銅欠乏による LEC (Long-Evans Cinnamon) ラットの 肝炎・肝癌の発症抑制に関する実験的研究

佐 加 良 英 治

九州歯科大学動物実験施設

九州歯科大学口腔病理学講座 (指導: 福山 宏教授)

平成 8 年 2 月 26 日受理

Experimental Study on Retardation by Cu-deficiency of Development
of Hepatitis and Hepatoma in LEC (Long-Evans Cinnamon) Rats

Eiji Sagara

Animal Research Center

Department of Oral Pathology (Director: Prof. Hiroshi Fukuyama)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

For the purpose of investigating the relationship between copper and developing of spontaneous hepatitis and hepatoma in LEC rats, LEC rats were given copper-deficient diet for one month when these diseases developed in them. By controlling copper intake, effect of copper-deficiency on developing of hepatitis and hepatoma in LEC rats were examined and the following conclusions were obtained.

1. Administration of copper-deficient diet at the time of developing of hepatitis in LEC rats delayed the developing of hepatitis in serum biochemistry test and histological studies.

2. Administration of copper-deficient diet at the time of developing of hepatoma in LEC rats delayed the developing of hepatoma in serum biochemistry test, but liver cancer was observed in histological studies; therefore the effect of administering copper-deficient diet was not recognized.

3. In the liver at the time hepatitis developed, abnormal accumulations of copper and iron were recognized.

4. In the liver at the time hepatoma developed, abnormal copper accumulation was recognized, but iron accumulation was not changed.

5. In the liver of LEC rats at the time hepatitis developed, giant nucleus, infolding of nucleus membrane, transformation of mitochondria, electron-lucent vacuoles of cristae in mitochondria and well-development of smooth-surfaced endoplasmic reticulum were observed by electron microscopy. These findings suggested that copper metabolism was abnormal.

6. By X-ray microanalysis, localization of copper in the liver cell could not identified.

From the above results, it was suggested that copper-deficiency was effective for retarding the development of hepatitis in LEC rats, but sufficient effect was not provided in retarding

the occurrence of hepatoma in LEC rats.

Key words: LEC rats / Copper deficiency / Hepatitis / Hepatoma / Electron microscopy

緒 言

今日、世界で200万人以上の人々が肝炎に冒され、最も悪性な病気の一つである肝癌の発症者は毎年25万～50万人と報告されている¹⁾。日本における肝癌の罹患率は、胃癌、肺癌に次いで第3位を占め、アジア、アフリカ諸国とならんで高率をしめている²⁾。わが国の肝癌による死亡実数は、1991年には23,300人に達し、1975年の報告による9,800人より2倍以上に増加してきている³⁾。肝癌の多くは肝炎ウイルス関連であることが次第に明らかにされ、肝癌の約15%がB型、約80%がC型肝炎ウイルスの持続感染による慢性肝疾患から発生することが報告されている¹⁻¹¹⁾。このように肝癌が慢性肝炎や肝硬変からおこることは良く知られているにもかかわらず、その発癌機構は不明のままである¹⁾ため、その病理発生や進展の機序をめぐり、活発な研究が展開されている³⁻¹¹⁾。一方、歯科臨床において、肝炎、肝硬変および肝癌等の肝疾患を持つ患者を治療する際に、B型およびC型肝炎ウイルスの感染予防、観血的処置時における出血傾向に対する対策、薬物治療時における投薬コントロール等が必要となる。よって、肝疾患は歯科領域においても注意すべき背景要因の一つである¹²⁻¹⁵⁾。

実験動物を用いた肝炎・肝癌の研究としては、マウス肝炎ウイルス接種による肝炎¹⁶⁾、四塩化炭素やD-ガラクトサミンの投与による肝硬変¹⁶⁾、*o*-アミノアゾトルエン¹⁶⁾や4-ジメチルアミノアゾベンゼン¹⁷⁾の投与により惹起される肝癌が有名である。これらはヒトにおける個々の肝疾患についての研究であり、肝炎から肝癌に至る一連のつながりとしての研究ではないようである¹⁸⁾。

ところが、最近、北海道大学理学部の実験生物センターでLong-Evansの突然変異種であるLEC (Long-Evans Cinnamon) ラット¹⁸⁻²¹⁾が樹立された。このラットは自然発生肝炎を背景病変として、ほぼ全例に肝癌の発生が見られる新しい系統であるため、慢性肝炎や肝硬変を基盤として発生するヒト肝癌を一連の肝疾患の流れの中で研究できるモデル動物として注目されてきている^{1, 18-21)}。

Masudaら(1988)²²⁾、吉田ら(1994)²³⁾らはLECラットの肝障害の発現は、常染色体劣性遺伝様式により

おこると報告し、Liら(1991)²⁴⁾はLECラットの急性肝炎は先天性の銅代謝異常により、肝臓への銅蓄積によるものと報告している。

ヒトの遺伝性疾患の一つであるWilson病^{20, 25-34)}もLECラットと同様に常染色体劣性遺伝の銅代謝異常により発症し、肝臓や脳に銅が蓄積することはよく知られている。しかし、そのWilson病では肝癌の発生はきわめて希である³⁴⁾ことより、銅が肝癌の発生にむしろ防衛的に働いている可能性を指摘する報告がある^{29, 34-36)}。一方、及川ら(1995)³⁷⁾は銅が活性酸素の存在下で強いDNA傷害作用を有することや、有機発癌物質を活性化させることを報告しており、銅の肝癌発症への深い関与が考えられるが、銅が肝癌発症に対し促進的な作用を持つのか、抑制的な作用を持つかについてはいまだに明らかでない。

そこで、本研究では自然発症としての肝炎から肝癌への進行を示すLECラットに、銅摂取のコントロールを行い、銅欠乏がLECラットの肝炎・肝癌の発症を抑制するか否かについて検討した。

材料と方法

自然発症肝炎・肝癌モデル動物であるLECラットは通常、生後4ヵ月齢前後に突発性の黄疸が認められ、ヒト劇症肝炎類似の臨床像を呈する。急性肝炎を自然発症したLECラットのうち約50%はより重篤な症状を呈し、肝炎発症後約2週間以内に死亡する。急性肝炎より寛解する例は約40%であり、そのうち10%は経過中に肝炎の再発で死亡する。1年以上の長期生存ラットは全体の約40%で、最終的にはほぼ全例肝癌を発生する³⁸⁾(図1)。

以上の臨床経過を予備実験でも確認した上で、本実験を以下の2つに分けて行なった(図2)。

実験I: 銅と肝炎の発症およびその進行との関係を調べる目的で肝炎発症前(生後2・3ヵ月齢)のLECラットに銅欠乏飼料を1ヵ月間投与し、肝炎発症時期(生後3・4ヵ月齢)における銅欠乏飼料投与群(以下銅欠乏飼料群)と銅含有飼料投与群(以下標準飼料群)との比較を行った。

実験II: 銅と肝癌の発症およびその進行との関係を調

図1 LEC ラットの臨床経過と予後

図2 LEC ラットの肝炎・肝癌発症時期と実験期間

べる目的で肝癌発症前（生後 12 ヶ月齢）の LEC ラットに銅欠乏飼料を 1 ヶ月間投与し、肝癌発症時期（生後 13 ヶ月齢）における銅欠乏飼料群と標準飼料群との比較を行った。

