〈原 著〉

ウッドチャックの肝病変—その比較病理学的考察

阿部 賢治 内野 焔持 富田 マツ* 志方 俊夫**

要 旨：野生ウッドチャック（WHV 陽性29匹，同陰性11匹）の肝病変について，病理学的に検索した。WHV 陽性率では全例で肝炎像を示したが，その程度は軽かった。オルセイン染色（志方法）では26例（90％）で肝細胞質が陽性を示した。電顕的には，肝細胞小胞体内にフィラメント構造物や二重構造を有するウイルス粒子（直径42～45nm）が，また細胞質基質内にはコア粒子（直径18～20nm）が存在したが，核内には観察されなかった。肝癌を18例（62％）に認めたが，全例 WHV 陽性であった。癌は多発性に発生しており，組織学的には高分化型肝細胞癌を示した。非癌部において，軽度の異型性を示す肝細胞の過形成増殖巣が認められ，前癌状態に相当する所見と思われた。以上の所見は WHV 陰性例には観察されなかった。これら所見に加え，肝内寄生虫がしばしば認められ，現在の実験動物としてのウッドチャックの問題点が示唆された。

索引用語： ウッドチャック肝炎 ウッドチャック肝癌 過形成増殖巣 前癌病変
肝内寄生虫

はじめに

ウッドチャック（*Marmota monax*）は米国東部からカナダにかけて生息するげっ歯目，リス科の動物である。この動物に肝癌が自然発生的に多発することが Snyder によって確認されたのは，1968年である¹⁾。その10年後には Summers らによりウッドチャック肝炎ウイルス（WHV と略す）が発見されている²⁾。この発見が多くの肝臓病学者の関心を集めたのは，WHV が B型肝炎ウイルスと酷似しており，更に肝病変もヒトと似かよっていたためであった。以来分子生物学手技の急速な発達も相まって，ウイルス面からの精力的なアプローチが開始され，ウイルス学的特徴のほぼ全貌が解明されるに至った。これに対し宿主側，つまりウッドチャックからのアプローチは進んでおらず，いまだ多くの問題を抱えている。著者らはこの問題と取り組むにはまずウッドチャックの実験動物化が重要と考え努力しているが，この実現には今後数年の歳月が必要である。今後ウイルス肝癌のモデル動物として確立する上でも，ヒトとの共通点，相違点を明らかにしておくことが重要である。そこで野生ウッドチャックの自然発生肝病変を，比較病理学的立場から検討したので

ここに報告する。

材料および方法

ウッドチャックはアメリカペンシルバニア州およびニューヨーク州に野生で生息していたもので，WHV 陽性29例，同陰性11例を対象とした。年齢は不詳であるが，2～5歳（young adult～adult）と推定された。肝組織は生検および剖検により採取した。光顕的には中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し，H.E染色，オルセイン染色（志方法）を施し観察した。電顕的には2.5%グルタルアルデヒドおよび1%オスミウムによる二重固定後エポンにて包埋し，超薄切片を作製後，酢酸ウラン・鉛の二重染色を施し観察した。

結 果

1. WHV 陽性群

全例で肝炎像を呈したが，全般にその程度は軽く，1例で慢性活動性肝炎を示した以外残りは慢性持続性肝炎であった（Table 1）。即ち後者はリンパ球や形質細胞を主体にした小円型細胞浸潤を門脈域に認めるが，境界板は保たれており，肝細胞の壊死，炎症反応は弱く，慢性持続性肝炎に相当する組織像であった（Fig. 1）。小葉間胆管の増生がしばしば認められた。肝細胞質がすりガラス様を呈す，いわゆる ground-glass hepatocyte が少数例で観察された（Fig. 2）。オルセイ

* 国立予防衛生研究所病理部

** 日本大学医学部第1病理

Table 1 Pathological findings of the liver of WHV-positive woodchucks.

