遺伝性肝炎ラットにみられる肝病変の病理

伝法公鷹 小山田正人 藤本佳範 高橋秀俊 佐藤 睦 服部淳夫

森 道夫 札幌医科大学病理学第2講座

増田隆一 吉田勉弘 北海道大学理学部動物染色体研究施設

PATHOLOGICAL CHANGES OF THE LIVER IN LEC RATS WITH HEREDITARY HEPATITIS

Kimimaro Dempo, Masahito Oyamada, Yoshinori Fujimoto, Hidetoshi Takahashi, Mutsumi Satoh, Atsuo Hattori, and Michio Mori Department of Pathology, Sapporo Medical College
Ryuichi Masuda and Michihiro C. Yoshida Chromosome Research Unit, Faculty of Science, Hokkaido University

Abstract: Recently a new mutant causing hereditary hepatitis was established from non-inbred Long-Evans rats. Hepatitis with severe jaundice appears spontaneously in rats 4 months after birth. Some affected rats die of submassive hepatic necrosis, while others survive for a long life. Liver cancers appear in these long survived rats. The hereditary hepatitis rats thus provide an animal model useful for the basic and clinical studies of hepatitis and liver cancer. (J Toxicol Pathol 1: 53~60, 1988)

Key words: LEC rat, Hereditary hepatitis, Animal model, Oval cells, Hepatoma

序 文

遺伝性肝炎ラット(以下LECラット)は、最近ヒトの疾病モデル動物として開発樹立され、近交系として維持されているLong-Evans系ラットである^{1,2,3}。この動物は生後1カ月頃まで正常に成長するが、2~3カ月頃から発育がまちまちになる。4カ月頃に突然黄疸が現れ、一部は発黄2週間以内に肝機能不全で死亡する。一部の動物は黄疸を発現したあと回復し、あるいは全く黄疸を発現せず、長期生存する。1年半以上生存したものには、高率に肝腫瘍が発生する。したがってこの動物は、初期には劇症型の肝炎、後期には肝癌のモデル動物となる。肝炎の発症は、LECラットと他の肝炎を発症しない系統との交配実験の結果、単一の遺伝

子(これをMasuda *et al.* は *hts* 遺伝子と呼ぶことを提唱している⁴)で支配され、常染色体性劣性遺伝形式に従うことが、ほぼ明らかにされた。このような疾病モデル動物の報告はこれまで知られていない。

現在、肝炎の原因は、*hts* 遺伝子による何らかの代謝異常と考えられているが、その成因を検索するためにも、肝病変の詳細な検索が必要である。この小論では、このLECラットにみられる肝病変の経時的な変化について概説する。

材料および方法

1. 動物

遺伝性肝炎ラットは、北海道大学実験生物センターげっ歯類飼育部で開発樹立され、近交系で維持されているLong-Evans系ラットである。1975年、神戸大学医学部杉山武敏教授より非近交系として譲り受けたが、同部では毛色の違いから2系の近交系ラット(Long-Evans rat with a cinna-

mon-like coat color: LEC と Long-Evans rat with an agouti coat color: LEA) を分離した。これらを系統維持しているうちに、1984 年、当時飼育担当の加賀美和子氏が第 24 代目の LEC の雄に、はじめて黄疸が出現し、1 週間で死亡することに気付いた。同氏は、それ以降に繁殖維持する LEC の中に、高率に黄疸の出現することに気が付き、LEC の維持に細心の努力を注いだことが、この動物の発見の発端であった。その後、同氏の依頼により、我々は種々の検索をし、ヒトの肝炎・肝癌の疾病モデル動物として開発樹立することに成功したものである。また、LEA は肝炎を発症せず、LEC の良い対照群となることが分かった。これらの動物の供給を同センターから受け、繁殖用固型飼料（オリエンタル社、NMF）で飼育し、経時的に肝組織を採取した。