I. 実験動物

北海道大学理学部実験生物センターより、研究繁殖用として系統分離された LEC ラットを九州歯科大学動物実験施設において系統維持し、その中から、実験 I では雄の体重 100 ～ 150 g 前後の 2 または 3 ヶ月齢を 12 匹（標準飼料群 7 匹、銅欠乏飼料群 5 匹）、実験 II では体重 300 g 前後の 12 ヶ月齢を 6 匹（標準飼料群 3 匹、銅

欠乏飼料群 3 匹）、計 18 匹用いた。

II. 飼料および飲水

銅欠乏飼料群には銅欠乏固形飼料（日本クレア、平均銅含有量：0.02 mg/100 g 以下）と再蒸留水を与えた。標準飼料群には標準固形飼料 CMF（オリエンタル酵母、平均銅含有量：1.11 mg/100 g）と再蒸留水を与えた。

III. 飼育環境

室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、照明時間 8 ～ 20 時明、20 ～ 8 時暗に設定された動物実験施設ラット飼育室内において、銅を含有しないプラスチック製飼育ケ

ジ (エコノ TPX, 日本クレア), プラスチック製給水瓶 (CK-200, 日本クレア) に実験動物用木製床敷材 (ホワイトフレック, オリエンタル酵母) を用いて飼育した。

IV. 血清生化学的検査

ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール, ダイナボット・大日本製薬) 3 mg/100 g を腹腔内投与し, 全身麻酔下にて大腿静脈より採血し検査に供した。血清銅 (測定方法: バソクプロイン法), 血清鉄 (バソフェナンスロリン法), 総ビリルビン (Jendrassik-Grof Michaelsson 変法), 総蛋白質 (Biuret 法), aspartate aminotransferase (ASAT) (IFCC 準拠法), alanine aminotransferase (ALAT) (IFCC 準拠法), alkaline phosphatase (Al-P) (P-ニトロフェニルリン酸基質法) および総コレステロール (酵素法) は血液生化学自動分析装置 (TBA-80 S, 東芝), セルロプラスミン (レーザーネフェロメトリー法) はネフェロメーターアナライザー (ベーリング社) を用いて測定した。測定値は統計処理し, t 検定により銅欠乏飼料群と標準飼料群との比較を行った。

V. 微量金属の検出

組織試料採取後のラットより肝臓の内側左葉を摘出し, 生理食塩水で洗浄後, 混酸 (硫酸: 過塩素酸: 硝酸 = 1:3:3) で湿式灰化処理し, ICP (Inductively Coupled Argon) プラズマ発光装置 (Ash-Plasma 300, Thermo Jarrell) で鉄および銅の定量を行った³⁹⁾。測定値は統計処理し, t 検定により銅欠乏飼料群と標準飼料群との比較を行った。

VI. 組織学的検索

ペントバルビタールナトリウム過剰投与により安楽死させた後, 直ちに肝臓の外側左葉を摘出, 0.1M カコジル酸 (pH 7.4) で緩衝した 2.5% グルタルアルデヒドと 1% パラホルムアルデヒドとの混合液中で 1 ml 大に細切し, 4℃ で 2 時間浸漬固定を行った後, 2% 四酸化オスミウム液にて 4℃ で 2 時間の後固定を施し, 常法通りアルコール系列で脱水, プロピレンオキシドで置換した後, エポキシ樹脂 (POLY/BED 812, POLY-SCIENCES) に包埋, ウルトラミクロトーム (Ultra-cut E, Reichert-Jung) で超薄切片作製後, 酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を施し, 透過型電子顕微鏡 (JEM-1200 EX II, 日本電子) にて加速電圧 80 kV で観察した。一部は 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン液にて肝臓を固定後, 常法により 4 μm のパラフィン切片を作成し, ヘマトキシリン・エオジン (H・E) 重染色を施

し鏡検した。

VII. X線微小分析

透過型電子顕微鏡観察用に作製した超薄切片を 150 メッシュのチタングリッドにのせ, 無染色の状態にて, 透過型電子顕微鏡 (JEM-1200 EX II, 日本電子) のカーボン試料台に設置し, 走査像観察装置 (EM-ASID10, 日本電子) を用いて走査透過電子 (STEM) 像を加速電圧 40 kV で観察し, 点分析法による X 線微小分析をエネルギー分散型 X 線分析装置 (SERIES II, NORAN) を用いて行った。

なお, 本研究は九州歯科大学動物実験指針に基づき, 必要最小限の動物数を用い, かつ極力苦痛を与えない方法によって行った。

結 果

I. 血清生化学検査

A. 肝炎発症時期の比較

総蛋白質および総コレステロールにおいて標準飼料群の方が有意 ($p < 0.05$) に低値を示し, ASAT ($p < 0.01$) および ALAT ($p < 0.05$) で有意に高値を示した。肝機能の指標となる総ビリルビン, Al-P および血清鉄値も標準飼料群の方が高い傾向にあり, 銅欠乏飼料の投与による肝炎発症の抑制効果が認められた (表 1)。

B. 肝癌発症時期の比較

ALAT ($p < 0.01$), Al-P ($p < 0.01$) および血清銅 ($p < 0.05$) で標準飼料群の方が有意に高値を示し, ASAT 値も標準飼料群の方が高い傾向にあり, 肝炎発症時期と同様に銅欠乏飼料を投与することによる肝癌発症の抑制効果が認められた (表 1)。

II. 微量金属

肝炎発症時期の銅欠乏および標準飼料群間の肝臓中の微量金属含有量を比較すると, 鉄濃度では両群間に有意な差は認められなかった。しかし, 銅濃度では銅欠乏飼料群に比べ, 標準飼料群の方が有意に高値 ($p < 0.05$) を示した。同様に, 肝癌発症時期の銅欠乏および標準飼料群間の微量金属含有量を比較したが, 鉄および銅濃度ともに両群間に有意差は認められなかった (表 2)。

III. 肉眼所見

A. 肝炎発症時期の比較

銅欠乏飼料群では外貌ならびに剖検所見で心臓, 肺, 肝臓および他の腹腔内臓器にとくに顕著な肉眼的変化は認められず (写真 1), 実験期間中に死亡する個体は認められなかった。標準飼料群の外貌は四肢末端および耳介に黄疸がみられ, 皮下ビリルビンの著明な沈着, 鼻部出

表 1 血清生化学検査測定結果

測定項目 (単位)	肝炎発症時期 (3~4 ヶ月齢)		肝癌発症時期 (13 ヶ月齢)	
	銅欠乏飼料群 (n=4)	標準飼料群 (n=5)	銅欠乏飼料群 (n=3)	標準飼料群 (n=3)
総ビリルビン (mg/dl)	0.46±0.068	16.3±11.77	0.43±0.133	0.63±0.333
総蛋白 (g/dl)	5.8±0.13	4.8±0.37 *	6.0±0.09	5.9±0
ASAT (mU/ml)	120±6	737±197 **	187±36	337±111
ALAT (mU/ml)	50±3.9	614±197 *	118±11	241±19 **
Al-P (mU/ml)	121±8	288±85	248±13	414±18 **
総コレステロール (mg/dl)	85.2±3.02	63.8±5.68 *	49±4.0	41.3±1.86
Fe (μg/dl)	292±8	348±34	102±6	114±11
Cu (μg/dl)	14±1.6	181±89	39±4.9	60±3.8 *
セルロプラスミン (mg/dl)	2.6±0.25	7.5±4.5	4.7±1.2	6±1
測定値：平均値±標準偏差				
* : p<0.05, ** : p<0.01				