Animal	Hepatitis	HCC*	Orcein	HF**	Others
W-1	CPH***	+	-	+	<i>C. hepatica</i>
W-2	CPH	-	+	-	
W-3	CPH	-	+	-	
W-4	CPH	+	+	+	
W-5	CPH	-	+	+	
W-7	CPH	-	+	+	
W-10	CPH	-	+	-	
W-11	CPH	-	+	-	
W-12	CPH	-	+	+	
W-13	CPH	+	+	+	
W-14	CPH	+	+	+	
W-16	CAH #	-	+	+	<i>C. hepatica</i>
W-17	CPH	-	+	+	
W-18	CPH	+	+	+	
W-19	CPH	+	+	+	
W-20	CPH	+	+	+	<i>C. hepatica</i>
W-32	CPH	+	+	+	
W-33	CPH	+	+	+	
W-35	CPH	+	+	+	
W-37	CPH	+	+	+	<i>C. hepatica, T. mustelae</i>
W-38	CPH	+	+	+	
W-43	CPH	+	-	+	<i>C. hepatica</i>
W-45	CPH	+	+	+	
W-46	CPH	+	+	+	
W-48	CPH	-	+	+	
W-49	CPH	+	+	+	
W-50	CPH	+	-	+	
W-51	CPH	-	+	+	
W-52	CPH	+	+	+	
Total 29	CPH 28(97%) CAH 1(4%)	18(62%)	26(90%)	25(86%)	

* Hepatocellular carcinoma

** Hyperplastic foci

*** Chronic persistent hepatitis

Chronic active hepatitis

ン染色では強弱の差はあるものの26例(90%)で陽性を示し、その多くは肝細胞質にびまん性或いは封入体状に局在し、また小葉内では周辺部に多く分布する傾向を示した(Fig. 3)。電顕的には、肝細胞小胞体内に直径18~20nmの細長いフィラメント構造物が封入体として認められた(Fig. 4)。更に肝細胞基質内には直径18~20nmのコア粒子が出現しており、しばしば集簇して存在したが、核内には観察されなかった(Fig. 5)。肝細胞小胞体内には直径41~45nmの二重構造からなるウイルス粒子も観察された(Fig. 5)。肝癌が18例(62%)で認められ、全例で慢性持続性肝炎を伴っ

ていた(Table 1)。癌は肉眼的に多発性に発生しており、数mmから十数cmと種々の大きさで、巨大なものは肝外側左葉に多く出現し、また剖面では中心部がしばしば出血、壊死に陥っていた(Fig. 6)。組織学的に腫瘍組織は高分化型細胞より構成され、これら細胞は数石状や索状配列を主とし、この他偽腺管状やpelioid状も認められた(Fig. 7)。細胞分裂像はまれであった。癌細胞は隣接する肝細胞と置換する様に増殖している所見がしばしば観察され、この場合非癌部との境界は不明瞭であった。癌細胞による破壊性浸潤や血管内浸潤、更に遠隔転移は認められなかった。癌組

Fig. 1 to 11 Livers of woodchucks infected with WHV.

Fig. 1 Chronic persistent hepatitis. Infiltration of the portal tracts by mononuclear cells, but no spill over of portal infiltrate and no necrotizing inflammatory change of hepatocyte. H.E., $\times 40$

Fig. 2 Ground-glass hepatocytes. H.E., $\times 200$

Fig. 3 The cytoplasm of hepatocytes show positive staining (right portion), but no positive staining in hyperplastic foci of the hepatocytes (left portion). Shikata's orcein stain, $\times 100$

織内には髓外造血巣がしばしば観察された。癌細胞のオルセイン染色陽性所見は得られなかった。電顕的に癌細胞は遊離リボソームを豊富に有し、小胞体は未発達で、細胞間隙は拡大しているが、毛細胆管の構造は保たれていた (Fig. 8)。非癌部において、好塩基性の細胞質と大小不同の核を有し、軽度の異型性を示す肝細胞の過形成増殖巣 (Hyperplastic foci, HF と略す) が散在性に多数観察された (Fig. 9)。HF は肝癌例では全例に、非担癌例でも 7 例に出現した。これらの所見に加え、肝内寄生虫が 5 例 (*Capillaria hepatica* 5 例, *Taenia mustelae* 1 例, うち 1 例は両種が共生) で認められた (Fig. 10)。

2. WHV 陰性群

肝炎像や肝癌, HF などの所見は観察されなかった

Table 2 Pathological findings of the liver of WHV-negative woodchucks.

