

学位論文題名

Prevention of spontaneous hepatocellular carcinoma in
LEC rats with hereditary hepatitis
by the administration of D-penicillamine.

(D-penicillamine 投与による、遺伝性肝炎発症

LEC ラットの自然発症肝癌の予防)

学位論文内容の要旨

I 緒言

Long-Evans Cinnamon(LEC)ラットは生後4-5カ月齢で重篤な急性肝炎を自然発症し約半数の個体が死亡する。生存し得た個体で肝炎は慢性化し胆管線維症を合併し、生後1年以上経過すると原発性肝癌が発生する。慢性肝炎を経て肝癌が発生するLECラット肝障害の自然経過はヒト肝発癌の臨床経過に類似し、ヒト肝発癌の機序を研究する上で有用な動物モデルと考えられる。申請者らは既に、LECラット肝炎が常染色体劣性遺伝形式を取り、ヒトWilson病類似の銅代謝異常に起因する事を明らかにした。今回申請者らは、LECラットの慢性肝炎が肝発癌に何らかの影響を及ぼしている可能性を考え、LECラットに対し銅キレート剤であるD-penicillamine(DPA)を長期間投与することにより、慢性肝炎が抑制されるか否か、もし慢性肝炎が抑制されたなら、肝発癌がどのような影響を受けるか等を検討した。

II 材料と方法

1. 実験動物

LECラットは北海道大学実験生物センターでLong-Evansラットから分離され系統維持されているものを用いた。

2. D-penicillamine 長期投与

肝炎発症前である11週齢の雌雄LECラットに対し、DPA投与群には脱イオン蒸留水を用い調整したDPA100mg/体重kg/日相当量を、対照群には脱イオン蒸留水のみを約70週齢まで連日自由飲水の方法で投与した。

3. 血清生化学検査と血清銅の測定

実験開始時と16、28、44週齢及び実験終了時70週齢の各時点で頸静脈から採血し血清GOT等肝機能検査及び血清銅の測定を各々UV法、

原子吸光法にて行った。

4. 肝病理組織及び免疫組織化学的検査

44週齢時で両群各6頭、70週齢時には両群全個体を犠牲死させ肝臓を摘出した。肝臓は10%ホルマリン固定しパラフィン包埋後ヘマトキシリン-エオジン染色を施行し、光学顕微鏡で観察した。また、抗ラット兎Placental Glutathione S-Transferase(GST-P)抗体を用い、ABC法により44週齢LECラット肝の免疫染色を行った。

5. LECラット肝 oh^8dG の測定

13週齢LECラットを用いDPA投与群と対照群を上記と同様に設定し、17週齢時屠殺した。摘出した肝から抽出したDNAを加熱酵素処理後electrometricaldetection法により8-hydroxy-deoxyguanosine(oh^8dG)を測定した。

6. 統計学的解析方法

統計学的有意差はカイ二乗検定及びStudent's t-検定で評価した。

III 結 果

1. 肝炎に対するDPAの効果

LECラット対照群では15週齢から33週齢までの期間に雌雄合計37頭中22頭で顕性黄疸が観察された。一方、DPA投与群では観察期間中1例の黄疸も認めなかった。対照群の血清GOT、GPT及び血清銅濃度は16週齢で著明な上昇を示し、その後も11週齢時に比べ高値を維持した。一方、DPA投与群では実験期間中血清transaminase及び血清銅濃度の上昇を認めなかった。病理組織学的検討では、44週齢対照群(雌雄合計6頭)の全てに慢性肝炎の所見を認めたが、DPA投与群では全例で正常な肝組織像であった。

2. 肝前癌病変に対するDPAの効果

44週齢対照群肝では過形成病変が認められ、免疫染色ではGST-P陽性fociが多数認められた。一方、同週齢DPA投与群では肝過形成病変を全く認めず、肝GST-P陽性fociも認められなかった。