表 2 微量金属測定結果

月 齢	(μg/g 湿重量)			
	鉄		銅	
	3~4	13	3~4	13
標準飼料群	436±49.7	68.3±24.51	356±25.5	136±42.5
銅欠乏飼料群	461±62.8	70.4±24.31	175±22.3 *	112±30.3
平均値±標準偏差				
* : p<0.05				

血およびビリルビン尿が認められた。剖検所見では壁側および臓側腹膜ならびに剣状突起のビリルビン沈着、内出血、赤褐色調の萎縮した肝臓、軽度腫大した脾臓および黄色腎が観察された (写真 2)。また、実験期間中に劇症肝炎により 3 匹 (42.9%) が死亡した。

B. 肝癌発症時期の比較

両群ともに肝臓表面に白色結節状および褐色塊状の腫瘤が認められ、肝臓はやや腫大していた。肝炎発症時期の標準飼料群にみられたような黄疸や出血は、両群共に認められなかった (写真 3, 4)。

IV. 肝臓の組織学的検索

A. 光顕所見

1. 肝炎発症時期の比較

a. 銅欠乏飼料を 1 ヶ月間投与した生後 3 ヶ月齢の銅欠乏飼料群 (以下銅欠乏 3 ヶ月齢群) では、中心静脈を囲んで肝細胞が放射状に配列し、正常な肝細胞索を形成していた。洞様毛細血管には、内皮細胞や Kupffer 細胞が認められた。2 核の肝細胞やわずかに腫大した肝細胞

胞がごく一部にみられるが、ほぼ正常な構造が観察された (写真 5)。

b. 標準飼料を 1 ヶ月間投与した生後 3 ヶ月齢の標準飼料群 (以下標準 3 ヶ月齢群) では、肝細胞の膨化とそれに伴う洞様毛細血管の狭窄、核の巨大化、多核肝細胞および肝細胞実質の空胞変性が認められた。洞様毛細血管内には赤血球や胆汁を貪食した Kupffer 細胞が多数認められた (写真 6, 7)。さらに好酸性小体が肝細胞内や一部は洞様毛細血管内にまでも認められた (写真 7)。

c. 銅欠乏飼料を 1 ヶ月間投与した生後 4 ヶ月齢の銅欠乏飼料群 (以下銅欠乏 4 ヶ月齢群) では、肝細胞の膨化とそれに伴う肝細胞索の乱れ、核の巨大化、偽封入体、多核肝細胞および肝細胞実質の空胞変性が認められ、赤血球や胆汁を貪食した Kupffer 細胞が散見された (写真 8)。

d. 標準飼料を 1 ヶ月間投与した生後 4 ヶ月齢の標準飼料群 (以下標準 4 ヶ月齢群) では、肝細胞の膨化と壊死、肝細胞実質の空胞変性、核の巨大化、多核肝細胞お

写真 1 銅欠乏飼料群, 3 ヶ月齢の剖検所見
とくに顕著な肉眼的変化は認められない。

写真 2 標準飼料群, 3 ヶ月齢の剖検所見
著明なビリルビン沈着, 赤褐色調の萎縮した肝臓が認められる。

写真 3 銅欠乏飼料群, 13 ヶ月齢の剖検所見
肝臓の外側左葉および内側右葉表面に白色結節状の腫瘤が認められ, 内側右葉には褐色塊状の腫瘤も認められ, 肝臓はやや腫大している。

写真 4 標準飼料群, 13 ヶ月齢の剖検所見
肝臓の外側, 内側左葉および内側右葉表面に白色結節状の腫瘤が認められ, 内側右葉には褐色の腫瘤も認められ肝臓は腫大している。

写真5 銅欠乏飼料群, 3ヵ月齢の肝臓 (H・E 染色 ×100)
ほぼ正常な肝臓の構造を保っている。

写真6 標準飼料群, 3ヵ月齢の肝臓 (H・E 染色 ×100)
肝細胞の膨化とそれに伴う洞様毛細血管の狭窄, 核の巨大化, 多核肝細胞および肝細胞実質の空胞変性が認められる。洞様毛細血管内には赤血球や胆汁を貪食した Kupffer 細胞が多数認められる。

写真7 標準飼料群, 3ヵ月齢の肝臓 (H・E 染色 ×100)
好酸性小体 (矢尻) が肝細胞間に認められ急性肝炎像を呈している。

写真8 銅欠乏飼料群, 4ヵ月齢の肝臓 (H・E 染色 ×100)
核の巨大化および偽封入体 (矢印) が認められ, 肝炎初期の病態像を呈している。

写真9 標準飼料群, 4ヵ月齢の肝臓 (H・E 染色 ×100)
偽封入体 (矢印) および好酸性小体 (矢尻) が認められ, 進行性の急性肝炎像を呈している。

写真10 標準飼料群, 4ヵ月齢の肝臓 (H・E 染色 ×200)
顕著な核の偽封入体が認められる。

写真11 銅欠乏飼料群, 13ヵ月齢の肝臓 (H・E 染色 ×100)
肝組織内に膠原線維が増生し大小不同の腺腔構造の増生が認められ, 胆管線維症像を呈している。肝細胞は膨化し, 巨大核が認められ, 前癌病変を呈している。

写真12 標準飼料群, 13ヵ月齢の肝臓 (H・E 染色 ×100)
胆管線維症像が銅欠乏飼料群と同様に認められる。

写真13 標準飼料群, 13ヵ月齢の肝臓 (H・E 染色 ×100)
胆管線維症像が認められ, 肝細胞は前癌病変を呈している。

よび好酸性小体がみられ, 赤血球や胆汁を貪食した Kupffer 細胞 (写真9) や顕著な核の偽封入体 (写真10) が認められた。また, 慢性肝炎に多くみられる oval cell の様な再生像は認められず, これらの変化は標準3ヵ月齢群よりも顕著であった。

2. 肝癌発症時期の比較

a. 銅欠乏飼料群では, 肝臓内に膠原線維や大小不同の腺腔構造の増生が認められた。また, 肝細胞は膨化し, 巨大核が認められた (写真11)。

b. 標準飼料群では, 膠原線維や腺腔構造の増生所見が銅欠乏飼料群と同様に認められた (写真12, 13)。また, 肝細胞の核は巨大化, 大小不同となり (写真12), 細胞質はスリガラス状となり, 空胞形成が認められ (写真13), 銅欠乏飼料群とほぼ同様の所見であった。

