)、胆管上皮がんの母地になると考えられている。一方、チオアセタミド(thioacetamide)や四塩化炭素( $CCl_4$ )を投与方法ではヒトの肝硬変に類似した偽小葉が形成される(図6)。また、コリン(choline)欠乏食を投与方法では脂肪肝が起こり、やがて脂肪性肝炎・肝硬変に進展する。慢性肝障害は肝発がんにおいて重要であるが、強い肝障害を伴わずに肝がんが発生する場合もある。新生仔マウスにDENを1回

投与方法では背景肝はほぼ正常なままで肝発がんに至る(図1)<sup>2)</sup>。この場合には後述のように加齢に伴う正常肝細胞の増殖能の低下が前がん肝細胞の増殖を優位にし、生理的な肝の新陳代謝刺激が前がん肝細胞の増殖を促すものと思われる。

### 3.4 肝発がんのメカニズム

肝発がん過程ではまれな頻度で誕生する特異な性質を持つ前がん肝細胞が増殖して結節性病変を形成し、長い時間をかけて多段階的に肝がんに進展する。肝発がん過程では以下の現象が共通に起こると考えられる(図7)。

- 1) 正常肝細胞から何らかの突然変異により高い増殖・生存能を持つ前がん肝細胞が生じ、それらが多段階的に肝がん細胞に進展する。

[変異(Transformation)＝突然変異による高い増殖・生存能の獲得]

- 2) 慢性肝障害により背景肝の再生力が低下した状態で前がん肝細胞が選択的に生き残って増殖し、結節性の前がん病変を形成する。

[選択(Selection)＝選択的増殖・生存]

- 3) 前がん肝細胞のユニークな遺伝子発現により前がん病変内に特殊な微小環境が形成され、前がん肝細胞がその中に隔離されて増殖・生存をさらに有利にする。

[隔離(Isolation)＝微小環境形成]

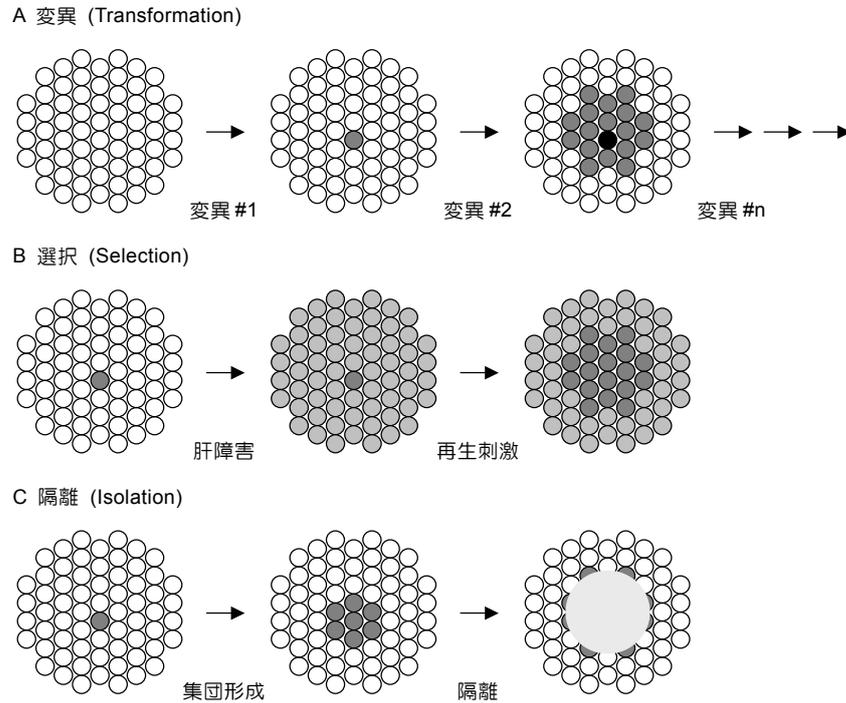


図7 肝発がんのメカニズム

A: 変異 (Transformation)

まれな頻度で生じた前がん肝細胞 (グレー) が変異を積み重ねて段階的に肝がん細胞に進展する。

B: 選択 (Selection)

周囲の正常肝組織が障害を受けて再生力が低下すると、前がん肝細胞の増殖・生存が優位となり、そこに増殖刺激を受けると選択的に生き残って増殖することができる。

C: 隔離 (Isolation)

前がん肝細胞が集団になるとその内部に正常肝組織から隔離された新たな微小環境を形成する。

したがって、変異、選択、隔離の3つの要素の重なりが、肝発がん過程の進展に重要と考えられる<sup>15)</sup>。

は、それらの細胞の高い増殖・生存能の基礎となっていると考えられ、肝発がんのメカニズムと深く関わっている。

#### 4. 肝発がんモデルの利用

動物を用いる肝発がんモデルは肝発がんに関わる様々の課題の研究に利用されているが、以下にその一端を紹介する。

##### 4.1 肝発がんに関わるシグナル経路の解析

肝前がん病細胞で活性化しているシグナル経路

##### (1) インスリン様増殖因子 (insulin like growth factor : IGF) 経路

肝発がん過程では IGF-II が発現しており、オートクライン因子として肝腫瘍細胞の増殖・生存を活性化する<sup>20)-22)</sup>。肝腫瘍細胞における IGF-II 発現のメカニズムは、胎仔肝細胞で働く IGF-II 遺伝子プロモーターの活性化による<sup>21)</sup>。

