

学 位 論 文 題 名

肝炎肝癌自然発症 LEC ラットの肝細胞核 DNA 量の解析

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

LEC (Long Evans Cinnamon) ラットは、生後4月齢頃に急性肝炎を自然発症し、半数近くが劇症肝炎で死亡する。一方生存例は慢性肝炎に移行し1年以上生存するものにはほぼ全例に肝癌が自然発生する。本ラットには先天性銅代謝障害が存在し、銅の肝内異常蓄積が肝炎発症の原因であることが判明しており、ヒト肝炎-肝癌の研究のみならず Wilson病の病態モデルとして有用性が広く注目されている。一方、DNA量解析による細胞動態の追跡から肝発癌が研究されてきているが、いずれもDMN、DEN等の化学発癌モデルラットによるものである。また銅代謝異常と肝発癌との関係についても明確にされておらず、Wilson病の細胞動態の知見も少ない。そこで本ラットにおける、肝炎発症から肝癌発生に至るまでの肝細胞の核DNA ploidy分布の推移と銅代謝異常を分析し検討した。

II. 材料と方法

1. 実験動物と方法：北海道大学実験生物センターで系統維持されているLECラットの、F21よりF23の雄で生後2日齢から29月齢ものを用いた。エーテル麻酔後開腹し門脈より生理的食塩水で肝灌流した後全肝を摘出し、一部を組織学的検査用に10%ホルマリンで固定し、残りを-80℃ 液体窒素内で凍結保存しploidy分布解析用および肝組織銅濃度測定用に供した。対照には同年齢のLEAラットを用いた。

2. 肝細胞核DNAヒストグラム：各月齢の肝組織(各6個)、12~24月齢の過形成結節(11個)及び癌組織(21個)を使い、肝細胞核浮遊液(約10⁶個/ml)を調製し、クエン酸3ナトリウム及びRNaseを含むpropidium iodide溶液で核DNA蛍光染色した後、FCM (Ortho 社 cytofluorograf system 50H)を用いヒストグラムを作製し5型に分類した。I型：diploid、II型：diploidおよびtetraploid、III型：diploid, tetraploid及びoctoploid、I'型：diploid優位だがoctoploidに明かなピークをもつ、IV型：aneuploid、とした。CV値は1.5%~3.0% (平均1.9%)であった。

3. 肝組織中銅濃度：2日齢、1、2、3月齢、8月齢及び29月齢を用い、1群3検体とした。銅濃度は日立180-30型原子吸光光度計を用いてフレイム法で測定し、肝組

織銅染色はTimm変法で行なった。

Ⅲ. 結 果

1. 組織学的所見：肝炎期には肝全体に多数の壊死巣が散在性にみられ、巨大核や異型多核を認めた。劇症肝炎期には肝中心静脈周辺の広範壊死像をみた。慢性期ではGlisson鞘、類洞内に多数の炎症細胞の浸潤があり、ヒトの慢性肝炎と類似していた。発生した肝細胞癌の大部分は索状に配列した高分化型の肝癌で、非癌部では小葉周辺帯に多数の偽胆管が増生し、胆管線維症を認めた。

2. ploidy分布：生後1月までI型のdiploidで、2月でdiploidとtetraploidのII型となり、3月でoctoploidが出現した。4月に肝炎が発症すると、III型へと移行したが、4月後半の劇症肝炎に進むとIII型は消失しI型のみとなった。回復期ではIII型が徐々に減少しII型からI型に戻った。慢性期ではdiploid優位で、octoploidにも明かなpopulationを有するI'型で、発癌期でも非結節部は84%が慢性期と同様にI'型だった。一方、過形成結節はI型9%、I'型55%、II型18%、IV型16%で、癌部ではI型24%、I'型19%、II型33%、III型14%、IV型10%だった。LEAラットは1月でLECラットと同様にI型であったが、2月齢以降は正常近交系ラットと同様にII型を維持した。