B. 電顕所見

1. 肝炎発症時期の比較

a. 銅欠乏3ヵ月齢群の肝細胞内には, ミトコンドリア, ペルオキシゾーム, 粗面小胞体および滑面小胞体が見られ, ディッセ腔に面する部分では大小不同の微絨毛が認められた (写真14)。毛細胆管腔には指状の微絨毛が, 肝細胞間には閉鎖堤が, 毛細胆管周囲にはライソゾームがそれぞれ認められ (写真15), ほぼ正常な肝細胞の超微構造として観察された。

b. 標準3ヵ月齢群の肝細胞内には, 良く発達した滑面小胞体, 核縁の不整 (写真16) およびミトコンドリアの変性が認められた (写真17)。毛細胆管は拡張し無構造物が内腔に認められ (写真17), 同齢の銅欠乏飼料群より顕著に超微構造の変化がみられた。

c. 銅欠乏4ヵ月齢群の肝細胞内には, ミトコンドリアのクリステが空胞状に拡張する electron-lucent vacuoles (ELV) (写真18, 19 および 20), 脂肪滴のミエリン様変性 (写真18), 良く発達した滑面小胞体 (写真18, 19 および 20), 変形した核縁 (写真19) および細胞内 (写真18, 19 および 20) や毛細胆管内 (写真20) にミエリン様変性物が認められた。

d. 標準4ヵ月齢群の肝細胞内には, ミトコンドリアに ELV (写真21, 22), ミエリン様の変性 (写真22) および良く発達した滑面小胞体 (写真22) が認められた。洞様毛細血管内には異物を貪食した Kupffer 細胞がみられ (写真23), これらの所見は標準3ヵ月齢のものよりも顕著であった。

2. 肝癌発症時期の比較

a. 銅欠乏飼料群の肝細胞内には, クロマチンが分散し変形した巨大核 (写真24, 27), 拡張した滑面小胞

写真14 銅欠乏飼料群, 3ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 × 3,600)

肝細胞内に核(Nu), ミトコンドリア(M), ペルオキシゾーム(P), 粗面小胞体(r-ER)および滑面小胞体(s-ER)が認められ, 洞様毛細血管内には赤血球(Er)と内皮細胞(En)がディッセ腔(D)に面する部分では大小不同の微絨毛が認められる。

写真15 銅欠乏飼料群, 3ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 × 3,600)

毛細胆管(BC)腔には指状の微絨毛が, 肝細胞間には閉鎖堤(矢尻)が, 毛細胆管周囲にライソゾーム(L)がそれぞれ認められる。

写真16 標準飼料群, 3ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 ×4,800)
滑面小胞体が良く発達し, 核縁の不整 (矢印) が認められる。

写真17 標準飼料群, 3ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 ×4,800)
滑面小胞体が良く発達し, ミトコンドリアの変性 (矢尻) が認められる。毛細胆管は拡張し無構造物 (矢印) が認められる。

写真18 銅欠乏飼料群, 4ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 ×3,600)
ミトコンドリアのクリステに空胞状の ELV (electolon-lucent vacuoles) (矢尻) および脂肪滴にミエリン様の変性 (矢印) が認められる。滑面小胞体は良く発達し, ミエリン様の変性物が細胞内に認められる。

写真19 銅欠乏飼料群, 4ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 ×3,600)
ミトコンドリアのクリステに ELV が認められる。滑面小胞体は良く発達し, 核縁は変形し, ミエリン様の変性物 (矢尻) が細胞内に認められる。

写真20 銅欠乏飼料群, 4ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 × 3,600)
ミトコンドリアのクリステに ELV が認められる。滑面小胞体は良く発達し、ミエリン様の変性物が細胞内および毛細胆管内に認められる。

写真21 標準飼料群, 4ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 × 3,600)
ミトコンドリアのクリステに空胞状の ELV が認められる。

写真22 標準飼料群, 4ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 × 3,600)
ミトコンドリアのクリステに空胞状の ELV およびミエリン様の変性が認められる。滑面小胞体が良く発達している。

写真23 標準飼料群, 4ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 × 3,600)
洞様毛細血管内に異物を食べ込んだ Kupffer 細胞が認められる。

写真24 銅欠乏飼料群, 13ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 $\times 4,000$)
核の巨大化, 変形およびクロマチンの分散が認められ, 滑面小胞体は拡張し, 大きな電子密度の高い脂肪滴の集積が認められる。

写真25 銅欠乏飼料群, 13ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 $\times 4,000$)
胆管上皮様細胞が増生し, ミトコンドリアの膨化が認められる。

写真26 銅欠乏飼料群, 13ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 $\times 4,000$)
胆管上皮様細胞が増生し, 増殖した線維芽細胞様の構造も認められる。

写真27 標準飼料群, 13ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 $\times 5,000$)
核の巨大化, 変形およびクロマチンの分散が認められ, ミトコンドリアに ELV の空胞が, ディッセ腔に面する微絨毛は乱れ, 腔内には変性したオルガネラが認められる。

写真28 標準飼料群, 13ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 ×5,000)
胆管線維症の病変部では胆管上皮様細胞が増生し, ミトコンドリアの変性および電子密度の高い脂肪滴が認められる。

写真29 標準飼料群, 13ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 ×3,000)
胆管線維症の病変部では胆管上皮様細胞が増生し, 発達した粗面小胞体を持つ線維芽細胞様の構造が認められる。

写真30 標準飼料群, 13ヵ月齢の肝臓 (透過電顕像 ×3,000)
胆管線維症の病変部では胆管上皮様細胞が増生し, ミトコンドリアの崩壊が認められる。また, 線維芽細胞様の構造が認められ, 変性したオルガネラを貪食した二次ライソゾームを含む細胞が認められる。

図3 X線微小分析結果：点分析法による定性分析，4ヵ月齢の標準飼料群。

ミトコンドリア，ライソゾーム，核に銅（Cu）が認められる。肝細胞間隙では銅はほとんど認められない。Tiは使用したグリッドによるもの。

体，大きな電子密度の高い脂肪滴の集積が認められた（写真24）。腺管および膠原線維の増生部では，腺管形成の細胞は胆管上皮細胞に類似し，その細胞質内には膨化したミトコンドリア（写真25）がみられ，また，隣接して発達した粗面小胞体を持つ線維芽細胞様とコラーゲン形成像が認められた（写真26）。また，ディッセ腔に面する肝細胞の微絨毛は乱れ，腔内には変性したオルガネラが認められた（写真27）。

b. 標準飼料群の肝細胞内には，胆管上皮様細胞が増生し，変性したミトコンドリア（写真28，30）および電子密度の高い脂肪滴が認められた（写真28）。また，

膠原線維の増生部では線維芽細胞様（写真29，30）や変性したオルガネラを貪食した二次ライソゾームを含む細胞がみられ（写真30），銅欠乏飼料群とほぼ同様の構造が認められた。

V. X線微小分析

点分析法による定性分析で，銅の特性X線のピークが検出されたのは標準4ヵ月齢群のみであった。銅が検出されたのはミトコンドリア，ライソゾームおよび核の部分であり，肝細胞間隙（肝細胞と肝細胞の間の部分）では銅はほとんど認められなかった（図3）。

考 察

銅はあらゆる生命体にとっての必須金属の一つである。生理的条件下においてはチロシナーゼ、ドーパミンβヒドロキシラーゼ、Cu・Zn-スーパーオキシドジスムターゼ、チトクロームオキシダーゼやセルロプラスミンなどの酵素の構成要素として、電子の伝達を介して、酸化・還元・活性酸素の除去などの生理的酵素反応に関与している。その反面、銅は蛋白の酸化、脂質の過酸化を介して生体に有害な作用も有する金属である²⁹⁾。

極度の銅欠乏は貧血、骨異常および脳障害を引き起こすが、肝障害は起こさないという報告⁴⁰⁾がある。今回の実験では、LEC ラットに銅欠乏飼料を投与することによる、貧血等の異常は認められなかった。