一方、IGF-II レセプター (IGF-II R) は IGF-II を細胞内に取り込んでライソゾーム経路により分

解する一方、TGF- $\beta$ 前駆体(pro-TGF- $\beta$ )を取り込んでライソゾーム経路により活性化する。したがって、IGF-IIRの機能低下はIGF-IIの分解低下をきたしてIGF-IIの発現量が増加するとともに、TGF- $\beta$ の低下をきたして肝発がんを促進する。肝がんではIGF-IIR遺伝子座を含む染色体領域でloss of heterozygosity(LOH)が観察され、残存するIGF-IIR遺伝子で不活化変異が起こることが報告されているが<sup>23)</sup>、これについては一致した結果が得られていない。

IGF-I, IIは血中では大部分はIGF結合タンパク(IGF-binding protein 1-6: IGF-BP1-6)と結合しており、それによりIGF-1Rへの結合が亢進する場合と低下する場合がある。このうちIGF-BP3はIGF-I, IIに結合して肝細胞のIGF-1RへのI結合を抑制するため、IGF-BP3の低下によりIGF-I, IIがレセプターに結合しやすくなる。実際に肝がんではしばしばIGF-BP3発現が低下していることが報告されているが<sup>24)</sup>、前がん肝細胞については不明である。

## (2) $\beta$ -カテニン( $\beta$ -catenin)経路

$\beta$ -カテニンはTCF-4と複合体を形成して細胞増殖、生存などに関わる様々な遺伝子を転写活性化する。肝がんではしばしば $\beta$ -カテニンの発現が亢進しており、細胞質および核に陽性となり、マウス肝発がん過程では肝腫瘍細胞の $\beta$ -カテニンの核陽性像とcyclin D発現が相関する<sup>25)</sup>。 $\beta$ -カテニンが高発現する理由の1つは $\beta$ -カテニンのN-末端側のアミノ酸に変異が起こるためにGSK-3 $\beta$ によるリン酸化を受けにくくなり、分解が低下することによる<sup>26), 27)</sup>。マウス肝発がん過程では $\beta$ -カテニン突然変異の頻度は発がん処置により異なり、特に新生仔マウスにDEN処置をしたのちにフェノバルビタールを連続投与する方法では好酸性細胞からなる肝病変が形成され、 $\beta$ -カテニン変異の頻度が高い<sup>28), 29)</sup>。

マウス肝がんではしばしばH-ras遺伝子codon

61の変異は見られるが、変異H-rasトランスジェニック(Tg)マウスでは自然発生肝がんはほとんど見られない。一方、肝細胞特異的に $\beta$ -カテニン遺伝子の活性化変異を持つTgマウスでは肝腫瘍の頻度は低いが、H-rasと $\beta$ -カテニンの両方の変異を持つTgマウスでは高頻度に肝がんが発生することが報告されている<sup>30)</sup>。

## (3) Transforming Growth Factor- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )/EGFレセプター(EGFR)経路

TGF- $\alpha$ はラットおよびマウスの前がん肝病変および肝がん発現が亢進している<sup>31)-33)</sup>。また、ラット前がん肝細胞ではプロTGF- $\alpha$ (pro-TGF- $\alpha$ )およびEGFレセプターの発現が亢進しており、pro-TGF- $\alpha$ は隣接する細胞のEGFレセプターに結合して増殖シグナルを伝達する<sup>32)</sup>。そのようなメカニズムは特に肝増殖刺激が加わったときに活性化し、隣接細胞同士が互いにリガンドとレセプターを発現しあうことによって選択的に増殖することができる。

マウス肝前がん細胞および肝がん細胞ではTGF- $\alpha$ /EGFレセプター経路やIGF-II/IGF-1レセプター経路が活性化するとその下流でPI3K-Akt-mTOR経路が活性化してタンパク合成が亢進し、特にhypoxia inducible factor- $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )が高発現する<sup>34)</sup>。一方、HIF-1の活性化によりTGF- $\alpha$ 、IGF-IIなどの増殖因子の発現が上昇するため、それらがそれぞれのレセプターを介してオートクラインループ(autocrine loop)が成立して高い増殖・生存能を維持することができる。

## (4) サイトカイン経路

IL-6-Janusキナーゼ(Janus kinase: JAK)-Stat3経路は肝発がんとの関連が深く、マウスでは遺伝子改変によりこの経路を持続的に活性化すると肝発がんが促進し、抑制すると低下する<sup>35), 36)</sup>。新生仔マウスにDENを投与して誘発する肝発がん過程では背景肝組織は炎症や肝障害は見られない

が、そのような状態でも前がん肝細胞では Stat3 が恒常的に活性化している<sup>37)</sup>。したがって、そこに慢性肝障害が加わるとサイトカインや増殖因子により Stat3 がさらに活性化して高い増殖・生存能を発揮するものと思われる。

