<原 著>

肝炎自然発症 Long Evans Cinnamon (LEC) ラットの 長期生存例における慢性肝炎から肝癌への進展

波江野 力*** 武市 紀年* 小中 重夫* 伝法 公磨***
森 道夫*** 内野 純一** 小林 博*

要 旨: 肝炎自然発症 LEC (Long Evans Cinnamon) ラットの長期生存例が, 慢性肝障害 (慢性肝炎) から肝癌自然発生に至る過程を LEA (Long Evans Agouti) ラットを対照として諸化学検査および病理組織学的に検索した。

その結果, LEC ラットは有意の高頻度で貧血を合併するとともに腎機能の異常も認められ, 免疫能の低下も示唆された。肝機能は臨床生化学的に慢性肝障害型であり, 組織学的には斑状肝細胞壊死像と再生小型肝細胞をみる慢性肝炎像であった。しかも LEC ラットの肝発癌過程には, 化学発癌過程と同様な oval cells, hyperplastic foci, hyperplastic nodules が認められ, 生後18カ月齢以降の LEC ラットは全例で肝細胞癌を自然合併した。

以上の結果から, 長期生存 LEC ラットが慢性肝炎から肝癌に移行していく過程が諸化学検査および病理組織学的に確認された。

索引用語: LEC ラット 急性肝炎 慢性肝炎 肝癌

緒 言

著者らは既に肝炎自然発症 LEC (Long Evans Cinnamon) ラットが樹立され¹⁾, その肝炎発症原因の検索²⁾および複合免疫不全の合併³⁾について報告した。

その後の検索で, 急性肝炎発症後の軽快例あるいは慢性化例および急性肝炎非発症例を含めた長期生存 LEC ラットが臨床生化学的および病理組織学的に慢性肝炎あるいは慢性肝障害に移行し, 生後1年以降のラットの大多数で肝癌を自然発症することが判明した。

近年, Woodchuck (*Marmota monax*) が hepadna viruses に属する woodchuck hepatitis virus (WHV) に持続感染し, WHV 陽性の Woodchuck においては肝細胞癌の発生率が高いことが知られている⁴⁾。しかし, LEC ラットにおいては既に報告しているように²⁾, 肝炎発症にウイルスの関与は否定的である。

本稿においては, 長期生存 LEC ラットの肝発癌過程における諸化学検査および病理組織像を中心に述べる。

る。

材料と方法

ラット: 北海道大学実験生物センターにおいて分離樹立された LEC ラットのうち, 急性肝炎発症期の4~5カ月齢以降の長期生存ラットを用いた。本実験に供した LEC ラットは33~38世代である。対照としては同年齢の LEA (Long Evans Agouti) ラットを用いた。

定性的尿化学検査: 尿中のビリルビン, 蛋白その他は, マルチスティックスIII (マイルス・三共株式会社) を用いた。

血液化学検査: 各被検ラットの左または右頸部静脈を23G 針で穿刺して4~5ml の末梢血液を採取して, 約1ml を EDTA-2K 塩加容器に分注し血球計算に使用した。残りの血液は遠沈 (2,000rpm, 30分) して血清に分離したあと一般生化学検査用に供した。

血球計算等 (WBC, RBC, Plt, Ht, Hb) は自動血球計数器 (シスメックス東亜医用電子社製の E-4000: 抵抗方式) を用いて求めた。網状赤血球 (Ret) は Brecher 法で求めた。

一般生化学検査: 被検血清の採取は前述の通りである。total bilirubin (T. Bil) は安定化ジアゾニウム塩

* 北海道大学医学部癌研病理

** 北海道大学医学部第1外科

*** 札幌医科大学医学部病理

法で, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) および lactate dehydrogenase (LDH) は紫外部吸収法で, alkaline phosphatase (Alp) は Bessey-Lowry 法で, creatinin (Crt) は Jaffe 法で, blood urea nitrogen (BUN) は urease-indophenol 法で, albumin (Alb) は BCG 法で, total cholesterol (T. Chol) は酵素法で求めた。測定機器はいずれも TBA-60R (東芝メディカル) を用いた。血清蛋白分画はセルロース・アセテート膜電気泳動法 (ADC-800; KAYAGAKI) で求めた¹⁾。

次いで, 平均 6 カ月齢の LEC および LEA ラットを用いジアグノグリーン溶液 (第一製薬 KK) を 5mg/kg 体重の割合で尾静脈より静注して, 血中 indocyanine-green 15 分停滞率 (ICGR₁₅) を検量線から測定した。