2. 方法

肝組織は Carnoy または Bouin 液で固定して Hematoxylin-Eosin 染色 (H.E.) を、アセトン固定して免疫組織学的染色、または glutar aldehyde-formalin 混合液で固定して電顕的検索を行った。抗 glutathione S-transferase placental form (GST-p) 抗体は Sato *et al.* のもの⁵、抗 α -fetoprotein (AFP) 抗体は我々の作製したもの⁶を用いて、免疫組織学的に検索した。

成績

全経過を通じて LEA ラットには異常を認めなかった。ここでは特に記載せず、以下 LEC ラットの経時的变化だけについて述べる。

1. 光顕所見

胎仔、新生仔、1 カ月のラット肝は正常構造を示した。生後 2~3 カ月の肝組織では、肝細胞の核分裂像が稀にみられ、核の大小不同が認められるが、明らかな肝細胞壊死像や炎症細胞浸潤は認められなかった (図 1)。4 カ月になると、突然貧血と黄疸が出現した。組織学的には小葉の乱れはないが、肝細胞の核と細胞質が腫大し、しばしば核に偽封入体が認められた。腫大した核、細胞質内には異常な物質の蓄積は認められなかった (図 2)。一部の肝細胞は好酸性変性に陥り、類洞内には斑状壊死に陥った肝細胞に由来する好酸体が認められ

た。このために小葉は縮小し、周辺帯には偽胆管の増生も認められた。類洞には胆汁や赤血球を貪食した Kupffer 細胞が認められたが (図 3)、炎症細胞浸潤は Glisson 鞘にも類洞内にも軽度であった。同腹で黄疸を呈さないラットの肝でも、肝細胞は巨大化し、類洞の好酸体をみる一方では、少数の肝細胞に核分裂像を認め、無症状の個体においても肝炎の存在が確かめられた。発黄後死亡した動物では、主として小葉中間帯の肝細胞に亜広汎性凝固壊死が認められ、残存の肝細胞には巨大化が認められた (図 4)。壊死部に好中球浸潤がみられたが、この場合でも炎症細胞浸潤は軽度であった。

黄疸を発現後回復したものや、無症状のものであるが、6 カ月を過ぎると黄疸の発現をみることは少なく、大多数は長期生存した。これらの動物では、巨大肝細胞に隣接して、小葉周辺帯に胆管上皮様の細胞 "oval cell" や、時には小型の再生肝細胞が認められ、ヒトの慢性肝炎と類似の病変を呈していた (図 5)。また、図 7 のような核、細胞質ともに明るい胞体をもつ細胞の集団も認められた。この細胞集は化学発癌過程に出現する酸素偏倚集に類似しており、その後の経過とともに、数と大きさを増す傾向が認められた。生後 1 年では肉眼的、組織学的にも結節がみられ (図 9)、1 年半以降の生存例では、赤色または白色の軟らかい腫瘍が形成され、肺に転移集も認められた。組織学的には索状配列をとる高分化型の肝細胞癌であった (図 10)。

こうした肝細胞の病変の他に、周辺帯には腺管が増生し、結合織に囲まれた胆管線維症 cholangiofibrosis もみられ、肝を広汎に占めるものも認められた。

2. 電顕所見

LEC ラット肝に特徴的な巨大肝細胞では、核の輪郭が不整で、多数の偽封入体が認められた。核質にクロマチンの凝集がみられたが、ウィルス粒子は検出されなかった。細胞質には、大小不同で変形した多数のミトコンドリアが認められ、クリスタが空胞状を呈し、基質の電子密度の高いのが特徴的であった。ミエリン様の構造物が細胞質や毛細胆管内に認められ、ライソソームの増加も目

図1. 生後2カ月の LEC ラットの肝組織。

肝細胞核に大小不同がみられる。少数の細胞分裂像(↑)も認められる。H.E. ×170。

図2. 生後4カ月で黄疸を呈している LEC ラットの肝。小葉構造は保たれている。H.E. ×85。

図3. 図2の拡大像。肝細胞の核と細胞質の腫大が著明であり、類洞内には好酸体(↑)が認められる。H.E. ×170。

図4. 生後4カ月に発黄して死亡した LEC ラットの肝。写真中央部の肝細胞の核の染色性が消失し、凝固壊死に陥っている。Glisson 鞘には偽胆管の増生もみられる。H.E. ×170。