血清生化学検査所見において、肝炎発症時期の標準飼料群では血清生化学的に肝細胞障害の所見⁴¹⁾を呈したが、銅欠乏飼料を投与することにより、肝機能の指標となる血清アミノトランスフェラーゼ値の有意な低下 (図4) および血清蛋白、総コレステロール値の有意な上昇がみられ、急性肝炎の発症抑制または遅延が認められた。肝癌発症時期でも同様に銅欠乏飼料の投与効果が ALAT 値および AI-P 値の有意な低下として認められた。しかし、ALAT 値および AI-P 値は同齢の SD ラットの正常値⁴²⁾よりも異常に高い傾向にあり、かつ銅欠乏飼料群間を比較すると、肝癌発症時期のものは、肝炎発症時期に比べ肝硬変・肝癌の病態を示す血清アミノトランスフェラーゼ値および AI-P 値の増加、総コレステロール値の減少傾向がみられ、両群ともに結果として肝の破壊性変化を示す値を示しているところから、銅欠乏飼料の投与効果は肝炎発症時期ほど顕著に認められなかったように思われる (図4, 5)。以上のことから血清生化学的には銅欠乏が肝炎の発症抑制には有効であることを強く示唆するとともに、引続いて肝癌の発症抑制にも有効である可能性を示唆するものであった。

これらを微量金属分析所見より考察すると、肝炎発症時期の標準飼料群は銅欠乏飼料群に比べ、肝臓への銅蓄積は有意 ($p < 0.05$) に高く、2 倍量以上の値が認められた。組織中の銅濃度は経口摂取される銅量を反映しているという報告⁴⁰⁾があり、この有意差は餌中の銅含有量の違いによるものと推察された。しかしながら、標準の飼料を投与していても肝臓中の銅濃度は正常な LEA ラット⁴³⁾の約 100 倍以上であり、異常に蓄積した銅が肝炎発症に関与している可能性が十分に考えられる。さらにもう一つの結果は、肝炎発症時期では肝癌発症時期に

図4 銅欠乏飼料群と標準飼料群の血清アミノトランスフェラーゼ値の比較

図5 銅欠乏飼料群と標準飼料群の AI-P 値と総コレステロール値の比較

図6 銅欠乏および標準飼料 LEC ラットと正常ラットの肝臓中の銅および鉄濃度の比較

*: 文献 39 より引用 ** : 文献 43 より引用

比べて肝臓中に高濃度の鉄蓄積がみられ、その値は正常な Wistar ラット³⁹⁾の鉄含有量の約 4 倍であったことである。肝炎発症時期の鉄濃度に関して Kato ら (1993)⁴⁴⁾, Suzuki ら (1993)⁴⁵⁾ は著者と同様に異常な鉄の蓄積を報告しているが、斉藤 (1993)⁴⁶⁾ は 3 週齢以降、鉄の含有量は低下すると報告しており、見解は一致していない。しかし、鉄、銅やマンガンなどのような金属イオンは、細胞障害をきたすフリーラジカルの重要な産生源であることが知られている。そして、その中でも鉄が最も強い働きをするという報告⁴⁷⁾がある。よって、この異常な鉄の蓄積も肝炎発症要因の一つであると推察することはできるが、今回の結果だけでは鉄の関与の詳細は不明であり、今後の検討課題の一つとしなければならない。

次に、肝癌発症時期とされる生後 13 ヶ月齢の標準および銅欠乏飼料群間の比較において、餌中の銅含有量に差があるにもかかわらず、肝臓中の銅濃度に有意差が認められなかったことは、両群ともに肝腫瘍が発症し、正常な肝細胞が減少し、肝臓中への銅の取込が低下したことによるものと思われる。このことは、肝癌発症時期 1 ヶ月前に銅欠乏飼料を投与しても肝臓の腫瘍化に差が見

られなかったのではと推察される。しかし、正常な LEA ラット⁴³⁾と比較してみると、約 40 倍量の銅が肝臓中に貯えられていた (図 6)。斉藤 (1993)⁴⁶⁾ は LEC ラットの肝臓中の銅濃度は 4 ヶ月齢から 10 ヶ月齢にかけて高値を持続し、以後暫減傾向を示すと報告している。急性肝炎から慢性肝炎を経て肝癌発症に至るまでの間、肝臓中への銅の取込が低下するにしても、異常な量の銅が肝臓に蓄積していたことには変わらない。肝炎発症前での銅欠乏状態が何らかの形で肝炎の発症を遅らせることにより、銅が肝癌の発症にも関与している可能性を推察できよう。

以上の点を念頭に置いて、肝臓の組織変化をみると、銅欠乏 3 ヶ月齢群ではほぼ正常な構造を保っていたのに対し、銅欠乏 4 ヶ月齢群では肝炎初期の病態を呈していた。LEC ラットの肝炎は肝臓内に異常に蓄積した銅によりおこる²⁴⁾とされている。その病理発生は、肝臓内に蓄積した銅はフリーのままでは肝臓に障害を与えるため、蓄積した銅が原因となって肝細胞にメタロチオネインの合成が誘導され、銅がメタロチオネインに結合した状態で肝臓に蓄積する³¹⁾。しかしながら、肝臓が合成できるメタロチオネイン量にも限界があり³¹⁾、ついにはフリーの銅イオンが生じ、それにより急激な肝細胞傷害を引き起こされ肝炎が成立するものと推定されている^{21, 31)}。未処置の LEC ラットでは、これが 5 ヶ月齢前後にあたるとも報告されている²¹⁾。今回、肝炎初期の病態を呈していた銅欠乏 4 ヶ月齢群では、すでに肝臓内の銅はメタロチオネインが補足する能力限界以上であり、ほぼ正常な所見を呈していた銅欠乏 3 ヶ月齢群では、補足能力内の銅量であったものと推定される。したがって本実験よりもさらに早期に銅欠乏を開始し、長期に投与を行えば、肝炎発症の時期、ひいては肝癌の発症を遅延させる可能性が推察される。ちなみに標準 3 ヶ月齢および 4 ヶ月齢群の 1 ヶ月投与後の組織像は劇症肝炎に類似²¹⁾しており、これまでに報告されていた所見と同様^{18-21, 24)}であった。4 ヶ月齢では慢性肝炎時の oval cell の様な再生像や小葉間結合組織への炎症細胞の浸潤^{18, 20)}は認められなかったが、進行性の肝炎像を呈していた。

次に肝癌発症時期 (13 ヶ月齢) の銅欠乏飼料群と標準飼料群の肝臓を肉眼的に観察すると、両群ともに肝臓表面に白色結節状および褐色塊状の腫瘍が認められた。笠井 (1992)²⁰⁾ は白色結節は組織学的に胆管線維症あるいは胆管癌であり、褐色塊は肝細胞癌であると報告している。肝癌発症時期の肝臓の光顕所見では、13 ヶ月齢の銅欠乏および標準飼料投与群ともに、肝臓内に膠原線

