<短 報>

遺伝性肝炎 (LEC) ラットに出現する 巨大肝細胞の核 DNA の解析

藤本 佳範 小山田正人 服部 淳夫 高橋 秀俊
佐藤 昌明 伝法 公麿 森 道夫* 増田 隆一**

はじめに：遺伝性肝炎 (Long-Evans with a cinnamon-like coat color : LEC) ラット¹⁾は、最近開発樹立された疾病モデル動物である。生後約4カ月になると何の誘因もなく突然、黄疸を発現し、約1週間以内に半数が肝不全で死亡する。残りの半数は肝炎から徐々に回復し、1年以上長期生存した個体には、高率に肝癌が発生する。このように LEC ラットはヒトの劇症肝炎、及び肝炎から肝癌へ進展する過程を研究する上で、有用なモデル動物である。

この LEC ラットにみられる肝炎の組織学的特徴は、肝細胞の核と細胞質の著しい巨大化であるが、超微構造的には異常な物質の蓄積は認められない²⁾。肝炎の初期に肝細胞の細胞分裂像がみられるにもかかわらず、肝細胞の巨大化が目立つことから、細胞分裂の過程になんらかの障害が起こっている可能性が考えられる。今回、我々は肝炎発症時の巨大肝細胞について propidium iodide を用いた flow cytometry により、核 DNA 量を測定し、肝細胞の巨大化の原因について検討した。

材料および方法：1. 動物：LEC ラットは北海道大学実験生物センターげっ歯飼育部で開発樹立され、近交系で維持されている Long-Evans 系ラットで、生後5カ月齢の肉眼的に黄疸を呈したラット5匹(雌3匹、雄2匹)を用いた。

2. 方法：肝細胞の分離は collagen digestion method³⁾に、核 DNA の染色は detergent-trypsin method⁴⁾に従った。まず、collagenase により分離浮遊した肝細胞を DMSO と trypsin により裸核とし、propidium iodide により染色した。核 DNA 量の測定には flow cytometry EPICS-C を用いた。光顕用標本は、同一ラットについて肝細胞分離前に肝左外側葉を切除し、Carnoy 液で固定した。なお、対照としては、

LEC と同時に分離されながらも肝炎を発症しない Long-Evans with an agouti-coat color (LEA) ラットを用いた。

結果：黄疸を呈した5カ月齢のラットは、ほぼ同様の肝組織像及び核 DNA 量を示したので、そのうちの1匹の結果を提示する。

1. 肝組織所見：小葉構造の著しい乱れは認められないが、肝細胞の核と細胞質に著しい巨大化が認められ、一部の巨大核には偽封入体も存在した。好酸性の斑状壊死に陥った肝細胞や、胆汁や赤血球を貪食した Kupffer 細胞が認められたが、炎症細胞浸潤は軽度であった (Fig. 1)。小葉周辺には偽胆管や、胆管上皮様の細胞“oval cell”，小型の再生肝細胞の増生が認められた。

2. Flow cytometry による核 DNA 量の測定：上記の組織像を示す肝から得られた細胞の核 DNA 量を測定した。Fig. 2a はその核 DNA 量のヒストグラムであるが、各ピークはほぼすべて $2n$ の指数倍領域にの

Fig. 1 Histology of the liver of 5 month-old LEC rat. Many enlarged hepatocytes with large nuclei are observed.

* 札幌医科大学病理学教室

** 北海道大学理学部染色体研究所

Fig. 2 DNA histograms of liver nuclei of 5 month-old LEC rat. B; DNA histogram transformed to logarithms.

み存在した。このヒストグラムを対数に変換すると、Fig. 2bのように2n, 4n, 8n, 16n, 32n, 64nまでの各 polyploid にピークが存在する多峰性のヒストグラムがえられた。各 polyploid の核の比率は2n-40.6%, 4n-29.5%, 8n-13.0%, 16n-10.7%, 32n-4.9%, 64n-1.3%であった。また、核DNA量は核の大きさに相関して増加していた。同月齢のLEAラットでは2n-34.6%, 4n-62.2%, 8n-3.1%, 16n-0.1%と、それ以上の polyploid はみられなかった。

考察：今回の実験結果より、LECラットの肝炎発症時に出現する肝細胞の巨大核では、DNA量の増加が起きていることが明らかとなった。そして、DNA量の増加はaneuploidyではなく、polyploidyによるもので、非常に高いクラス（-64n）まで出現することが

分かった。

正常ラット肝細胞の polyploidy は、生理的には老化に伴って出現し、また実験的には、2/3部分肝切除などによる著しい増殖刺激を加えた場合に認められている⁹⁾。しかし、それらの場合、DNA量はせいぜい16n位程度であり、肝炎発症時のLEC肝に見られるような著しい polyploidy は、非常に稀な現象である。

これまで、polyploidy が出現する機序としては、(1) DNA合成期(S期)を経て細胞分裂期(M期)に入るが、細胞質分裂が起こらず、2核細胞が形成され、引き続いて2核細胞の核の融合が起こったり、あるいはM期のtelophaseにおいて染色体の融合が起こるために、polyploidy が形成される可能性、(2) S期を経るものの、M期に入らず、polyploidy の形成される可能性などが考えられている。LECラットの肝細胞においては、肝炎の発症に先立ち2核細胞の有意の増加が観察されており、細胞質分裂の障害による2核細胞の増加が polyploidy の出現に重要な役割をしていると考えられる。

LECラットにおける肝炎発症の原因は不明であるが、単一遺伝子に支配され、常染色体劣性遺伝に従うことが明らかにされている⁹⁾。今回は5カ月齢のデータのみを示したが、LECラット肝では生後まもなくより、polyploid の出現がみられる(未発表データ)ことより、細胞周期の異常が肝炎発症と密接に関連している可能性もあり、LECラット肝細胞の増殖因子への反応性を含めて、現在検討中である。

索引用語：肝炎モデル動物、DNA、flow cytometry
文 献：1) Yoshida MC, et al: J Hered 78: 1987(in press) 2) 伝法公鷹, 他: 日本毒性病理学会誌 1988(in press) 3) Berry M, et al: J Cell Biol 63: 506-520, 1969 4) Vindeløv LL, et al: Cytometry 3: 323-327, 1983 5) 松田健志, 他: 肝臓 27: 1303-1312, 1986 6) Masuda R, et al: Lab Anim (in press)

DNA analysis of megalocytic hepatocytes in LEC rats

Yoshinori FUJIMOTO, Masahito OYAMADA, Atsuo HATTORI, Hidetoshi TAKAHASHI,
Masaaki SATOH, Kimimaro DEMPO, Michio MORI*
and Ryuichi MASUDA**

* Department of Pathology, Sapporo Medical College (Sapporo)

** Chromosome Research Unit, Faculty of Science, Hokkaido University (Hokkaido)