Animal	Hepatitis	HCC*	Orcein	HF**	Others
W-15	—	—	—	—	
W-22	—	—	—	—	
W-23	—	—	—	—	<i>T. mustelae</i>
W-24	—	—	—	—	<i>C. hepatica</i>
W-26	—	—	—	—	
W-27	—	—	—	—	
W-28	—	—	—	—	
W-29	—	—	—	—	
W-56	—	—	—	—	
W-59	—	—	—	—	
W-60	—	—	—	—	

* Hepatocellular carcinoma

** Hyperplastic foci

Fig. 4 An electron micrograph showing the hepatocyte containing numerous filaments within the cisternae of the endoplasmic reticulum. $\times 28,600$

Fig. 5 An electron micrograph showing coated particle (42nm in diameter, thin arrow) within the cisternae of the endoplasmic reticulum and clusters of noncoated core particles (18-20nm in diameter, thick arrows) in the cytoplasm of hepatocyte. Cores are always found in the cytoplasm and then usually outside the endoplasmic reticulum. $\times 107,500$

Fig. 6 Macroscopic finding of hepatocellular carcinoma with multiple tumor nodules. Hemorrhage or softened necrotic centers are characteristic of the larger tumors.

Fig. 7 Well-differentiated hepatocellular carcinoma with trabecular pattern. H.E., $\times 100$

Fig. 8 An electron micrograph of the tumor cells showing abundant free ribosomes, undeveloped the endoplasmic reticulum and dilatation of the intercellular space. $\times 5,500$

Fig. 9 Hyperplastic foci of basophilic hepatocytes which vary in size. H.E., $\times 40$

Fig. 10 Eggs of *C. hepatica* with plasma cell infiltration in the liver parenchyma. H.E., $\times 100$

(Table 2). オルセイン染色も全例陰性であった。肝内寄生虫が2例 (*C. hepatica* 1例, *T. mustelae* 1例) で認められた。

考 察

最近各種動物で Hepadna virus が相次いで発見されている。この中でウッドチャックは先駆的存在であり、肝癌を多発することが知られている。今回の検索結果からもそのことは十分伺え、肝癌発生率は WHV 陽性の場合62%であったが、更に長期間観察すれば100%近くになるものと思われた。WHV キャリアを伴った肝病変もヒトと幾つかの共通点を有している。慢性持続性の肝炎の存在や、ground-glass hepatocyte の出現、肝細胞質小胞体内のフィラメント構造物やウイルス粒子の存在などである。これに対しヒトとの相違点も幾つか存在する。つまりウッドチャックでは肝硬変を形成しない、HF の存在、DNA ポリメラーゼ値がヒトの5~10倍も高いのに肝炎の程度が軽い³⁾、肝癌

の悪性度が低い、髄外造血を伴なうことが多い、癌転移は稀れである、ウイルスコア粒子が肝細胞の細胞質内に局在する、などの点である。この中で HF は組織化学的検索では癌に近い性格を帯びており、前癌状態に相当する所見と考えられる⁴⁾。同様の所見は化学発癌物質による実験肝癌でも見ることができる⁵⁾。ヒトの場合、Anthony のいう liver cell dysplasia⁶⁾ がこれに相当すると思われるが、ほとんどの場合肝硬変を伴うため、多数の再生結節により HF は明瞭でない。HF が散在性に同時に多数出現することからウッドチャック肝癌は多中心性に発生すると考えられる。ヒトにおける慢性肝炎→肝硬変→肝癌のステップが、ウッドチャックでは慢性肝炎→HF→肝癌ということになろう。何故ウッドチャックでは肝硬変を形成しないのかは明らかでないが、肝細胞の壊死、炎症反応が軽微なため肝細胞の再生の機会が少ないことや、また寿命の違いなども関係しているかも知れない。ウッドチャック肝癌は癌の芽が発生すると、隣接する肝細胞を置換性に発育しながら成長し、foci を形成後やがて周囲肝細胞を圧排して膨張性発育をすると思われる。しかし癌の悪性度は低く、多くは高分化型を示した。転移が少ないのはこのためであろう。ウッドチャックの死因をみても、肝癌が直接死因となったのは少なく、むしろ動脈硬化症、肺炎、腎疾患、寄生虫による消耗性疾患などに起因する場合が多い。いずれにせよ WHV と肝癌が密接に関係していることは Snyder らの報告⁷⁾や今回の検索結果、またウイルス DNA の癌細胞染色体への組み込み⁸⁾などの事実から明らかである。ところが最近 WHV 陰性例での肝癌発生例も報告されている⁹⁾。今まで得られた知見はいずれも結果から得られたものであり、いつ組み込みが起こり、いつ癌が発生し、どの様な機序で癌化が進行するのか一連の過程を経時的に観察することが、今後重要である。癌化に際してウイルス側の要因もさることながら、宿主側の要因、例えばホルモンの影響、食餌因子、環境因子、遺伝的因子なども複雑に関わりあっていることが充分想像される。これらの問題の解決には、野生ウッドチャックを使用していたのでは問題が多いことが、今回の検索結果からも明らかである。それにはまず実験動物化させ、系統化を図り、疾患モデル動物として確立させた上で、初めて可能となるであろう。