維や大小不同の腺腔構造の増生が認められており、胆管線維症と診断した。胆管癌との鑑別は光顕所見のみでは困難¹⁸⁾であるが、この月齢の LEC ラットに胆管癌の発症はきわめて少ないという報告¹⁸⁾があり、胆管線維症である可能性が高いと思われた。しかしながら、個々の肝細胞の核は巨大化、大小不同となり、細胞質はスリガラス状を呈し、空胞形成が認められたものの、構造に極度の異型性^{2,4,5)}は認められないことから、この組織は LEC ラットに発生する分化型の肝細胞癌ではなく、前癌状態と思われた。なお、武市 (1991)¹⁸⁾ は LEC ラットの肝腫瘍を肝細胞癌と胆管線維症に分類している。よって、この報告に従えば、本実験では両群ともに銅欠乏状態にさせたにもかかわらず肝腫瘍が発生していたことになり、肝癌発症前 1 ヶ月頃よりの銅欠乏は肝癌の発症抑制にさほど有効ではなかったように思われる。

これらの結果は電顕所見でも、同様に裏付けられており、銅欠乏飼料投与により肝炎の発症や進行が抑制されていることが観察された。

肝炎発症時期の特徴的な電顕所見として、ミトコンドリアの electron-lucent vacuoles (ELV)、良く発達した滑面小胞体、変形した核縁、ミエリン様の変性物が観察されている。森ら (1993)⁴⁸⁾ は LEC ラットのミトコンドリアが変形する理由として、ミトコンドリアは細胞質の 30 倍もの銅を蓄積することができ、銅の蓄積によって生ずるオキシダントが、ミトコンドリアの膜脂質に過酸化をおこし、ミトコンドリア基質の電子密度が増加し、クリステの先端が拡張するとし、また、核の変化は銅の異常蓄積が核骨格、とくにラミンに影響を与えていると報告している。鈴木 (1995)³¹⁾ は肝臓に蓄積した銅が原因となってメタロチオネインの合成が誘導されると報告しており、滑面小胞体の増生はメタロチオネイン産生のために生じたものと思われる。一方、榎本 (1980)¹⁶⁾ は、ヒトの慢性アルコール中毒や肝硬変の細胞中には、膜の突出や陥入を伴う変形したミトコンドリア、不整形の核、偽封入体、中性脂肪などが認められると報告している。今回の肝炎発症時期の電顕所見では核には同様の変化が認められたが、ミトコンドリアの変性はクリステに多くみられた。本実験の LEC ラットにみられた滑面小胞体の発達ヒトの慢性肝障害では認められなかった。これらのことより、今回の電顕所見は肝障害に特徴的なもののみではないと思われた。また、LEC ラットと同様に肝臓に銅が蓄積するヒトの Wilson 病^{49,50)} や toxic milk マウス⁵¹⁾ の肝細胞でも滑面小胞体の増生と小空胞化、ミトコンドリアの変形、核の巨大化や

核内封入体の出現が電顕的に観察されていることからすれば、著者が得た電顕所見は銅代謝異常に基づく特徴的な所見であると考えられる。

肝癌発症時期の銅欠乏飼料群では光顕所見と同様に、銅欠乏飼料投与効果が認められるような電顕所見は得られなかった。谷川ら (1987)⁴⁹⁾ は分化型の肝細胞癌の電顕的特徴を、核および核小体が巨大化し不整形を呈し、小型のミトコンドリアが多数みられ、滑面小胞体は良く発達し、層状に幾重にも配列してみられる他、良く発達した free ribosome、小型の脂肪滴およびグリコーゲン顆粒などが高頻度に認められると報告している。しかし、この所見に当てはまる電顕像は今回の観察では得られず、電顕的には胆管上皮様細胞が増生し、線維芽細胞様の増殖が認められ、いわゆる胆管線維症像を呈しており、光顕所見と同様に明らかな肝細胞癌としての所見は観察されず、前癌状態と考えられた。

以上の所見と今回の点分析法による X 線微小分析での結果をあわせて考えてみると、4 ヶ月齢の LEC ラット肝細胞のミトコンドリア、ライソゾーム、核の部分で銅の特性 X 線が検出された。しかしながら、Yano ら (1991)²⁸⁾ は 4 ヶ月および 10 ヶ月齢の LEC ラット肝細胞のライソゾーム内では銅の特性 X 線が検出できなかったと報告し、Fujii ら (1993)⁵²⁾ は 6 ヶ月齢の LEC ラット肝細胞のライソゾーム内では銅が検出できたが、ミトコンドリアと核では検出できなかったと報告しており、著者の結果とは異なっていた。そこで、今回測定した、同一切片の肝細胞と肝細胞の間の組織の含まれていない部分 (肝細胞間隙) での点分析を行ったところ、銅の特性 X 線は認められなかった (図 3)。このことより、今回、ピークが認められた銅は肝細胞内に分布していたものであることが推察できた。ところが、2 ヶ月齢の LEC ラット肝細胞分画の銅濃度を測定すると、細胞質に最も多く含まれるという報告⁵³⁾ がある。電顕観察では、細胞質に滑面小胞体の増生が顕著にみられ、メタロチオネインが誘導、産生されている^{31,51)} 所見を得ており、LEC ラット肝細胞内の過剰な銅イオンはメタロチオネインに結合され、細胞質全体に分布していると考えられる。よって、ミトコンドリア、ライソゾーム、核の部分で検出された銅はこれらのオルガネラに局在したものでなく、細胞質全体に分布していたものを検出した可能性もある。しかしながら、X 線微小分析法ではメタロチオネインに結合した銅は検出できないとも言われており、肝細胞内に銅は含まれているものの、その局在は今回の結果からでは同定が困難であった。また、これらの

銅蓄積が肝癌発症への過程にどのような役割を果たしているかを把握することはできなかった。

以上の結果と考察をまとめてみると、肝炎発症時期の LEC ラットに 1 ヶ月間銅欠乏飼料を投与することにより、血清生化学的ならびに組織学的に肝炎の発症および進行の遅延が認められたことから、LEC ラットの肝炎の発症には銅が関与していることが示唆された。肝癌発症時期の LEC ラットに 1 ヶ月間銅欠乏飼料を投与することにより、血清生化学的には肝機能の改善または病態の進行遅延を示唆するような結果が得られたが、形態的には病態の進行遅延を示唆するような所見が得られなかったことより、今回の実験では銅欠乏が肝癌の発症および病態の進行遅延に対し、有効であるという結果を得ることができなかったということになる。しかし、著者は本研究の一端として肝炎未発症時期の 2.5 ヶ月齢、急性肝炎発症時期の 4.5 ヶ月齢および慢性肝炎発症時期の 8.5 ヶ月齢の LEC ラットに 9 ヶ月間銅欠乏飼料を投与し、銅欠乏が肝癌の発症を遅延させ得ることを報告している⁵⁴⁾。このことは急性肝炎発症の有無にかかわらず、銅摂取を制限すれば、肝癌発症月齢でも、肝癌の発生を抑制しうることを意味している。よって、肝癌発症抑制に関し銅欠乏飼料投与の効果が得られる時期は、肝癌発症時期よりもむしろ、慢性肝炎発症時期である可能性が高く、慢性肝炎発症時期の銅蓄積と肝癌発症との関係を今後追及する必要があるように思われた。