3. 肝発癌に対するDPAの効果

70週齢対照群15頭の肝は全ての肝葉が著明に腫大し15頭中11頭で肝腫瘍が、また、全例に胆管線維症による乳白色調の病変が存在した。しかし、DPA投与群では肝葉の腫脹は認めず肝腫瘍の形成、胆管線維症の所見は肉眼的には観察されなかった。病理組織学的には、対照群11頭の肝腫瘍11病変中9病変に肝細胞癌が認められ、その他に慢性肝炎、胆管線維症及び多数の肝過形成性結節の所見を認めた。一方、DPA投与群では全ての肝組織標本で正常な小葉構築が維持さ

れ、肝過形成性病変、肝細胞癌は認めなかった。

4. 肝 oh^8dG 産生に対するDPAの効果

肝組織DNAの $oh^8dG/10^5dG$ は対照群では雄で 6.40 ± 0.85 、雌では 6.80 ± 1.03 であったの対し、DPA投与群では各々 3.38 ± 0.32 、 2.80 ± 0.42 であり、後者で有意に減少していた。

IV 考察

申請者らは、LECラットにDPAを長期間投与し、銅代謝異常に起因する慢性肝炎と肝発癌がどのような影響を受けるかを観察した。

肉眼的黄疸の発症率、血清生化学及び肝病理組織所見から、DPAの長期投与によりLECラットの急性及び慢性肝炎が完全に抑制され、さらには肝発癌も予防されることが明かとなった。これらの実験事実は、持続する肝炎がLECラット肝発癌に重要な役割を果していることを強く示唆するものである。

申請者らは既にLECラット肝細胞に銅が高濃度で蓄積している事を報告したが、銅イオンの存在下で肝にoxygen radicalsが産生され、劇症肝炎の原因となっている可能性が考えられる。さらに急性肝炎後も、これらが肝細胞DNAに持続的損傷を与え肝発癌に関与している可能性がある。DNA中の oh^8dG 量はDNAに対するoxydative stressの指標とされており、LECラットでは急性肝炎時期に増加することが報告されている。DPA投与群の肝でDNA中の oh^8dG 産生が著明に抑制された事実は、肝におけるoxygen radicalsの産生がDPA投与により抑制される事を示しており、LECラットの肝炎と肝発癌過程にoxygen radicalsが関与している可能性を示唆するものである。

LECラット肝発癌では、1年以上持続する慢性肝炎が先行することが特徴的であり、このことはヒト肝癌の多くが、ウイルス性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症等その背景疾患は異なるものの、肝細胞障害と再生が持続的に反復される過程で発症する事実と類似している。LECラットにおいて慢性肝炎が抑制されれば肝発癌も予防可能であった事実は、肝発癌と慢性肝炎の関連性を強く示唆するものである。

V 結語

1. LECラットの急性及び慢性肝炎はD-penicillamine(DPA)の連日経口投与により完全に抑制された。
2. 同様に肝前癌病変及び肝癌の発生もDPAの長期投与により完全に抑制された。
3. DPAは、銅代謝を改善することにより、oxygen radicalsによるDNA損傷の指標である肝組織 oh^8dG 産生を抑制した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 真澄男
副 査 教 授 葛 卷 暹
副 査 教 授 宮 崎 勝 巳

学位論文題名

Prevention of spontaneous hepatocellular carcinoma in LEC rats with hereditary hepatitis by the administration of D-penicillamine.

(D-penicillamine 投与による、遺伝性肝炎発症
LECラットの自然発症肝癌の予防)

Long-Evans Cinnamon(LEC)ラットは、肝における銅代謝異常を病因として生後4~5カ月齢で重篤な急性肝炎を自然発症し、1年以上生存し得た個体では原発性肝癌が発生する。長期の慢性肝炎を経て肝癌が発生するLECラットの自然経過はヒト肝発症の臨床経過に類似し、肝発症機序を研究する上で有用な動物モデルと考えられる。今回、申請者らは、LECラットの慢性肝炎が肝発症に影響を与えている可能性を考え、銅キレート剤であるD-penicillamine(DPA)を長期間投与することにより、急性および慢性肝炎が抑制されるか否か、さらに肝発症がどのような影響を受けるかを検討した。