免疫学的検査

a) Immunoglobulin G (IgG) および Immunoglobulin M (IgM) の測定

平均 10 カ月齢の LEC および同月齢の LEA ラットの血清を用い, 報告¹⁾のように Mancini の方法に準拠した single radial immunodiffusion assay 法で IgG および IgM を測定した。

b) Blastogenesis の測定

平均 10 カ月齢の LEC および同月齢の LEA ラットの脾細胞を求め 5×10^6 /ml に調整した。あらかじめ phytohemagglutinin-P (PHA-P) を 200mg/ml, concanavalin A (Con A) を 100mg/ml, lipopolysaccharide (LPS) を 2mg/ml に調整し, さらに 2 段階に希釈して各 mitogen を 3 種類の濃度とした。96 well の flat bottom microplate (Corning 社) に脾細胞を各 100 μ l および 3 種類の濃度の PHA-P, Con A あるいは LPS を各 100 μ l ずつ入れ, さらに control として 100 μ l の脾細胞に 100 μ l の complete medium を加えたものを作製した (triplicate)。この microplate を 37°C, 5% CO₂ の incubator 内に静置して 3 日間培養し, 培養終了 18 時間前に 0.5 μ Ci (20 μ l/well) の [methyl-³H] THYMIDINE (³H-TdR) (Amersham 社) を加えた。測定は液体 scintillation counter を用い, ³H-TdR の取り込み率を求めた。

組織病理学的検査: 各時期の LEC ラットを犠牲死せしめ, 剖検して肉眼的に観察した。次いで, 肝組織は Carnoy あるいは Bouin 氏液で固定したあと Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を, アセトンで固定したあと免疫組織学的染色を, あるいは glutaraldehyde-formalin 混合液で固定したあと電子顕微鏡の検索を

施行した。

抗 glutathione S-transferase placental form (GST-p) 抗体は Sato et al.⁵⁾ のものを, 抗 α -fetoprotein (AFP) 抗体は Dempo et al.⁶⁾ の作製したものをを用いて免疫組織学的 (ABC 法) に検索した。

統計学的処理: 結果は Mean $\pm$ S.D. で表わし, 各群間の有意差検定には Student's t-test を用いた。

結 果

LEC ラットについては, セルロース・アセテート膜電気泳動法にて血清蛋白分画を調べ γ -globulin 分画をデンストメーターが感受しえたものを γ -glob (+) 群 (56 頭), 感受しえなかったものを γ -glob (-) 群 (40 頭) に分けて随時整理した。LEA ラットの γ -globulin は全例において陽性であった。

(1) 定性的尿化学検査

97 頭の LEC ラットのうち, 93 頭 (97%) が尿蛋白陽性 (1+~2+) で, 41 頭 (42%) が尿中ビリルビン陽性 (1+) であった。対照の LEA ラット (n=50) はいずれも正常であった。

(2) 血液化学検査 (Table 1)

WBC は, LEC ラットのうち γ -glob (+) 群 (n=26), γ -glob (-) 群 (n=20), LEA ラット (n=16) の間に有意差は認められなかった。

RBC, Plt および Ht は, γ -glob (+) 群 (n=26), γ -glob (-) 群 (n=20) の間に有意差はなかったが, LEC ラットの RBC は LEA ラット (n=16) に比較して有意 ($p < 0.001$) に減少していた。

Hb は, γ -glob (+) 群 (n=26), γ -glob (-) 群 (n=20) の間に有意差 ($p < 0.05$) を認めた。一方, LEC ラットの Hb は LEA ラット (n=16) に比較して両群とも有意 ($p < 0.005$) に減少していた。

Ret は, γ -glob (+) 群 (n=11), γ -glob (-) 群 (n=11) の間に有意差はなかったが, LEC ラットの Ret は LEA ラット (n=15) に比較して有意 ($p < 0.025$) に増加していた。

以上の実験結果により, LEC ラットは有意の高頻度で貧血を合併していることが判明し, Ret の有意な増加はこの貧血を代償しているものと考えられた。

(3) 一般生化学検査 (Table 2)

肝酵素系の検査値である GOT, GPT, LDH, Alp は, LEC ラットのうち γ -glob (+) 群 (n=52~56) および γ -glob (-) 群 (n=38~40) の間に有意差はなかったが, LEA ラット (n=17) に比較していずれも有意 ($p < 0.001$) に上昇していた。

Table 1 Comparison of hematological data in long surviving LEC and age-matched LEA rats^a.