慢性肝炎発症時期における LEC ラットの肝細胞では過剰に蓄積した銅イオンが活性酸素を生成し、その毒性により肝細胞が傷害され¹⁸⁾、持続性の肝細胞壊死が引き起こされており、壊死に対する生体の反応として、代償的な細胞増殖のシグナルが絶えず発せられていると想定される²¹⁾。おそらく、この銅蓄積によりおこる反応や LEC ラットの内因性の発癌因子⁵⁵⁾が肝細胞癌の発生のイニシエーションからプロモーションに働くものと考えられる。よって、LEC ラットの肝癌発症には、肝臓への過剰な銅蓄積が必要であると推察されるが、銅蓄積と肝癌発症の直接的な関連性については、今後さらに、検討を重ねていく必要があるであろう。

結 論

肝炎・肝癌自然発症 LEC ラットの肝疾患発症と銅との関係を解明する目的で、この LEC ラットの肝炎発症時期と肝癌発症時期にそれぞれ 1 ヶ月間銅欠乏飼料を投与し、銅摂取のコントロールを行い、銅欠乏が LEC ラットの肝炎・肝癌の発症抑制におよぼす影響について

検討し、以下の結論を得た。

1. 肝炎発症時期の LEC ラットに銅欠乏飼料を投与することにより、血清生化学的ならびに組織学的に肝炎の発症遅延が認められた。

2. 肝癌発症時期の LEC ラットに銅欠乏飼料を投与することにより、血清生化学的には肝癌の進行を遅延させるような所見が得られたが、組織学的には胆管線維症がみられ、銅欠乏飼料の投与効果は認められなかった。

3. 肝炎発症時期の肝臓には、異常な量の銅と鉄の蓄積が認められた。

4. 肝癌発症時期の肝臓には、異常な量の銅の蓄積が認められたが、鉄の濃度に異常は認められなかった。

5. 肝炎発症時期の LEC ラットの肝臓では、核の巨大化、核膜の陥入、ミトコンドリアの変形、クリステの electron-lucent vacuoles ならびに滑面小胞体の増生が認められ、銅代謝異常の所見を示していた。

6. X 線微小分析により、肝細胞内の銅の局在を検索したが、同定できなかった。

以上の結果より、銅欠乏は LEC ラット肝炎の発症抑制に有効であるが、肝癌の発症抑制には十分な効果が得られていないことが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導および御校閲を賜りました九州歯科大学口腔病理学講座福山 宏教授ならびに御教示、御校閲を賜った同大学外科学講座増田 英隆教授、同じく口腔解剖学第 2 講座豊島邦昭教授に深甚なる謝意を捧げます。また、数々の御援助をいただき、日夜、激励していただいた久保田信幸技師をはじめとする動物実験施設職員、さらに御協力、御助言をいただいた関係各位に深謝します。最後に、本研究に用いました LEC ラットを分与していただきました、北海道大学 LEC ラット研究会に感謝いたします。

本論文の要旨の一部は、第 52 回九州歯科学会総会 (1992 年 5 月 30 日、北九州)、第 114 回日本獣医学会 (1992 年 9 月 30 日、札幌)、日本電子顕微鏡学会第 49 回学術講演会 (1993 年 5 月 26 日、神戸)、第 116 回日本獣医学会 (1993 年 10 月 5 日、山口)、第 99 回日本解剖学会総会 (全国学術集会) (1994 年 3 月 30 日、山形) において発表した。

なお、本研究の一部は、平成 4 年度文部省科学研究費補助金奨励研究 (A) 04760210 の補助によって行われ

た。

引用文献

- 1) Mori, M., Yoshida, M. C., Takeichi, N. and Taniguchi, N. (ed.): The LEC Rat. A New Model for Hepatitis and Liver Cancer. Springer-Verlag, Tokyo, 1991, 1-2.
- 2) 森 道夫: 消化器—肝, 胆嚢, 胆道, 膵. 新病理学各論 (菊池浩吉, 吉木 敬編). 南山堂, 東京, 1992, 281-335.
- 3) 下田 敦, 蓑内慶次, 松下栄紀, 金子周一, 小林健一: HBC と肝発癌. 外科治療 73: 502-504, 1995.
- 4) 織田敏次, 服部 信, 御厨修一, 岡 博 (編): 肝炎・肝硬変・肝癌. 金原出版, 東京, 1990, 1-518.
- 5) 内田俊和: 肝細胞の病理. HBJ 出版局, 東京, 1992, 1-438.
- 6) 小俣政男: 日本の肝癌. 外科治療 73: 487-492, 1995.
- 7) 小池克郎: HBV と肝発癌. 外科治療 73: 493-501, 1995.
- 8) 谷川久一: 肝癌の臨床. 外科治療 73: 519-524, 1995.
- 9) 小俣政男, 奥平剛史, 白鳥康史: 慢性肝炎の組織診断. 病理と臨床 13: 1208-1209, 1995.
- 10) 前山史朗, 打越敏之: C 型肝炎とその他の肝疾患. 病理と臨床 13: 1230-1240, 1995.
- 11) 中沼安二, 平田公一: 慢性進行性肝疾患に見られる微小異型肝細胞性病変の病理. 病理と臨床 13: 1355-1364, 1995.
- 12) 五百蔵一男, 田辺晴康: 肝疾患と歯科治療. 歯界展望 75: 442-445, 1990.
- 13) 井田勝也: 有病者診断・肝硬変患者の診断上の注意点. Dental Diamond 17: 46-49, 1992.
- 14) 西田百代: 有病高齢者歯科治療のガイドライン・肝硬変患者の歯科治療. クインテッセンス 11: 1918-1928, 1992.
- 15) 西田百代: 有病高齢者歯科治療のガイドライン・ウイルス性肝炎患者の歯科治療. クインテッセンス 11: 2144-2157, 1992.
- 16) 榎本 真: 消化器および肝臓. 実験動物の病理組織 (榎本真, 林 裕造, 田中寿子編). ソフトサイエンス社, 東京, 1980, 312-359.
- 17) 望月洋一, 細川眞澄男: 腫瘍総論. 新病理学総論 (菊池浩吉, 吉木 敬編). 南山堂, 東京, 1993, 461-516.
- 18) 武市紀年: LEC ラット—肝炎・肝癌自然発症動物—. CRJ LETTERS 4: 1-10, 1991.
- 19) Yoshida, M. C., Masuda, R., Sasaki, M., Takeichi, N., Kobayashi, H., Denpo, K. and Mori, M.: New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rat. J. Hered. 78: 361-365, 1987.
- 20) 笠井憲雪: 肝炎肝癌モデル・LEC ラット. アニテックス 4: 114-121, 1992.
- 21) 榎本克彦, 都築直人, 服部淳夫, 森 道夫, 菅原直毅, 磯貝 浩: 肝炎・肝癌自然発症 LEC ラット. アニテックス 4: 202-205, 1992.
- 22) Masuda, R., Yoshida, M. C., Sasaki, M., Denpo, K. and Mori, M.: Hereditary hepatitis of LEC rats is controlled by single autosomal recessive gene. Lab. Anim. 22: 166-169, 1988.
- 23) 吉田勉弘, 小野教夫, 増田隆一: 肝炎ラット LEC の遺伝子の探索. アニテックス 6: 128-130, 1994.
- 24) Li, Y., Togashi, Y., Sato, S., Emoto, T., Kang, J.-H., Takeichi, N., Kobayashi, H., Kojima, Y., Une, Y. and Uchino, J.: Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis. J. Clin. Invest. 87: 1858-1961, 1991.
- 25) Goldfischer, S.: The localization of copper in the pericanalicular granules (lysosomes) of liver in Wilson's disease (Hepatolenticular degeneration). Am. J. Pathol. 46: 977-983, 1965.
- 26) Miyamura, H., Nakanuma, Y. and Kono, K.: Survey of copper granules in liver biopsy specimens from various liver abnormalities other than Wilson's disease and biliary diseases. Gastroenterol Jpn 23: 633-638, 1988.
- 27) 澤 明彦, 沖田 極: Wilson 病. 微量元素と消化器疾患 (荒川泰行・竹内重雄編). 新興医学出版社, 東京, 1990, 101-105.
- 28) Yano, M., Nishimura, N., Takigawa, T., Hayashi, H., Takahashi, H. and Mori, M.: Hepatic copper and iron in LEC rats and patients with Wilson's disease. J. Clin. Electron Microscopy 24: 608, 1991.
- 29) 遠山千春, 本間志乃: 銅. Toxicology Today (佐藤 洋編). 金芳堂, 京都, 1994, 63-70.
- 30) 須田真津子, 有馬正高: 遺伝性疾患—とくに Wilson 病と Menkes 病. Clin Neurosci 12: 187-189, 1994.
- 31) 鈴木和夫: メタロチオネインが関与する微量元素の毒性と疾患. 季刊 化学総説 No. 27 (日本化学会編). 学会出版センター, 東京, 1995, 153-165.
- 32) 中沼安二, 片柳和義: 慢性肝炎類似疾患. 病理と臨床 13: 1251-1262, 1995.
- 33) Cheng, W. S. C., Govindarajan, S. and Redeker, A. G.: Hepatocellular carcinoma in a case of Wilson's disease. Liver 12: 42-45, 1992.
- 34) Sternlieb, I.: Copper and the liver. Gastroenterology 78: 1615-1628, 1980.
- 35) Wilkonson, M. L., Portmann, B. and Williams, R.: Wilson's disease and hepatocellular carcinoma: possible protective role of copper. Gut 24: 767-771, 1983.
- 36) 鈴木一幸, 佐藤俊一: 原発性肝癌. 微量元素と消化器疾患 (荒川泰行・竹内重雄編). 新興医学出版社, 東京, 1990, 98-101.
- 37) 及川伸二, 川西正祐: 発癌過程における微量元素の役割. 季刊 化学総説 No. 27 (日本化学会編). 学会出版センター, 東京, 1995, 93-106.
- 38) Namieno, N., Takeichi, N., Sasaki, M., Denpo, K., Mori, M., Uchino, J. and Kobayashi, H.: Clinical and