#### (5) 細胞周期タンパク

正常肝細胞の細胞周期は G0 期にあるが、マウス前がん肝細胞では G1, S 期に発現する cyclin D が細胞質に恒常的に発現している<sup>38)</sup>。一方、前がん肝病変を有するマウスに 2/3 部分肝切除により増殖刺激を加えると、正常肝細胞に比べて前がん肝細胞の増殖はより早くかつ強く起こり、より長く持続する。このとき、正常肝細胞では増殖に伴って cyclin D が核内に出現し、肝再生が終了すると消失するが、前がん肝細胞では cyclin D は細胞質から核内に移行し、増殖が収まるとふたたび細胞質に局在する。cyclin D の核内移行には PI3K-Akt 経路が深く関わっており、この経路を抑制すると cyclin D の核内移行が抑制されて細胞増殖が強く抑えられる。

### 4.2 肝発がんリスク要因の解析

#### (1) 背景肝の慢性障害、線維化、脂肪化

肝がんはヒトでは B 型肝炎、C 型肝炎、アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪肝など慢性肝障害に伴って発生することから炎症環境は肝発がん重要である。チオアセタマイド、四塩化炭素などを投与する方法は慢性肝炎、肝硬変のモデルとなる。また、ヒト型変異  $\alpha$ -1 アンチトリプシン ( $\alpha$ -1 antitrypsin) Tg マウス<sup>39)</sup>、TGF- $\beta$  Tg マウス<sup>40)</sup>、NF $\kappa$ B ノックアウト (KO) マウス<sup>41), 42)</sup> では慢性肝障害、肝線維化のうちに肝がんが発生するが、Kupffer 細胞によって産生されるサイトカインおよび ROS の産生が重要な働きをする。

一方、ラットにコリン欠乏食を投与する方法では脂肪肝から脂肪性肝炎・肝硬変に進展して肝

がんが発生する<sup>43)</sup>。また、PDGF Tg マウス<sup>44)</sup>、PTEN (phosphatase homologue and tesine homolog) KO マウス<sup>45)</sup> ではヒトの非アルコール性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis : NASH) に類似した肝病変が生じ、長期飼育すると肝がんが発生することが報告されている。

#### (2) 背景肝の再生能の低下

Solt & Farber 法 (図 8)<sup>46)</sup> では DEN によって誘発された数個の前がん肝細胞の集団が 2/3 部分肝切除後に急速に増殖してわずか 2-3 週間の間に数十万から 100 万個の集団に増大する。この理由は、正常肝細胞の増殖は 2-AAF の毒性によって強く抑えられているのに対して前がん肝細胞は 2-AAF の毒性に耐性であるために部分肝切除による増殖刺激に反応して選択的に増殖できるためである。

DRH ラットは Donryu ラットに 3'-Me-DAB 肝発がん処理をして耐性を示したもの同士の選択交配を繰り返すことによって確立されたもので、さまざまな肝発がん剤に対して強い耐性を示す<sup>47)</sup>。DRH ラットに Solt & Farber 法の処置を行うと通常ラットに比べて前がん肝病変の数ならびにサイズが小さい<sup>48)</sup>。その理由は、主に DRH 肝細胞は 2-AAF の毒性に耐性であるために 2-AAF 処理による肝障害の程度が低く、前がん肝細胞の選択的増殖が起こりにくいことによる<sup>49)</sup>。また、DRH ラット肝細胞は正常ラット肝細胞と異なる様々な性質を示し、初代培養下でストレスに対して強い耐性を示す<sup>50), 51)</sup>。

肝再生能は加齢とともに低下し、2/3 部分肝切除後の肝細胞の増殖は、老化ラットでは若年ラットに比べて遅れて開始し、増殖のピークが低く、遷延化する<sup>52)</sup>。この理由は肝細胞自身の増殖能が低下にすることによる<sup>53)</sup>。しかし、前がん肝細胞は老化に耐性であるために老化動物でも高い増殖能を維持しており、増殖刺激に反応して選択的に増殖することができる<sup>9)</sup>。

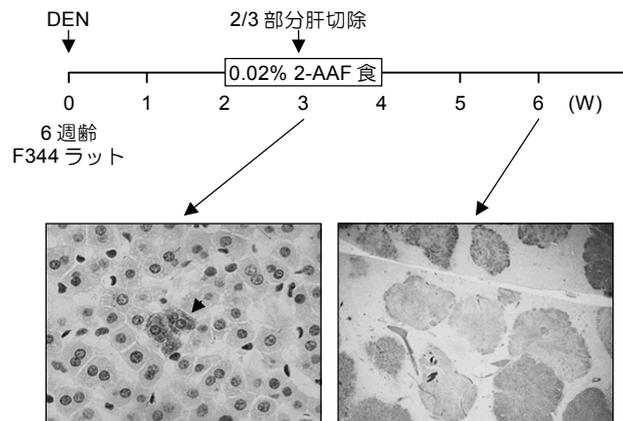


図8 Solt & Farber 法

6週齢雄性 F344 ラットに DEN を 1 回投与し、2 週目から 2 週間 0.02 % 2-AAF 食を投与し、3 週目に 2/3 部分肝切除を行う。部分肝切除時には数個であった前癌肝細胞(左)は部分肝切除後 3 週目には数十万個から 100 万個の細胞集団(右)となる。GST-P 免疫染色。

