〈短 報〉

高シトルリン血症と肝発癌に関する研究 —実験的肝発癌モデルにおけるシトル リンのプロモーター作用について—

中山 雅樹* 岡本 康幸** 森田 倫史* 松本 真*
福井 博* 中野 博** 辻井 正*

高シトルリン血症は、尿素サイクル酵素のうちの1つであるアルギノコハク酸合成酵素の欠損による稀な先天性代謝異常であり、その成人型では肝細胞癌の合併が高率（56例中8例，14%）にみられる。本症に合併する肝癌は、22歳から44歳までに分布し、比較的若年期に出現し、多くは肝硬変を合併しないなど、一般の肝癌の発症とは異なる発症様相を示している。そこでわれわれは、これまで主に初代培養肝細胞を用いた検討により、シトルリン（Cit）がラット肝細胞の増殖に対して促進的に作用し、高濃度では肝発癌のプロモーターとなり得ることを報告してきた¹⁾。今回はさらに Cit のプロモーター作用を *in vivo* ラット肝発癌モデルを用いて検討を行なったので報告する。

材料および方法：7週齢雄F-344ラット18匹を3群に分け使用した。すべての動物に diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内に200mg/kg 投与し、2週間後より0.03% 2-acetylaminofluorene (AAF) にて2週間飼育した後、引続き Control 群は基本食のみで、フェノバルビタール (PB) 群は基本食に0.05%PB 含有飼料で、Cit 群は基本食に5%Cit 含有飼料で、いずれも4週間飼育し、各群とも体重測定、採血後すべてのラットを屠殺し、肝を摘出した。肝重量の測定と肝の肉眼的観察を行なった後に肝切片を作製し、HE 染色および γ -GTP 染色を行なった。 γ -GTP 染色は、6 μ m の凍結切片を作製後直ちに Rutenberg ら²⁾の方法に準じて染色を行なった。また、ラットの血清酵素 (GOT, GPT, ALP) の測定および HPLC によるアミノ酸分析 (Cit, Ornithine) を行なった。

成績：Table に示す如く体重は Control 群に比べ PB 群は低く、Cit 群では増加を認めた。肝重量は PB

Table A : Body weight, liver weight and incidence of hyperplastic nodules in the liver. **B :** Serum liver-associated enzyme activities and amino acids levels.

A.					
Group	Effective No. of rats	Body weight (g)	Liver weight (g)	Incidence of hyperplastic nodules (%)	
Control	6	240.5 $\pm$ 16.6	9.3 $\pm$ 1.0	1/6	(16.7)
PB	6	206.5 $\pm$ 5.8**	9.7 $\pm$ 0.7	5/6	(83.3)*
Cit	6	265.6 $\pm$ 15.1*	10.2 $\pm$ 1.2	6/6	(100)*

*P<0.05, **P<0.005: compared with control

B.					
Group	GOT (IU/g)	GPT (IU/g)	ALP (IU/g)	Cit (nmol/mL)	Ornithine (nmol/mL)
Control	128.25 $\pm$ 27.83	61.25 $\pm$ 30.87	423.5 $\pm$ 136.03	68.05 $\pm$ 11.67	193.85 $\pm$ 40.52
PB	95.83 $\pm$ 10.19	44.83 $\pm$ 5.91	452.5 $\pm$ 125.66	82.37 $\pm$ 14.59	87.8 $\pm$ 22.38
Cit	91.5 $\pm$ 11.81	53.17 $\pm$ 6.97	587.5 $\pm$ 176.30	1602.93 $\pm$ 1292.55	248.23 $\pm$ 36.51

Data are expressed as mean $\pm$ SD

群、Cit 群いずれもやや増加傾向を認めた。肝表面および割面の肉眼的観察での過形成性結節の出現率は Control 群6匹中1匹 (16.7%) に対し、PB 群では6匹中5匹 (83.3%)、Cit 群では6匹中6匹 (100%) であり、PB 群、Cit 群では Control 群に比べて統計学的に有意に高率であった。血清酵素では、GOT, GPT は PB 群、Cit 群が共に Control 群に比べ低値の傾向にあり、ALP は Cit 群では Control 群に比べ高値を示す傾向を認めた。血清アミノ酸分析では、Cit は Cit 群で Control 群の約23倍の値を示した。Ornithine は Cit 群で増加傾向を認めた。HE 染色では、過形成性結節は明細胞、空胞細胞を混じり周囲の肝組織とは明瞭に区別された。 γ -GTP 染色では肉眼的に過形成性結節の出現を認めた肝組織には γ -GTP 強陽性の酵素変異細胞巣を認めた (Fig.)。

* 奈良県立医科大学第3内科

** 同 病態検査学

Fig. γ -GTP staining shows enzyme-altered islands (EAI) in a liver specimen from a rat treated with Cit. $\times 40$

考案：高シトルリン血症における肝発癌の機序としては、本疾患が先天性異常であることから、geneticな発癌因子の存在が考えられ、また潜在する他の代謝異常の関与も否定はできないが、われわれは現在までに行なった肝細胞のTdR取り込み量およびポリアミン産生におよぼすCitの影響とin vivo—in vitroシステムでのCitのプロモーター作用に関する検討から、Citは肝発癌のプロモーターとして働く可能性を指摘し、その機序として尿素サイクルの停滞によるオルニチンからポリアミンへの移行の増加が関与しているものと

推測してきた¹⁾。Solt³⁾らの方法に準じDENとAAFで二重にイニシエーション後Citのプロモーター作用を検討した今回のラット肝発癌モデルでは、Cit群のラット血清Cit値はControl群の約23倍を示し、高シトルリン血症患者の血中濃度(0.1~1mM:佐伯⁴⁾による)に近似していたこと、および尿素サイクルの停滞によるCitの前駆物質であるオルニチンの増加を認めたことから、高シトルリン血症の肝細胞内代謝と類似した状態をつくり得たと考えられた。そして、肝癌の発生までには至らないものの最も進んだ段階の前癌病変とみなされている過形成性結節の出現率がCit群では代表的なプロモーターであるPB群と同程度以上に高率に出現し、Citの肝発癌プロモーション効果をin vivoの系でも確認することができた。

尿素サイクル酵素の異常は肝発癌頻度の高い肝硬変でも多く認められていることが知られており⁵⁾、尿素サイクル異常と肝発癌の関連についても今後の詳細な検討が必要であると考えられた。

索引用語：シトルリン、肝発癌モデル、肝発癌プロモーション

文 献：1) Nakayama M, et al: Hepatology 11: 819—823, 1990 2) Rutenber AM, et al: J Histochem Cytochem 17: 517—526, 1969 3) Solt D, et al: Nature 263: 701—703, 1976 4) 佐伯武頼: 肝臓病学の進歩 15: 17—24, 1989 5) Williams-Ashman HG, et al: Cancer Res 32: 1924—1932, 1972

Experimental study on hepatocarcinogenesis in hypercitrullinemia —Promoting effect of citrulline—

Masaki NAKAYAMA*, Yasuyuki OKAMOTO**, Tomofumi MORITA*, Makoto MATSUMOTO*,
Hiroshi FUKUI*, Hiroshi NAKANO** and Tadasu TSUJII*

* The Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University (Nara)

** Department of Clinico-Laboratory Diagnostics, Nara Medical University (Nara)