3. 肝組織中銅濃度：2日齢でLEAラット49.5 $\mu\text{g/g}$ 、LECラット149.5 $\mu\text{g/g}$ 、3月齢でLEAラット3.5 $\mu\text{g/g}$ 、LECラット252.2 $\mu\text{g/g}$ 、8月および29月齢も高値が続いた。8月齢の銅染色で、LECラットで小葉中心性に銅蓄積が見られた。

Ⅳ. 考 察

LECラットは生下時より常に高濃度の銅にさらされており、急性肝炎期のoctoploidの出現が自由銅による肝細胞の障害の結果であるとする、大小不同の核や多核、あるいは巨大異型核を持つ肝細胞の出現する時期と一致している。肝内銅蓄積量が肝細胞障害のレベルに達し、変性肝細胞がoctoploidを出現させるものと思われる。劇症肝炎期では急激に広範壊死に陥り、肝実質細胞が一気に消失するためにI型になると考えられるが、6月齢におけるI型化は生下時及び劇症期とは異なり、急激な広範壊死を免れた変性細胞に再生してきたdiploid肝細胞がスムーズに交替できたことを示唆している。慢性肝炎期の肝組織も常に変性壊死を繰り返すが、壊死と再生の均衡により、あるいは銅毒性に対する耐性により肝不全死を免れると考えられる。銅蓄積の持続的刺激により肝細胞の小壊死及び再生が繰り返され、diploid化及びoctoploidに小ピークを持つ細胞集団が形成されると推定される。ラット肝発癌の場合initiateされた肝細胞はtetraploidからdiploidに置き変わることからdiploid化が肝発癌にとって重要であると考えられている。またdiploidであるヒト肝細胞が慢性肝障害時ではtetraploid、octoploid細胞の増加を見ることも知られている。以上の事実から本ラット障害肝の肝癌発生母地としての共通性が感じられる。臨床的には肝内銅蓄積や血清銅高濃度は肝発癌に否定的

な意見があり、銅は肝癌発生に対し抑制的に働くとする報告もあるが、Wilson病では肝発癌年齢に達する前に肝硬変で死亡するという可能性も否定できない。尚、ヒト肝癌でaneuploidは40～60%を占めるが、本ラットでは21例中2例、9.5%のみがaneuploidを示すにとどまった。本研究の癌組織は直径5mm前後の初期癌と考えられることより、ヒト肝癌の全体像とは一致しないことも考えられる。

V. 結 語

1. 急性肝炎期では4倍体と共に8倍体が上昇したが、組織学的に巨大核や異型多核細胞が出現する時期と一致し、劇症肝炎期の2倍体化は変性肝細胞の急激な広範壊死を反映したものと推定された。

2. 回復期の2倍体化は、polyploidy化した変性肝細胞の壊死と再生してきたdiploid肝細胞がスムーズに交替した結果と考えられた。

3. 慢性期から発癌期では2倍体優位で経過し8倍体の上昇をみたが、持続的な銅蓄積により肝細胞の小壊死及び再生が繰り返され、細胞動態の異常に伴い癌化に至る可能性が示唆された。

4. 本ラットは、Wilson病のモデル動物のみならず銅代謝と肝発癌の究明においても極めて貴重な役割を果たして行くものと思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 武 市 紀 年

学 位 論 文 題 名

肝炎肝癌自然発症 LEC ラットの肝細胞核 DNA 量の解析

LECラットは、生後4ヵ月齢頃に急性肝炎を自然発症し、半数近くが劇症肝炎で死亡する。一方、生存例は慢性肝炎に移行し、1年以上生存するものにはほぼ全例に肝癌が自然発生する。本ラットには先天性銅代謝障害が存在し、銅の肝内異常蓄積が肝炎発症の原因であることが判明しており、肝炎-肝癌の研究のみならずWilson病のモデルラットとしても注目されている。一方、DNA量解析による細胞動態の追跡から肝発癌が研究されてきているが、いずれもDMN、DEN等の化学発癌モデルラットによるものである。また銅代謝異常と肝発癌との関係についても明確にされておらず、Wilson病の細胞動態の知見も少ない。そこで申請者は肝内銅蓄積により肝炎を発症するLECラット肝の、肝炎発症から肝癌発生に至るまでの肝細胞核DNA ploidy分布の解析を行い、細胞動態からみた肝発癌過程の機序を分析し検討した。