#### 4.3 パラクライン因子の解析

正常の肝組織環境は、実質細胞である肝細胞と非実質細胞(Kupffer 細胞, 肝星細胞, 類洞内皮細胞など)との相互作用により維持されている。一方, 肝腫瘍内では新たな微小環境が形成され, 肝腫瘍細胞は正常肝組織から隔離されることにより高い増殖・生存能を発揮できると考えられる<sup>54)</sup>。

神経成長因子 (nerve growth factor : NGF) はマウス肝発がん過程では初期から前がん肝細胞に発現しているが, そのレセプターである TrkA, p75<sup>NTR</sup> は発現していない<sup>55)</sup>。TrkA は主に肝動脈の壁の平滑筋に発現しており, また肝腫瘍の周囲では特に動脈に沿って神経繊維が発達している。したがって, NGF は動脈平滑筋に直接作用するほかに, 神経細胞が産生する VEGF などの血管新生因子を介して腫瘍動脈の発達に関わっている可能性が考えられる。一方, p75<sup>NTR</sup> は肝星細胞に発現しているが<sup>56)</sup>, 肝星細胞は肝発がんを抑制する TGF- $\beta$  を産生するために肝腫瘍細胞は NGF により p75<sup>NTR</sup> を介して肝星細胞のアポトーシスを誘導して TGF- $\beta$  の影響を免れているものと思われる。

IL-1 は肝細胞の増殖に対して抑制的に働き, 肝再生時には肝細胞の増殖を停止させる<sup>57)</sup>。マウス前がん肝細胞および肝がん細胞では IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) の発現が亢進しており, IL-1Ra の発現量と細胞増殖活性は相関する<sup>58)</sup>。IL-1Ra は IL-1 レセプターの活性化を抑制することから, 肝腫瘍細胞は IL-1Ra を産生することにより IL-1 の増殖抑制作用から免れているものと思われる。

#### 4.4 肝幹細胞の役割

肝発がん過程に出現するオーバル細胞の運命は発がん剤の種類や投与方法によって異なる。ラットに 0.06 % 3'-Me-DAB 食を投与した場合には小型肝細胞を経て肝細胞に分化し, 障害された肝組織を再生する<sup>59)</sup>。一方, 0.02 % 2-AAF 食を投与した場合にはオーバル細胞は過形成結節が形成される時期になると減少・消失する<sup>60)</sup>。オーバル細胞が過形成巣のように肝がんの前がん細胞となるか否かは不明であるが, オーバル細胞由来の細胞株にヒトの活性化 H-ras 遺伝子を発現させた

表1 化学発がん剤を用いる代表的な肝発がんモデル

動物種	発がん剤	投与方法と容量	特徴	文献
マウス	DEN	5 $\mu$ g/g 体重, 生後 2週 以内に 1回 腹腔内投与	背景肝はほぼ正常で肝発がん	69
	Aflatoxin B1	6 $\mu$ g/g 体重, 生後 1週 以内に 1回 腹腔内投与	背景肝はほぼ正常で肝発がん	70
	Peroxisome proliferators	0.05 - 0.1 % 食餌中に混入し, 連続投与	肝肥大, ペロキシソーム増加	71
	CCl <sub>4</sub>	2,500 mg/kg 胃内へ週 5日 投与	肝繊維化	72
	コリン欠乏食	コリン欠乏食連続投与	脂肪性肝炎・肝硬変を背景に肝発がん	73
	Thioacetamide	0.02 - 0.05 % 飲水に混入または腹腔内投与	肝繊維化	74
ラット	DEN/2-AAF (Solt & Farber 法)	DEN 5 - 200 mg/kg 腹腔内投与, 0.02 % 2-AAF 食 2週間投与, 3週目に 2/3 部分肝切除	前がん結節の誘導が早い	46
	DEN/phenobarbital (PB)	DEN 10 $\mu$ g/g 腹腔内投与, 0.05 % PB 食連続投与	肝腫大著明	62
	2-AAF	0.02 % 食餌中に混入し, 連続投与	肝繊維化, オーバル細胞増殖が強い	75
	3'-Me-DAB	0.06 % 食餌中に混入し, 連続投与	肝繊維化, オーバル細胞増殖が強い	75
	Peroxisome proliferators	0.05 - 0.1 % 食餌中に混入し, 連続投与	肝肥大, ペロキシソーム増加	71
	Thioacetamide	0.02 - 0.05 % 飲水に混入または腹腔内投与	肝繊維化・肝硬変を背景に肝発がん	76
	コリン欠乏食	コリン欠乏食連続投与	脂肪性肝炎・肝硬変を背景に肝発がん	43

細胞をラットに移植すると肝がん類似した腫瘍を形成し, 肝細胞と胆管上皮の両方の特徴を示すことが報告されている<sup>61)</sup>。

#### 4.5 化学物質の発がん毒性の解析

従来, 化学物質の発がんリスクを調べるためにラットやマウスに長期間投与し, 各臓器の腫瘍病変を調べる方法が行われてきた。一方, イニシエーションとプロモーション処置を組み合わせる短期間に前がん肝病変を誘発し, その数および大きさを測定することによって発がん毒性を評価する研究が行われている。特にラットでは前がん肝細胞は早期から glutathione s-transferase placental form (GST-P) を発現するため, GST-P 免疫染色に