Items	LEC		LEA	P-value ^c
	γ -globulin(+) ^b	γ -globulin(-) ^b		
WBC (/mm ³)	11684 $\pm$ 3872 ^a (26) ^e	10605 $\pm$ 3136 (20)	10138 $\pm$ 2681 (16)	n.s. ^f
RBC ($\times 10^4$ /mm ³)	652.0 $\pm$ 111.2 (26)	706.0 $\pm$ 66.8 (20)	799.6 $\pm$ 53.9 (16)	0.001
Plt ($\times 10^4$ /mm ³)	65.2 $\pm$ 21.1 (26)	62.3 $\pm$ 18.2 (20)	93.7 $\pm$ 12.8 (16)	0.001
Hb (g/dl)	12.0 $\pm$ 1.6 (26)	12.8 $\pm$ 0.8 (20)	14.2 $\pm$ 1.6 (16)	0.005
Ht (%)	32.1 $\pm$ 6.1 (26)	34.7 $\pm$ 3.6 (20)	44.2 $\pm$ 1.6 (16)	0.001
Ret (%)	22.8 $\pm$ 8.6 (11)	22.4 $\pm$ 8.3 (11)	14.9 $\pm$ 3.0 (15)	0.025

^a These LEC rats survived for over eight months, the mean age of which was ten months and LEA rats were age-matched.

^b γ -globulin(+) meant for cellulose-acetate electrophoresis to have sensitivity to the γ -globulin fraction of serum protein but γ -globulin(-) meant for it not to have sensitivity to the γ -globulin fraction.

^c by Student's t-test

^d Mean $\pm$ Standard Deviation

^e Number of the rats used

^f not significant

Table 2 Comparison of biochemical data in long surviving LEC and age-matched LEA rats^a.

Items	LEC		LEA	P-value ^c
	γ -globulin(+) ^b	γ -globulin(-) ^b		
T.Bil (mg/dl)	0.31 $\pm$ 0.09 ^d (27) ^e	0.27 $\pm$ 0.08 (21)	0.31 $\pm$ 0.10 (17)	n.s. ^f
GOT (K.U)	249 $\pm$ 75 (56)	241 $\pm$ 52 (40)	136 $\pm$ 36 (17)	0.001
GPT (K.U)	141 $\pm$ 65 (56)	137 $\pm$ 46 (40)	42 $\pm$ 5 (17)	0.001
LDH (Wrob.U)	3049 $\pm$ 1947 (52)	3050 $\pm$ 1616 (38)	1637 $\pm$ 876 (17)	0.001
Alp (K.A.U)	34.8 $\pm$ 9.9 (53)	32.8 $\pm$ 8.3 (38)	11.1 $\pm$ 2.3 (17)	0.001
T.Chol (mg/dl)	42.0 $\pm$ 14.8 (48)	40.8 $\pm$ 14.6 (36)	69.4 $\pm$ 10.2 (17)	0.001
Crt (mg/dl)	0.90 $\pm$ 0.20 (47)	0.85 $\pm$ 0.20 (38)	0.49 $\pm$ 0.03 (17)	0.001
BUN (mg/dl)	26.5 $\pm$ 2.5 (45)	26.7 $\pm$ 2.1 (34)	21.0 $\pm$ 1.8 (17)	0.001
Alb (g/dl)	2.6 $\pm$ 0.3 (50)	2.7 $\pm$ 0.2 (34)	3.9 $\pm$ 0.3 (17)	0.001

^a These LEC rats survived for over eight months, the mean age of which was ten months and LEA rats were age-matched.

^b γ -globulin(+) meant for cellulose-acetate electrophoresis to have sensitivity to the γ -globulin fraction of serum protein but γ -globulin(-) meant for it not to have sensitivity to the γ -globulin fraction.

^c Statistical difference assessed by Student's t-test to compare mean value between LEC and LEA rats.

^d Mean $\pm$ Standard Deviation

^e Parenthesis indicated the number of rats used.

^f not significant

T.Chol は, LEC ラットの γ -glob (+) 群 (n=48) および γ -glob (-) 群 (n=36) の間に有意差はなかったが, LEA ラット (n=17) に比較して有意 (p<0.001) に減少していた。

腎機能の検査値である Crt, BUN は, LEC ラットの

γ -glob (+) 群 (n=45~47) および γ -glob (-) 群 (n=34~38) の間に有意差はなかったが, LEA ラット (n=17) に比較していずれも有意 (p<0.001) に上昇していた。

Alb は, LEC ラットの γ -glob (+) 群 (n=50) お

および γ -glob (－) 群 (n=34) の間に有意差はなかったが、LEA ラット (n=17) に比較して有意 ($p<0.001$) に減少していた。