研究方法：

生後1ヵ月齢から24ヵ月齢のLECラットを使用し、臨床病理像から5段階に分類した。すなわち2ヵ月齢までを全肝炎期、3～5ヵ月齢を肝炎期、6ヵ月齢を肝炎回復期、9ヵ月齢を慢性肝炎期、12～24ヵ月齢を肝癌期とした。各月齢の肝組織(n=6)、12～24ヵ月齢の非癌部(n=19)、過形成結節(n=11)、および癌組織(n=21)を検索した。対照には同年齢のLEAラットを用いた。

エーテル麻酔後開腹し、門脈より生理的食塩水を用いて肝灌流した後全肝を摘出し、-80℃液体窒素内で凍結保存した。ploidy解

析にあたって解凍し、肝細胞核浮遊液(約 10^6 個/ml)を調整後、クエン酸3ナトリウムおよび RNaseを含むPropidium iodide溶液で核DNA蛍光染色した。ついでFCM(Ortho社cytofluorograf system 50H)を用いてヒストグラムを作製した。核DNA量解析の結果、以下の5型に分類された。I型: 2倍体、II型: 2倍体および4倍体、III型: 2倍体、4倍体および8倍体、I'型: 2倍体優位だが8倍体に明らかなピークをもつ、IV型: aneuploid。CV値は1.5%~3.0%(平均1.9%)であった。2倍体コントロールには脾リンパ球を用いた。

研究結果:

生後1ヵ月齢までI型の2倍体で、2ヵ月齢で2倍体と4倍体のII型となり、3ヵ月齢では8倍体が出現した。4ヵ月齢に肝炎が発症すると、2倍体、4倍体、8倍体にピークを持つ多倍体のIII型へ移行したが、4ヵ月齢後半になり黄疸が発症して劇症肝炎に進み、約半数が死亡する状態では、4倍体、8倍体は急激に消失し、I型の2倍体に戻った。生存し得て肝炎より回復してくると4倍体および8倍体は徐々に減少し、6ヵ月齢では生下時の2倍体に戻った。慢性期では2倍体優位で8倍体にも明らかなpopulationを有するI'型となった。発癌期では非結節部は84%が慢性期と同様にI'型を呈した。

一方、過形成結節は11例のうちI型9%、I'型55%、II型18%、IV型10%で多彩な像を示した。

LEAラットは1ヵ月齢でLECラットと同様にI型であったが、2ヵ月齢以降は正常近交系ラットと同様にII型を維持した。

肝内銅蓄積が高濃度に達し、組織学的に巨大核や異型多核細胞が出現する急性肝炎期に一致して4倍体とともに8倍体が増加し、多倍体化がみられた。劇症肝炎期の2倍体化は変性肝細胞の急激な広範壊死を反映したものと推定された。回復期の2倍体化は、多倍体化した変性肝細胞の壊死と再生してきた2倍体肝細胞がスムーズに交替した結果と考えられた。慢性期から発癌期では4倍体は増加せず2倍体優位で経過し8倍体の上昇をみた。肝細胞癌では5型すべてのploidy分布をみた。

以上より、持続的な銅蓄積により肝細胞の小壊死および再生が繰

り返され、細胞動態の異常に伴い癌化に至る可能性が示唆された。

審査にあたって、葛巻教授より肝細胞核の多倍体における染色体とDNA量との関係について、武市教授より銅代謝異常の肝癌発生に及ぼす影響について、細川教授より多倍体細胞の分裂および細胞死に関して、などの質疑があったが、申請者はおおむね妥当な回答を行った。

自然経過による肝炎発症または肝癌発生を核DNA量ploidy分布による細胞動態の角度から経時的に解析した報告はなく、本研究は、特に慢性期から発癌期を通じて2倍体優位の生下時の細胞動態に近似していること、および8倍体の増加を指摘したこと、また持続的な銅蓄積に伴う肝細胞の小壊死および再生の繰り返しが、細胞動態の異常をきたし癌化に至る可能性を示唆した点で意義があり、学位授与に値するものと考ええる。