より前がん病変を検出して数量化する方法が用いられる。プロモーションの方法としてはフェノバルビタール (phenobarbital) の連続投与や<sup>62)</sup>, 2-AAF と 2/3 部分肝切除を組み合わせる方法<sup>63)</sup>などが用いられる。

胎仔は発がん感受性が高いため, 妊娠動物に発がん処理を行うと生後に様々な臓器に腫瘍が発生する。経胎盤的に発がん剤被爆を受けたラットに生後 2-AAF 投与, 2/3 部分肝切除を行うと肝に前がん肝病変が生じるため, それを測定することにより胎仔期に被爆した発がん剤の影響を調べることができる<sup>64), 65)</sup>。

#### 4.6 肝発がんの性差のメカニズム

肝がんの発がん感受性はヒトと同様に動物でも雌に比べて雄の方が高い。その理由はエストロゲン(estrogen)が肝発がんを抑制するのに対してアンドロゲン(androgen)は促進するためである。したがって、雄に去勢または女性ホルモン投与を行うと肝発がん感受性が低下し、雌に卵巣摘出または男性ホルモン投与をすると上昇する<sup>66)</sup>。肝がん細胞ではアンドロゲンレセプター、エストロゲンレセプターを発現していてアンドロゲンは増殖促進的に働くのに対してエストロゲンは抑制的に働くことが報告されている<sup>6), 7), 67)</sup>。また、エストロゲンはKupffer細胞におけるIL-6の産生を抑制することにより肝発がんを抑制することが報告されている<sup>68)</sup>。

#### 5. 終わりに

実験動物を用いる肝発がんモデルは肝発がんに関する様々な課題の研究に有効である。肝発がんモデルには多くのものが開発されており、それぞれに特徴があるので、各モデルの特徴を理解して研究目的に沿った適切なモデルを選択することが望ましい(表1)。

#### 参考文献

- 1) Miller J. A. : Carcinogenesis by chemicals : an overview-G. H. A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res.*, 30 : 559-576, 1970.
- 2) Vesselinovitch S. D. : Perinatal hepatocarcinogenesis. *Biol. Res. Pregnancy Perinatol.*, 4 : 22-25, 1983.
- 3) Emmelot P. and Scherer E. : The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. A quantitative approach. *Biochim. Biophys. Acta*, 605 : 247-304, 1980.
- 4) Asamoto M., Tsuda H., Kagawa M., de Camargo J. L., Ito N. and Nagase S. : Strain differences in susceptibility to 2-acetylaminofluorene and phenobarbital promotion of rat hepatocarcinogenesis in a medium-term assay system : quantitation of glutathione S-transferase P-positive foci development. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80 : 939-944, 1989.
- 5) Chiaverotti T., Carabeo R. and Drinkwater N. : Genetic and hormonal regulation of murine hepatocarcinogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 35 : 131-142, 1999.
- 6) Yeh S. H. and Chen P. J. : Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. *Oncology*, 78 : 172-179, 2010.
- 7) Kalra M., Mayes J., Assefa S., Kaul A. K. and Kaul R. : Role of sex steroid receptors in pathobiology of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 14 : 5945-5961, 2008.
- 8) Barbason H., Herens C., Robaye B., Milis G., Sulon J., Bouzahzah B. and VanCantfort J. : Importance of cell kinetics rhythmicity for the control of cell proliferation and carcinogenesis in rat liver. *In Vivo*, 9 : 539-548, 1995.
- 9) Ogawa K., Mukai S. and Onoe T. : Effect of aging on proliferative activity of normal and carcinogen-altered hepatocytes in rat liver after a two-thirds partial hepatectomy. *Jpn. J. Cancer Res.*, 76 : 779-784, 1985.
- 10) Pitot H. C. and Dragan Y. P. : Factors and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J.*, 5 : 2280-2286, 1991.
- 11) Klaunig J. E., Xu Y., Isenberg J. S., Bacowski S., Kolaja K. L., Jiang J., Stevenson D. E. and Walborg D. E. : The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, 106 : 289-295, 1998.
- 12) Ogawa K., Onoe T. and Takeuchi M. : Spontaneous occurrence of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase-positive hepatocytic foci in 105-week-old Wistar and 72-week-old Fischer 34 male rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 67 : 407-412, 1981.
- 13) Ogawa K., Solt D. B. and Farber E. : Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocytes populations in liver carcinogenesis. *Cancer Res.*, 40 : 725-733, 1980.
- 14) Yokota K., Ogawa K., Mori M., Nagase S. and Sato