ICGR₁₅ (mg/dl) は、平均 6 カ月齢の LEC ラット (n=35) は同月齢の LEA ラット (n=7) に比較して有意 ($p<0.01$) に高値をとり ICG の停滞が認められると同時に、GPT および T. Bil も上昇していた (Table 3)。

(4) 免疫学的検査

a) 血清 IgG (mg/dl) は、 γ -glob (+) 群 (n=16), γ -glob (－) 群 (n=13) で全く同一の結果を得たが、LEA ラット (n=12) に比較して有意 ($p<0.001$) に減少していた (Table 4)。

b) 血清 IgM (mm²) は、 γ -glob (+) 群 (n=16), γ -glob (－) 群 (n=13) および LEA ラット (n=12) の間に有意差はなかった (Table 4)。

c) Blastogenic response はまず、mitogen の代わり

に complete medium を加えた control について観ると、LEC ラットは γ -glob (+) 群 (n=5) および γ -glob (－) 群 (n=5) の ³H-TdR の取り込みに有意差はない。しかし、LEA ラット (n=5) の取り込みは LEC ラットの約 3 倍であり、LEC ラットの脾細胞は mitogen の存在しない状態では幼若化能が有意に低値であった。次に、各 mitogen に対する脾細胞の ³H-TdR の取り込みを単純に観ると、LEC ラットは LEA ラットに比較して各濃度において全て有意に低値をとっていた。しかし、control 値に対する比、即ち stimulation index (S.I.) で評価すると以下ようになる。PHA-P に対する S.I. は、LEC ラットの γ -glob (+) 群と LEA ラットの間に有意差はないが、 γ -glob (－) 群では前 2 群に比較して有意に低値をとった。Con A に対する S.I. は 50mg/ml および 100mg/ml の 2 種類の濃度において、LEC ラットは LEA ラットに比較して有意に高値を認めた。LPS に対する S.I. は、LEC および LEA ラット間に有意差は認められなかった (Table 5)。

(5) 病理学的検索

a) 肉眼的所見

急性肝炎期の 4～5 カ月を経過した LEC ラット (n=114) は生後 6～10 カ月にわたって肝に肉眼的な異常を認めることはできなかった。しかし生後 1 年前後から腹部は膨隆し始め少数例において触診で腫瘤を触知しうようになる。肝は全体的に腫大し、肝表面の光沢は鈍化して微細顆粒状の変化を認めるようになる。これらの変化は肝分葉による差はなく、色調は赤かっ色で軟らかく、正常と考えられる他部位に比して悪性の印象は少ない。

Table 3 Comparison of ICGR₁₅, GPT and T.Bil in LEC and LEA rats^a.

Items	LEC (35) ^b	LEA (7)	P-value ^c
ICGR ₁₅ (mg/dl)	1.25±1.56 ^d	0.50±0.16	0.01
GPT (K.U)	221.7±140.4	40.7±8.0	0.001
T.Bil (mg/dl)	0.45±0.19	0.29±0.03	0.001

^a All the LEC rats survived from acute hepatitis (systemic jaundice), the mean age of which was six months and LEA rats were age-matched.

^b Parenthesis indicated the number of rats used.

^c by Student's t-test

^d Mean±Standard Deviation

Table 4 Comparison of serum IgG and IgM level in long surviving LEC and LEA rats.

Items	LEC		LEA	P-value ^c
	γ -globulin(+)	γ -globulin(－)		
IgG (mg/dl)	3.0±1.0 ^d (16) ^e	3.0±1.0 (13)	17.2±2.7 (12)	0.001
IgM (mm ²)	390±104 (16)	425±230 (13)	376±78 (12)	n.s. ^f

^a These LEC rats survived for over eight months, the mean age of which was ten months and LEA rats were age-matched.

^b γ -globulin(+) meant for cellulose-acetate electrophoresis to have sensitivity to the γ -globulin fraction of serum protein but γ -globulin(－) meant for it not to have sensitivity to the γ -globulin fraction.

^c by Student's t-test

^d Mean±Standard Deviation

^e Parenthesis indicated the number of rats used.

^f not significant

Table 5 Blastogenic response^a of spleen cells to PHA-P, Con A and LPS^b in long survived LEC and age-matched LEA rats^c.