- pathological characteristics of LEC rats with spontaneous hepatitis. In: *The LEC Rat. A New Model for Hepatitis and Liver Cancer* (ed. by Mori, M., Yoshida, M. C., Takeichi, N. and Taniguchi, N.). Springer-Verlag, Tokyo, 1991, 41–53.
- 39) Manba, K., Taniguchi, K., Kagabu, S. and Makita, T.: Quantitative and morphological studies on the influence of zinc deficiency on the liver of pregnant rats. *Jpn. J. Vet. Sci.* 51: 566–573, 1989.
 - 40) National Research Council ed: 木村正己, 小滝規子 訳: 銅. 環境汚染物質の生体への影響 12 銅・鉄 (木村正己・荒記俊一 他訳). 東京化学同人, 東京, 1981, 1–59: Medical and biologic effects of environmental pollutants COPPER, National Academy of Science, Washington, D. C., 1977.
 - 41) 村井哲夫, 森 三樹雄, 佐藤尚武: やさしい臨床病理学. 南山堂, 東京, 1993, 41–62, 147–154, 164–165.
 - 42) 松本一彦: 血液生化学的性状. 実験動物の生物学的特性データ (田嶋嘉雄監修). ソフトサイエンス社, 東京, 1989, 159–166.
 - 43) Li, Y., Togashi, Y., Sato, S., Emoto, T., Kang, J.-H., Takeichi, N., Kobayashi, H., Kojima, Y., Une, Y. and Uchino, J.: Abnormal copper Accumulation in non-cancerous and cancerous liver tissues of LEC rats developing hereditary hepatitis and spontaneous hepatoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 82: 490–492, 1991.
 - 44) Kato, J., Kohgo, Y., Sugawara, N., Katuki, S., Shin-tani, N., Fujikawa, K., Miyazaki, E., Kobune, M., Takeichi, N. and Niitsu, Y.: Abnormal hepatic iron accumulation in LEC rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 84: 219–222, 1993.
 - 45) Suzuki, K., Miyazawa, N., Nakata, T., Seo, H.-G., Sugiyama, T. and Taniguchi, N.: High copper and iron levels and expression of Mn-superoxide dismutase in mutant rats displaying hereditary hepatitis and hepatoma (LEC rats). *Carcinogenesis* 14: 1881–1884, 1993.
 - 46) 齊藤洋子: LONG-EVANS Cinnamon (LEC) ラットにおける肝・腎・全脳の銅・亜鉛・鉄・セレン含量の加齢に伴う変化. *東邦医会誌* 40: 405–413, 1993.
 - 47) Aust, S. D., Morehouse, L. A. and Thomas, C. E.: Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Radicals Biol. Med* 1: 3–25, 1985.
 - 48) 森 道夫, 佐藤昌明, 水無瀬 昂, 榎本克彦: 肝疾患の電子顕微鏡像の読み方. *電子顕微鏡* 27: 254–260, 1993.
 - 49) 谷川久一, 向坂彰太郎: 肝疾患. 医学・生物学研究のための電子顕微鏡学II. (実際編) (WHO 電子顕微鏡診断学研究研修センター編). 藤田企画出版, 埼玉, 1987, 166–185.
 - 50) 円山英昭: 肝臓, 診断の決め手となる電子顕微鏡所見. 病理組織診断における電子顕微鏡の有用性. *病理と臨床* 別冊: 28–33, 1992.
 - 51) Biempica, L., Rauch, H., Quintana, N. and Sternlieb, I.: Morphologic and chemical studies on a murine mutation (toxic milk mice) resulting in hepatic copper toxicosis. *Lab. Invest.* 59: 500–508, 1988.
 - 52) Fujii, Y., Shimizu, K., Satoh, M., Fujita, Y., Li, Y., Togashi, Y., Takeichi, N. and Nagashima, K.: Histochemical demonstration of copper in LEC rat liver. *Histochem.* 100: 249–256, 1993.
 - 53) 飯塚雄俊, 児玉浩子, 綱川亜紀子, 長谷昌和, 阿部敏明: LEC ラット肝臓でのセルロプラスミンと銅の代謝. *日本先天代謝異常学会雑誌* 8: 123, 1992.
 - 54) 佐加良英治: 肝炎高発系 LEC ラットにおける銅欠乏飼料投与の影響 第2報: 長期投与が肝癌に及ぼす影響について. *九州歯会誌* 47: 390, 1993.
 - 55) Takahashi, H., Enomoto, K., Nakajima, Y. and Mori, M.: High sensitivity of the LEC rat liver to the carcinogenic effect of diethylnitrosamine. *Cancer Lett* 51: 247–250, 1990.