- K. :Lack of albumin as genotypic marker of preneoplastic analbuminemic rat hepatocytes transplanted within albumin-positive liver. *Cancer Res.*, 15 : 387-392, 1988.
- 15) Ogawa K. : Molecular pathogenesis of early stage chemically induced hepatocarcinogenesis. *Pathol. Int.*, 59 : 605-622, 2009.
  - 16) Moore M. A., Nakagawa K., Satoh K., Ishikawa T. and Sato K. : Single GST-P positive liver cells-putative initiated hepatocytes. *Carcinogenesis*, 8 : 483-486, 1987.
  - 17) Suzuki S., Asamoto M., Tsujimura K. and Shirai T. : Specific differences in gene expression profile revealed by cDNA microarray analysis of glutathione S-transferase placental form (GST-P) immunohistochemically positive rat liver foci and surrounding tissue. *Carcinogenesis*, 25 : 439-443, 2004.
  - 18) Moto M., Okamura M., Muguruma M., Ito T., Jin M. and Mitsumori K. : Gene expression analysis on the dicyclanil-induced hepatocellular tumors in mice. *Toxicol. Pathol.*, 34 : 744-751, 2006.
  - 19) Kinoshita A., Wanibuchi H., Morimura K., Wei M., Shen J., Imaoka S., Funae Y. and Fukushima S. : Phenobarbital at low dose exerts hormesis in rat hepatocarcinogenesis by reducing oxidative DNA damage, altering cell proliferation, apoptosis and gene expression. *Carcinogenesis*, 24 : 1389-1399, 2003.
  - 20) Schirmacher P., Held W. A., Yang D., Chisari F. V., Rustum Y. and Rogler C. E. : Reactivation of insulin-like growth factor II during hepatocarcinogenesis in transgenic mice suggests a role in malignant growth. *Cancer Res.*, 52 : 2549-2556, 1992.
  - 21) Ooasa T., Karasaki H., Kanda H., Nomura K., Kitagawa T. and Ogawa K. : Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene in mouse hepatocellular carcinoma cell lines. *Mol. Carcinog.*, 23 : 248-253, 1998.
  - 22) Ishizaki T., Yoshie M., Yaginuma Y., Tanaka T. and Ogawa K. : Loss of Igf2 imprinting in monoclonal mouse hepatic tumor cells is not associated with abnormal methylation patterns for the H19, Igf2, and Klf1 differentially methylated regions. *J. Biol. Chem.*, 278 : 6222-6228, 2003.
  - 23) Jang H. S., Kang K. M., Choi B. O., Chai G. Y., Hong S. C., Ha W. S. and Jirtle R. L. : Clinical significance of loss of heterozygosity for M6P/IGF2R in patients with primary hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 14 : 1394-1398, 2008.
  - 24) Breuhahn K. and Schirmacher P. : Reactivation of the insulin-like growth factor-II signaling pathway in human hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 14 : 1690-1698, 2008.
  - 25) Gotoh J., Obata M., Yoshie M., Kasai S. and Ogawa K. : Cyclin D1 over-expression correlates with  $\beta$ -catenin activation, but not with H-ras mutations, and phosphorylation of Akt, GSK3  $\beta$  and ERK1/2 in mouse hepatic carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 24 : 435-442, 2003.
  - 26) De La Coste A., Rinagbiki B., Billuart P., Billuart P., Renard M. A., Soubrane O., Fabre M., Chelly J., Beldjord C., Kahn A. and Perret C. : Somatic mutations of the  $\beta$ -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 8847-8851, 1998.
  - 27) Ogawa K., Yamada Y., Kishibe K., Ishizaki K. and Tokusashi Y. :  $\beta$ -catenin mutations are frequent in hepatocellular carcinomas but absent in adenomas induced by diethylnitrosamine in B6C3F1 mice. *Cancer Res.*, 59 : 1830-1833, 1999.
  - 28) Aydinlik H., Nguyen T. D., Moennikes O., Buchmann A. and Schwarz M. : Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of  $\beta$ -catenin-mutated mouse liver tumors. *Oncogene*, 20 : 7812-7816, 2001.
  - 29) Calvisi D. F., Factor V. M., Loi R. and Thorgeirsson S. S. : Activation of  $\beta$ -catenin during hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models : relationship to phenotype and tumor grade. *Cancer Res.*, 61 : 2085-2091, 2001.
  - 30) Harada N., Oshima H., Katoh M., Tamai Y., Oshima M. and Taketo M. M. : Hepatocarcinogenesis in mice with  $\beta$ -catenin and Ha-ras gene mutations. *Cancer Res.*, 64 : 48-54, 2004.
  - 31) Kaufmann W. K., Zhang Y. and Kaufman D. G. : Association between expression of transforming growth factor- $\alpha$  and progression of hepatocellular foci to neoplasms. *Carcinogenesis*, 13 : 1481-1483, 1992.