Mitogen	Concentration (mg/ml)	Strains of rats		
		LEC(+) ^d	LEC(-) ^d	LEA
PHA-P	200	30492±11733 (8.0±3.1) ^e	14556±1555 (3.5±0.4)	101276±14149 (7.4±1.0)
	100	19697±4373 (5.1±1.1)	9656±1236 (2.3±0.3)	65517±4628 (4.8±0.3)
	50	12903±2438 (3.4±0.6)	5988±1471 (1.4±0.4)	55729±2981 (4.0±0.2)
Con A	100	73441±7165 (19.2±1.9)	72552±20883 (17.4±5.0)	143015±12160 (10.4±0.9)
	50	48409±4634 (12.6±1.2)	38710±16070 (9.3±3.9)	90888±15295 (6.6±1.1)
	25	10178±6383 (2.7±1.7)	9227±6344 (2.2±1.5)	36109±14752 (2.6±1.1)
LPS	2	3973±1379 (1.04±0.36)	3181±66 (0.76±0.02)	15085±1989 (1.09±0.14)
	1	3709±967 (0.97±0.25)	2549±110 (0.61±0.03)	11116±2188 (0.81±0.16)
	0.5	2067±475 (0.54±0.12)	1698±103 (0.41±0.02)	7755±3242 (0.56±0.24)
Control		3828±2208	4166±2597	13779±1102

^a Blastogenic response was measured by up-take (cpm) of ³H-TdR.

^b PHA-P; Phytohemmagglutinin-P, Con A: Concanavalin A, LPS; Lipopolysaccharide

^c The mean age of LEC and LEA rats used was ten months (eight to twelve months).

^d For cellulose-acetate electrophoresis to have sensitivity to the γ -globulin fraction of serum protein was positive in LEC (+) and negative in LEC (-).

^e Parenthesis indicated Stimulation Index (=Experiment cpm/Control cpm).

生後1年半以上になると、肝はさらにび漫性に強く腫大し、腹部触診にてはっきりと腫瘤として認識することが可能な症例が多くなり、なかには長径6~7cmの大きさになることもある。び漫性に強く腫脹した肝表面は光沢に乏しく広範囲の微細顆粒状の変化の中に結節状隆起部を認めるようになる。正常肝組織と考えられる色調は残存するが、あくまでも島状に存在するのみである。この微細顆粒状の変化の中に散在性の白色~灰白色の病変が出現する。その境界は不規則かつ不明瞭で、硬度もきわめて大であり肉眼的に肝癌と判断しうる程になる。

転移の合併率は決して多くはないが、転移を来す部位は肺が主である。肺転移は左右肺に多発性に径2~3mm大から径5~6mm大の大きさの結節として認められる。また腸間膜リンパ節が累々と腫脹し、1.5×3.0cm大になるものもある (Fig. 1)。

b) 組織病理学的所見

① 慢性肝障害 (慢性肝炎) 期の肝組織所見

急性肝炎を発症後軽快した LEC ラットおよび黄疸

症状を呈さず急性肝炎期を経過した LEC ラットは、6 カ月以降少数例の再発例を除いて長期生存した。これらのラットでは脱落した肝細胞が認められるとともに、巨大肝細胞に隣接して小葉周辺部に胆管上皮様の細胞“oval cells”が認められ、これに接して円形核を有する小型の再生肝細胞が認められた (Fig. 2)。時には、好塩基性の細胞質を持ち、円形で小型の核をもつ肝細胞の集団が小葉周辺部に認められた。

② AFP 産生細胞の存在

Oval cell や小型肝細胞の増生を認める肝組織において、AFP 産生の有無を検索したところ、Fig. 3 に黒染して見られるように AFP 産生陽性細胞が認められた。

③ Hyperplastic foci (小増生巣) の存在

生後6カ月齢以降の LEC ラットにおいて、GST-p の有無を検索したところ、Fig. 4 に示したように、小型肝細胞の集団が陽性像を呈した。

④ Hyperplastic nodules (増生結節) の存在

生後12カ月齢前後の LEC ラットの肝組織を H.E.

Fig. 1 Laparotomized findings in the LEC rat with spontaneous liver cancer. The liver was markedly enlarged, especially the left lateral lobe, and its surface was matt and granular. In the liver, the white coloured cancerous lesions were detected with metastatic lung tumors. Mesenteric lymphnodes were also swelling.

Fig. 2 Chronic hepatitis (H.E., ×170). Oval cells and small hepatocytes were observed with necrotic and giant hepatocytes.

染色下に観察すると、Fig. 5 に示したような hyperplastic nodule が認められた。明るい細胞質と小型の円形核を持つ細胞集団が周辺の大型の核を持つ肝細胞に対して圧排性に増殖している。

以上の所見は、アゾ色素などの癌原性物質による肝発癌過程において認められる前癌病変の所見と一致する所見と考えられた。

⑤ 肝細胞癌の光顕的所見

LEC ラットは生後 1 年半頃になると肉眼的にも組織学的にも肝癌を指摘することができるようになる。LEC ラットに認められる肝細胞癌は高分化型の索状

Fig. 3 AFP-producing cells (ABC method, ×170). Dark staining cells were AFP-positive cells.