実験では、北海道大学実験生物センターから供給された肝炎発症

前の11週齢LECラットを用い、DPA投与群（DPA100mg/体重kg/日）、対照群（脱イオン蒸留水のみを投与）を設定し約70週齢まで連日経口投与した。実験開始時と16、28、44及び70週齢の各時点で採血し肝機能検査、血清銅の測定を行った。44、70週齢時には肝病理組織及び免疫組織染色を行った。また、活性酸素の肝DNAに対する影響を検討する目的で、酸化ストレスによる組織DNA損傷の指標である8-Hydroxy-deoxy Guanosine (oh⁸dG)の測定を行った。13週齢LECラットを用いDPA投与群と対照群を上記と同様に設定し、17週齢時に摘出した肝のoh⁸dGを測定した。

DPA投与実験期間中、対照群では、37頭中22頭で顕性黄疸が観察され、血清GOT、GPT及び血清銅濃度は16週齢で著明に上昇し、その後も高値を維持した。一方、DPA投与群では観察期間中1例の黄疸も認めず、実験期間中血清transaminase及び血清銅濃度の上昇を認めなかった。病理組織学的検討では、44週齢対照群の全てに慢性肝炎像の他に過形成病変が認められ、免疫組織染色ではGST-P陽性fociが多数認められた。一方、44週齢DPA投与群は全例で正常な肝組織像を示し、肝過形成病変及び肝GST-P陽性fociは認められなかった。また、70週齢時の肝病理組織像では、対照群15頭中9頭に肝細胞癌が認められた。DPA群では全ての肝組織標本で小葉構築が維持され、肝過形成性病変、肝細胞癌は認めなかった。17週齢肝組織DNAのoh⁸dG/10⁵dGは、DPA投与群では対照群に比べ有意に減少していた。

以上の実験結果からDPAの長期投与によりLECラットの急性及び慢性肝炎が完全に抑制され、さらには肝発癌も予防されることが明らかとなった。LECラット肝発癌では、1年以上持続する慢性肝炎が先行することが特徴的であり、このことはヒト肝癌の多くが、ウイルス性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症等その背景疾患は異なるものの、肝細胞障害と再生が持続的に反復される過程で発症する事実と類似している。LECラットにおいて慢性肝炎が抑制されれば肝発癌も予

防可能であった事実は、肝発癌と慢性肝炎の関連性を強く示唆するものである。

申請者らは既にLECラット肝細胞に銅が高濃度で蓄積している事を報告したが、銅イオンの存在下で肝にoxygen radicalsが産生され、劇症肝炎の原因となっている可能性が考えられる。さらに急性肝炎後も、これらが肝細胞DNAに持続的損傷を与え肝発癌に関与している可能性がある。DNA中のoh⁸dG量はDNAに対するoxydative stressの指標とされており、LECラットでは急性肝炎時期に増加することが報告されている。DPA投与群の肝でDNA中のoh⁸dG産生が著明に抑制された事実は、肝におけるoxygen radicalsの産生がDPA投与により抑制される事を示しており、LECラットの肝炎と肝癌発生過程にoxygen radicalsが関与している可能性を示唆するものである。

口頭発表に際し、葛巻教授、宮崎（勝）教授から、DPA投与によるLECラットの肝細胞における癌遺伝子発現への影響、oxygen radicalsを抑制しないキレート剤を投与した場合の肝発癌への影響、DPA投与終了後さらに観察を続けた際の肝発癌率、DPA投与による腎毒性の有無、DPAの鉄に対するキレート作用の有無等の質問があったが、申請者はそれらに対し適切な応答をなし得た。また、葛巻教授、宮崎（勝）両教授の個別審査を受け、合格と判定された。

本研究は、LECラットの肝発癌にOxygen radicalsが関与しており、長期間に及ぶ肝細胞壊死と肝再生過程が発癌過程に重要な影響を及ぼしていることを示している。これらの成果は、ヒト肝発癌過程の研究に有用な示唆を与えるものと考えられる。また、本研究は数名の研究者による共同研究であり、英文共著論文としてHepatology誌に掲載されたが、申請者は常に主たる研究者として本研究を推進した。よって、博士（医学）の学位に相当するものと判定した。