稿を終るに当たり、ウッドチャック実験に御協力戴いてい
るニューヨーク州立コーネル大学獣医学部臨床科学教授
Bud. C. Tennant 博士に深謝する。更に寄生虫種の同定を
お願いした国立予防衛生研究所寄生虫部室長影井 昇博士
に、また御校閲を願った同病理部長倉田 毅博士に、および
実験に御協力された児玉栄夫先生、原嶋綾子女史、原田佳子
嬢の各位に感謝する。本論文の要旨は第20回日本肝臓学会
総会、第73回日本病理学会総会および第1回日本疾患モデ
ル動物研究会にて発表した。また本研究は昭和60年度、61年
度文部省科学研究費奨励研究(A)、昭和60年度日米医学協
力研究会肝炎専門部会海外派遣費、並びに財団法人内藤記
念科学振興財団の助成によった。ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Snyder RL: Hepatomas of captive woodchucks. *Amer J Pathol* 52: 32—33, 1968
- 2) Summers J, Smolec JM, Snyder R: A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks, *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4533—4537, 1978
- 3) 阿部賢治: ヒトウイルス肝癌の疾患モデル動物—ウッドチャック—に関する研究。日本疾患モデル動物研究会記録 1: 61, 1985
- 4) 阿部賢治, 倉田 毅, 志方俊夫: ウッドチャック肝炎, 肝癌に関する研究: 第2報, 過形成増殖巢の解析, 第76回日本病理学会総会講演, 1986
- 5) Rabes HM, Scholze P, Jantsch B: Growth kinetics of diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient "preneoplastic" liver cell populations in vivo and in vitro. *Cancer Res* 32: 2577—2586, 1972
- 6) Anthony PP: Precursor lesions for liver cancer in humans. *Cancer Res* 36: 2579—2583, 1976
- 7) Summers J, Smolec JM, Werner BG, et al: Hepatitis B virus and woodchuck hepatitis virus are members of a novel class of DNA viruses. *Viruses in naturally Occurring Cancer* 7: 459—470, 1980
- 8) Roth L, King JM, Tennant BC: Primary hepatoma in a woodchuck (*Marmota monax*) without serologic evidence of woodchuck hepatitis virus infection. *Vet Pathol* 21: 607—608, 1984

Pathological study of liver disease in woodchucks

Kenji ABE, Ikuyoshi UCHINO, Matsu TOMITA* and Toshio SHIKATA**

The livers of 40 wild woodchucks were examined pathologically. In woodchuck hepatitis virus (WHV)-positive 29 animals, all animals had lesions characteristic of viral hepatitis (28 of these had chronic persistent hepatitis occasionally associated with ground-glass hepatocyte and one had chronic active hepatitis) and 26 had Shikata's orcein positive staining. In such cases, formation of filaments, enveloped particles and aggregation of noncoated core particles were found in the cytoplasm of hepatocyte under the electron microscopy. 18 of animals with WHV infection had hepatocellular carcinoma associated with chronic persistent hepatitis and hyperplastic foci of hepatocyte. In addition, 7 animals without hepatocellular carcinoma had also hyperplastic foci. These hyperplastic foci were considered as potential precursors of hepatocellular carcinoma, and the results suggested that woodchuck hepatoma may develop multicentric. On the other hand, in WHV negative 11 animals, there were no significant pathological changes. 7 of 40 animals had parasitic infection (6 had *C. hepatica* and one had *T. mustelae*) in the liver.

* Department of Pathology, National Institute of Health (Tokyo)

** Department of Pathology, Nihon University School of Medicine (Tokyo)