Fig. 4 GST-p positive cells (ABC method, ×170). Hyperplastic foci were detectable.

Fig. 5 Hyperplastic nodule (H.E., ×170). This nodule grew, expanding the neighbouring hepatocytes with large nuclei. Nuclei in the nodular cells were rather small.

型肝癌 (Edmondson 分類: I ~ II 型) がほとんどである。

Fig. 6 Hepatocellular carcinoma (H.E., $\times 170$). Trabecular hepatocellular carcinoma cells which had relatively low grade of atypia and well differentiated type were observed.

Fig. 8 Electromicroscopic findings of the hepatocellular carcinoma cell (EM, $\times 7,000$). Mitochondria were various in size, rough surfaced endoplasmic reticulum were well developed, and peroxysome and glycogen were also observed.

Fig. 7 Cholangiofibrosis (H.E., $\times 170$). Many ductal canals were formed and fibroblasts grew around them. Secondary inflammatory cells were also infiltrated.

索状型肝癌の腫瘍細胞は円形核を有し、豊富な細胞質を保有している。核の多型性および異型性は比較的乏しく、肝癌細胞は索状に配列し正常肝組織に類似した構造をとり、その周囲を少量の線維性間質で取り囲まれているが小葉構造は明瞭ではない (Fig. 6)。

LEC ラットにおいては、明らかな肝細胞癌と考えられる病変のほかに、胆管線維症(cholangiofibrosis)も認められ、肝を広汎に占拠する症例も存在した。線維性結合組織の著明な増生を背景にして大小不同の胆管構造を呈している。胆管上皮細胞と考えられる細胞の異型性も症例ごとあるいは同一個体によっても様々であり、炎症性細胞浸潤は軽度～高度まで種々である。しかし、これらの細胞は混合型肝癌あるいは腺癌に認め

られる上皮性腫瘍細胞の髄様あるいは無構造な増生は認められない (Fig. 7)。

⑥ 高分化型肝細胞癌の電顕像

癌細胞はグリコーゲンやペルオキシゾームを有し、隣接の細胞と毛細胆管を形成し高分化型の肝細胞癌であった。また、ミトコンドリアに大小不同は存在するが、顆粒小胞体はよく発達していた (Fig. 8)。

以上の肝組織病理学的所見は LEC ラットにおいてのみ特異的に認められる所見であり、対照群の LEA ラットにはこれらの異常所見は今日に至る迄、全く認められていない。

考 察

LEC ラットは、晩発性にかつ高率に急性肝炎を自然発症するだけでなく、諸々の病態を内包している。既に報告したように急性肝炎発症前の LEC ラットは貧血¹⁾や複合免疫不全³⁾を合併している。

この急性肝炎期を経過した LEC ラットは長期観察中に容易に眼瞼結膜の貧血を指摘することが可能である。RBC, Hb, Ht は対照の LEA ラットに比較して明らかに有意な低値をとり、眼瞼結膜の貧血症状と合致する所見である。しかも、Ret は LEC ラットでは LEA ラットに比して有意上昇を示し、貧血に対する代償と考えられた。しかもこの貧血は平均赤血球恒数(MCV, MCH, MCHC)および塗抹像(データ未発表)から考えて小球性低色素性貧血と考えられる。この貧血が何を原因として惹起したのかは不明である。血中 T. Bil は LEA ラットとともに正常域内にあり、溶血性貧血

は考え難い。また、LEC ラットは Plt の有意な減少を呈しているが WBC はこの両系ラット間に有意差は存在しない。しかし、LEC ラットは免疫抑制状態にあるから容易に細菌感染状態になりうるものと考えられる。従って WBC は細菌感染に基づく反応性の上昇と推測することが可能であり、しかも Ret の有意上昇から骨髓機能が正常と考えれば WBC の上昇は首肯しうる。この仮定が妥当とするなら長期生存 LEC ラットは、LEA ラットに比較して相対的汎血球減少症(relative pancytopenia) を呈していることになり、ヒト肝硬変の臨床生化学所見と様相を一にすることになりうる。ところで、一般生化学検査のうち肝酵素系の値(GOT, GPT, LDH, Alp) は LEC ラットでは LEA ラットに比較して有意に上昇しており、肝障害の存在は明白である。しかも、T. Chol の有意低下は、LEC ラットが慢性持続性の肝障害を有していることを示しているものと考えられる。また、血中 ICGR₁₅ は急性肝炎から軽快するにつれ速やかに正常化することが知られているが、急性肝炎期の 4~5 カ月を過ぎた平均 6 カ月齢の LEC ラットの ICGR₁₅ は LEA ラットに比較して有意に高値をとっており、しかも GOT, T. Bil 値の上昇と相関している。これは、LEC ラットが急性肝炎から軽快した後も肝障害が引き続き持続して存在していると考えたことの妥当性を示している。