- 32) Tanno S. and Ogawa K. : Abundant TGF $\alpha$  precursor and EGF receptor expression as a possible mechanism for the preferential growth of carcinogen-induced preneoplastic and neoplastic hepatocytes in rats. *Carcinogenesis*, 15 : 1689-1694, 1994.
- 33) Kitano M., Ichihara T., Matsuda T., Wanibuchi H., Tamano S., Hagiwara A., Imaoka S., Funae Y., Shirai T. and Fukushima S. : Presence of threshold for promoting effects of phenobarbital on diethylnitrosamine-induced hepatic foci in the rat. *Carcinogenesis*, 19 : 1475-1480, 1998.
- 34) Tanaka H., Yamamoto M., Hashimoto N., Miyakoshi M., Tamakawa S., Yoshie M., Tokusashi Y., Yokoyama K., Yaginuma Y. and Ogawa K. : Hypoxia-independent overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  as an early change in mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, 66 : 11263-11270, 2006.
- 35) Maione D., Di Carlo E., Li W., Musiani P., Modesti A., Peters M., Rose-John S., Della Rocca C., Toripodi M., Lazzaro D., Taub R., Savino R. and Ciliberto G. : Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. *EMBO J.*, 17 : 5588-5597, 1998.
- 36) Ogata H., Kobayashi T., Chinen T., Takai H., Sanada T., Minoda Y., Koga K., Takaesu G., Maehara Y., Iida M. and Yoshimura A. : Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 131 : 179-193, 2006.
- 37) Miyakoshi M., Yamamoto M., Tanaka H. and Ogawa K. : Stat3 Ser727 phosphorylation as an early change in mouse hepatocarcinogenesis. *Mol. Carcinog.*, DOI 10.1002/mc. 21949, 2012.
- 38) Yamamoto M., Tamakawa S., Yoshie M., Yaginuma Y. and Ogawa K. : Neoplastic hepatocyte growth associated with cyclin D1 redistribution from the cytoplasm to the nucleus in mouse hepatocarcinogenesis. *Mol. Carcinog.*, 45 : 901-913, 2006.
- 39) Geller S. A., Nichols W. S., Kim S., Tolmachoff T., Lee S., Dycoico M. J., Felts K. and Sorge J. A. : Hepatocarcinogenesis in the sequel to hepatitis in #22 alpha 1-antitrypsin transgenic mice. *Histopathological and DNA ploidy studies. Hepatology*, 19 : 389-397, 1994.
- 40) Schnur J., Olah J., Szepesi A., Nagy P. and Thorgeirsson S. S. : Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in transforming growth factor  $\beta$ -1 transgenic mice. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 16 : 127-133, 2004.
- 41) Maeda S., Kamata H., Luo J. L., Leffert H. and Karin M. : IKK  $\beta$  couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*, 121 : 977-990, 2005.
- 42) Luedde T., Beraza N. Kitsikris V., van Loo G., De Vos R., Roskams T., Trautwein C. and Pasparakis M. : Deletion of NEMO/IKK  $\gamma$  in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 11 : 119-132, 2007.
- 43) Nakae D. : Endogenous liver carcinogenesis in the rat. *Pathol. Int.*, 49 : 1028-1042, 1999.
- 44) Campbell J. S., Hughes S. D., Gilhertson D. G., Palmer T. E., Holdren M. S., Haran A. C., Odell M. M., Bauer R. L., Ren H. P., Haugen H. S., Yeh M. M. and Fausto N. : Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 : 3389-3394, 2005.
- 45) Watanabe S., Horie Y., Kataoka E., Sato W., Ohshima S., Goto T. and Suzuki A. : Non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma : lessons from hepatocyte-specific phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 22 : S96-S100, 2007.
- 46) Solt D. B. and Farber E. : New principle for the analysis of hepatocarcinogenesis. *Nature*, 263 : 701-706, 1976.
- 47) Higashi K., Denda A., Higashi T. and Hiai H. : Genetic resistance to chemical hepatocarcinogenesis in the DRH rat strain. *Comp. Med.*, 54 : 373-377, 2004.
- 48) Zeng Z. Z., Higashi S., Kitayama W., Denda A., Yan Y., Matsuo K., Konishi Y., Hiai H. and Higashi K. : Genetic resistance to chemical carcinogen-induced preneoplastic hepatic lesions in DRH strain rats. *Cancer Res.*, 60 : 2876-2881, 2000.
- 49) Imai K., Yamamoto M., Tanaka H., Hashimoto N., Miyakoshi M., Honmou S., Yoshie M., Tamakawa S., Yaginuma Y., Kasai S. and Ogawa K. : Low selection