次いで、この臨床生化学的データの裏づけとなる組織学的所見について考察する。

LEC ラットは生後 2 カ月齢ごろから肝障害の存在が推測され、4~5 カ月齢に急性肝炎を呈することは既に述べた¹⁾。この急性肝炎期を乗り切った LEC ラットは、肝細胞の斑状壊死と小型再生肝細胞を認め、ヒト慢性肝炎の組織所見と類似の所見を呈する。次いで、LEC ラットの肝組織には AFP 産生陽性細胞である oval cells が同定され、これは小型再生肝細胞の前駆細胞である小胆管上皮細胞(cholangiolar cell)と考えられている。さらに、月齢を経た LEC ラットは GST-p 染色にて肝組織中に hyperplastic foci を認め、続いて hyperplastic nodules へと経時的に移行していく。そして、ついに hepatocellular carcinoma に進展する。この過程はアゾ色素などの癌原性物質による肝発癌過程に類似した経過を示した⁶⁻¹¹⁾。LEC ラットに合併する肝癌の頻度について、Masuda ら¹²⁾は生後 18 カ月齢以上の LEC ラットは 100% であったと報告している。LEC ラットに臨床生化学上認められた肝障害の所見は組織学的所見と見事合致するものであった。しかし、

血液化学上推測された relative pancytopenia を裏づけるヒト肝硬変に類似する所見は遂に同定することはできなかった。人為的肝硬変モデルは多々報告されているが、ラットに肝硬変が自然合併したという報告は著者らの知る限りなされていない。LEC ラットの肝癌は多少の差はあれ、背景に胆管線維症を合併することが常である。またヒト肝癌は肝硬変を背景として発生することが多いと考えられている。従って、LEC ラットの肝癌に高頻度に認められる胆管線維症はヒト肝硬変に比肩しうる可能性を示唆しているものと考えられる。

さて、LEC ラットが急性肝炎から慢性肝炎を経由して肝癌に移行する原因は何であろうか。肝炎発症前の LEC ラットが複合免疫不全を合併している事実は既に述べた³⁾。長期生存 LEC ラットの免疫学的検索によると、LEC ラットの IgG は γ -glob (+) 群および γ -glob (-) 群で全く同じ値が得られ、しかも LEA ラットに比較して有意に低値であった。 γ -glob (-) 群の IgG 値が γ -glob (+) 群と同値であることは奇異に感じられる。 γ -globulin 分画の主成分は IgG であるが、IgG は γ 分画を主にして β , α_2 分画にまで分布しているから、 γ -glob (-) 群の IgG は γ 分画以外に分布していると考えられ、IgG の質的異常が推測される。しかし、松本ら¹³⁾は (LEC $\times$ LEA) F₁ $\times$ LEC backcross (BCI) ラットを作製し、BCI ラットの肝炎発症前の血中 Ig 含量を subclass 別に調べ、BCI ラットの肝炎発症と血中 IgG1, IgG2a 含量との間に相関性がないことを示した。しかし、彼はまた LEC ラットの慢性肝障害から肝腫瘍に至る過程に、免疫不全が関与している可能性は否定していない。

LEC ラットが、常染色体劣性遺伝様式に規定された遺伝的背景を有している事実も既に報告した²⁾。このような遺伝的背景を有しているラットでは代謝異常の有無を考慮すべきものと考えられる。LEC ラットには肝解毒系薬物代謝酵素である cytochrome P-450, epoxidehydrolase, γ -glutamyltranspeptidase, UDP-glucuronyltransferase が生後早期より異常であると指摘されている¹⁴⁾。

以上の如く、長期生存 LEC ラットは臨床生化学的および病理組織学的に慢性肝炎を併存するとともに免疫学的異常も内包し、しかもこの進行性の病態は常染色体劣性遺伝様式に規定された代謝異常を基盤にしてその終末像として肝癌に進展するらしい。LEC ラットの肝病変が急性肝炎—慢性肝炎—肝癌と推移するが故