- of preneoplastic hepatocytes after treatment with the 2-acetylaminofluorene diet-partial hepatectomy regimen in the liver of hepatocarcinogenesis-resistant DRH strain rats. *Oncol. Rep.*, 17 : 55-60, 2007.
- 50) Hashimoto N., Yamamoto M., Miyakoshi M., Tanaka H. and Ogawa K. : Unique properties of hepatocarcinogenesis-resistant DRH rats linked or not linked to the Drh locus on rat chromosome 1. *Int. J. Hepatol.*, doi:10.4061/2011/424356.
- 51) Honmo S., Ozaki A., Yamamoto M., Hashimoto N., Miyakoshi M., Tanaka H., Yoshie M., Tamakawa S., Tokusashi Y., Yaginuma Y., Kasai S. and Ogawa K. : Low p38 MAPK and JNK activation in cultured hepatocytes of DRH rats; a strain highly resistant to hepatocarcinogenesis. *Mol. Carcinog.*, 46 : 758-765, 2007.
- 52) Bucher N. L. : Regeneration of mammalian liver. *Int. Rev. Cytol.*, 15 : 245-300, 1963.
- 53) Imamura E., Yamamoto M., Miyakoshi M., Honmo S., Ozaki A., Yoshie M., Tamakawa S., Yaginuma Y., Kasai S. and Ogawa K. : Differential growth capacity between infant and adult mouse hepatocytes *in vitro* correlates to the cyclin D1 level without relation to oxidative DNA damage. *Liver Int.*, 25 : 1036-1043, 2005.
- 54) Ogawa K., Yoshie M., Tamakawa S., Yamamoto M., Tokusashi Y. and Yaginuma Y. : Possible role of the microenvironment created by neoplastic hepatocytes during hepatic carcinogenesis. *Appl. Genom. Proteom.*, 2 : 135-143, 2003.
- 55) Kishibe K., Yamada Y. and Ogawa K. : Production of nerve growth factor by mouse hepatocellular carcinoma cells and expression of TrkA in tumor-associated arteries in mice. *Gastroenterology*, 122 : 1978-1986, 2002.
- 56) Asai, K., Tamakawa S., Yamamoto M., Yoshie M., Tokusashi Y., Yaginuma Y., Kasai S. and Ogawa K. : Activated hepatic stellate cells overexpress p75NTR after partial hepatectomy and undergo apoptosis on nerve growth factor stimulation. *Liver Int.*, 26 : 595-603, 2006.
- 57) Nakamura T., Arakaki R. and Ichihara A. : Interleukin-1  $\beta$  is a potent growth inhibitor of adult rat hepatocytes in primary culture. *Exp. Cell Res.*, 179 : 488-497, 1988.
- 58) Yamada Y., Karasaki H., Matsushima K., Lee G. H. and Ogawa K. : Expression of an IL-1 receptor antagonist during mouse hepatocarcinogenesis demonstrated by differential display analysis. *Lab. Invest.*, 79 : 1059-1067, 1999.
- 59) Ogawa K., Minase T. and Onoe T. : Demonstration of glucose 6-phosphatase activity in the oval cells of rat liver and the significance of the oval cells in azo dye carcinogenesis. *Cancer Res.*, 34 : 3379-3386, 1974.
- 60) Tatematsu M., Ho R. H., Kaku T., Ekem J. K. and Farber E. : Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. *Am. J. Pathol.*, 114 : 418-430, 1984.
- 61) Giyette M., Faris R., Braun K., Hixson D. and Fausto N. : Expression of hepatocyte and oval cell antigens in hepatocellular carcinomas produced by oncogene-transfected liver epithelial cells. *Cancer Res.*, 50 : 4809-4817, 1990.
- 62) Pitot H. C., Dragan Y. P., Teeguarden J., Hsia S. and Campbell H. : Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. *Toxicol. Pathol.*, 24 : 119-128, 1996.
- 63) Ito N., Tamano S. and Shirai T. : A medium-term rat liver bioassay for rapid *in vivo* detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Sci.*, 94 : 3-8, 2003.
- 64) Ogawa K., Yokokawa K., Tomoyori T. and Onoe T. : Induction of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase-positive altered hepatocytic lesions by combination of transplacental-initiation and postnatal-selection. *Int. J. Cancer*, 29 : 333-336, 1982.
- 65) Ogawa K., Yokokawa K., Tomoyori T. and Narasaki M. : Initiation of focal hyperplastic hepatic lesions by transplacental administration of ethylnitrosourea in rats of F1 generation, and no transmission of the effect to F2 and F3 generations. *Int. J. Cancer*, 31 : 775-777, 1983.
- 66) Nakatani T., Roy G., Fujimoto N., Asahara T. and Ito A. : Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92 : 249-256, 2001.
- 67) Li Z., Tuteja G., Schug, J. and Kaestner K. H. : Foxa1 and Foxa2 are essential for sexual dimorphism in liver cancer. *Cell*, 148 : 72-83, 2012.

- 68) Naugler W. E., Sakurai T., Kim S., Maeda S., Kim K., Elsharkawy A. M. and Karin M. : Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*, 317 : 121-124, 2007.
- 69) Vesselinovitch S. D., Mihailovich N. and Rao K. V. : Morphology and metastatic nature of induced hepatic nodular lesions in C57BL x C3H F1 mice. *Cancer Res.*, 38 : 2003-2010, 1978.
- 70) McGlynn K. A., Hunter K., LeVoyer T., Roush J., Wise P., Michielli R. A., Shen F. M., Evans A. A., London W. T. and Buetow K. H. : Susceptibility to aflatoxin B1-related primary hepatocellular carcinoma in mice and humans. *Cancer Res.*, 63 : 4594-4601, 2003.
- 71) Rao M. S. and Reddy J. K. : Hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 804 : 573-587, 1996.
- 72) Weisburger E. K. : Carcinogenicity studies on halogenated hydrocarbons. *Environ. Health Perspect.*, 21 : 7-16, 1977.
- 73) Knight B., Yeoh G. C., Husk K. L., Ly T., Abraham L. J., Yu C., Rhim J. A. and Fausto N. : Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J. Exp. Med.*, 192 : 1809-1818, 2000.
- 74) Salguero Palacios R., Roderfeld M., Hemmann S., Rath T., Atanasova S., Tschuschner A., Gressner O. A., Weiskirchen R., Graf J. and Roeb E. : Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Lab. Invest.*, 88 : 1192-1203, 2008.
- 75) Farber E. : Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3<sup>1</sup>-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.*, 16 : 142-148, 1956.
- 76) Dasgupta A., Chatterjee R. and Chowdhury J. R. : Thioacetamide-induced hepatocarcinoma in rat. *Oncology*, 38 : 249-253, 1981.

(小川勝洋／山本雅大)