にこそ、ヒトにおける急性肝炎—劇症肝炎あるいは慢性肝炎—肝硬変—肝癌の病態解明に貴重な情報を提供してくれる恰好のモデル動物となりうるであろう。

文 献

- 1) 波江野力, 武市紀年, 伝法公磨, 他: 肝炎自然発生 LEC (Long Evans Cinnamon) ラットの樹立. 日本外科学会雑誌, 90: 573—579, 1989
- 2) 波江野力, 武市紀年, 伝法公磨, 他: 肝炎自然発生 LEC (Long Evans Cinnamon) ラットにおける肝炎発生原因の検索. 日本外科学会雑誌, 90(5), 1989 (印刷中)
- 3) 波江野力, 武市紀年, 伝法公磨, 他: 肝炎自然発生 LEC (Long Evans Cinnamon) ラットにおける複合免疫不全の合併. 日本外科学会雑誌, 90(6), 1989 (印刷中)
- 4) Summers J, Smolec JM, Smyder R: A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchuck. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4533—4537, 1978
- 5) Sato K, Kitahara A, Sone Y, et al: Purification, induction and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3964—3968, 1985
- 6) Dempo K, Chisaka N, Yoshida Y, et al: Immunofluorescent study on alpha-fetoprotein producing cells in the early stage of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene carcinogenesis. *Cancer Res* 35: 1282—1287, 1975
- 7) Dempo K, Sasaki M, Kaku T, et al: Immunohistochemical studies on α -fetoprotein and albumin containing cells in the liver during ontogenesis and early stage of 3'-Me-DAB hepatocarcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 417: 195—202, 1983
- 8) Onoe T, Dempo K, Kaneko A, et al: Significance of α -fetoprotein appearance in the early stage of azo-dye carcinogenesis. *Gann Monogr. Cancer Res* 14: 233—247, 1973
- 9) Onoe T, Kaneko A, Dempo K, et al: α -fetoprotein and early histological changes of hepatic tissue in DAB-hepatocarcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 259: 167—180, 1975
- 10) Sell S, Leffert HL: An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2: 77—86, 1982
- 11) Mori M, Kaku T, Dempo K, et al: Histochemical investigation of precancerous lesions induced by 3'-Me-DAB in rat liver. *Gann Monogr Cancer Res* 25: 103—114, 1980
- 12) Masuda R, Yoshida MC, Sasaki M, et al: High Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma Development in LEC rats with Hereditary Hepatitis. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 79: 828—835, 1988
- 13) 松本耕三, 武市紀年, 泉 啓介, 他: 肝炎・肝癌ラット (LEC) における IgG 多型と肝炎との遺伝解析. 日本免疫学会総会・学術集会記録 17: 805, 1987
- 14) Sugiyama T, Takeichi N, Kobayashi H, et al: Metabolic predisposition of a novel mutant (LEC rats) to hereditary hepatitis and hepatoma; alterations of the drug metabolising enzymes. *Carcinogenesis* 9: 1569—1572, 1988

Transition from chronic hepatitis to liver cancer in long survived Long Evans Cinnamon (LEC) rats with spontaneous hepatitis

Tsutomu NAMIENO^{***}, Noritoshi TAKEICHI^{*}, Shigeo KONAKA^{*}, Kimimaro DEMPO^{***},
Michio MORI^{***}, Junichi UCHINO^{**} and Hiroshi KOBAYASHI^{*}

We investigate, with urinary, hematological, biological, immunological and histopathological examinations, the process from chronic liver disease to spontaneous liver cancers in long survived LEC rats in comparison with age-matched Long Evans Agouti (LEA) rats. We then got the following results.

LEC rats had the high frequent incidence of anemia, abnormal renal function and immuno-suppressive status. As for liver function, clinicobiochemical data showed the chronic liver dysfunction type and histopathology showed the figure of chronic hepatitis with both spotty necrotic and small regenerating hepatocytes.

Oval cells, hyperplastic foci and hyperplastic nodules were detected in the process of spontaneous hepatocarcinogenesis in LEC rats and all the LEC rats eighteen months after birth had liver cancers.

From these results, we speculated that the long survived LEC rats, regardless of whether acute hepatitis or not, suffered from continuous liver damage and chronic hepatitis, were worsened progressively and resulted in liver cancers.

^{*} Laboratory of Pathology, Cancer Institute, Hokkaido University School of Medicine (Hokkaido)

^{**} The First Department of Surgery, Hokkaido University School of Medicine (Hokkaido)

^{***} Department of Pathology, Sapporo Medical College (Sapporo)