図5. 発黄後1週間で回復した生後5カ月のLECラット肝。Glisson鞘周辺に oval cell の増生がみられる。H.E., $\times 170$ 。

図6. 図5と用じラットについて AFP 産生細胞の免疫組織学的染色。Oval cell の一部が陽性に染色される。 $\times 170$ 。

図7. 生後7カ月のLECラット肝。明るい胞体を持ち、小型の核をもつ肝細胞の集団がみられる。H.E., $\times 170$ 。

図8. 図7と同じラットについて、GST-p の免疫組織化学的染色。細胞巢が陽性を示す。 $\times 170$ 。

図 9. 生後 10 カ月の LEC ラット肝。周辺を圧排する増生結節 (↑) がみられる。H.E., $\times 170$ 。

図 10. 生後 1 年 6 カ月の LEC ラット肝で、索状配列をとる分化型肝癌。H.E., $\times 170$ 。

図 11. 巨大肝細胞の電顕像。核の変形がみられる。ミトコンドリアは基質の電子密度が高く、クリスタの空胞も認められる。多数のリソソームも認められるが、他の小器官には著変は認められない。酢酸ウラニール、鉛二重染色、 $\times 7,000$ 。

立った。一般に顆粒小胞体はよく発達しており、他の小器官はほぼ正常であった。異常な物質の沈着は認められなかった(図11)。

癌細胞の電顕像では、糖原やペルオキシゾームをもち、隣接の細胞と毛細胆管を形成する高分化型の肝細胞癌であった。

3. 免疫組織化学的所見

Oval cellや小型肝細胞の増生をみる肝組織について、AFP産生の有無を検索した。図6のように陽性細胞がみられ、これらはアゾ色素発癌過程でみられる“transitional cell”に相当する細胞であった。

また、6カ月を過ぎた例についてGST-pの有無を検索したが、図8のように小型肝細胞集団が陽性を示し、化学発癌過程でみられる前癌病変と同様の病変と考えられた。

考 察

LECラットにおける発黄後の肝細胞の特徴は、細胞質と核の異常な腫大であるが、組織学的にも、電顕的にも異常な物質の蓄積は認められなかった。これに類似した巨大肝細胞は、アゾ色素肝癌の発生過程にも出現するが、アゾ色素の場合は、電顕的に薬物代謝に関連した滑面小胞体の著明な増加が認められる⁷。したがって、LECラットの巨大肝細胞は、アゾ色素の場合とは異なった機転で形成されたものであることが示唆される。生理的には、老化ラット肝に2核や巨核肝細胞が出現するが、LECラットほどの巨大化はみられない。したがってLECラットの肝細胞が早期から巨大化する機転を検索することが、肝炎の病態を知るうえで重要と思われる。これに関連した興味ある出来事は、発黄後死亡した動物と同腹で、無症状のラット肝の所見で、肝細胞の斑状壊死が散在性にみられる一方で、残存肝細胞に細胞分裂像が散見され、ほとんどの肝細胞が巨大化を示したことである。一般には正常ラットでは、部分肝切除後などの細胞分裂によって2倍体1核の小型の肝細胞が増加する⁸。しかしLECラットの肝では、核分裂に隣接して巨大細胞を認めることから、LECラット肝細胞の巨大化が、核および細胞質の2分裂の障害によると推定することもできるかも知れない。もし

そうであるならば、これらの巨大肝細胞のDNA量は増加しているはずである。現在、核のサイズとDNA量の定量を試みている。このような肝細胞の巨大化が、生後のどの時期から始まるかは、まだ把握できていないが、少なくとも2カ月を過ぎると、肝細胞核の大小不同が認められるので、障害は生後間もなくから徐々に進行しているようである。もしこのラット肝細胞に何らかの増殖障害が潜在しているとすれば、部分肝切除に異常な反応を示す可能性があるので、これに関しても検索中である。肝炎の発生に、免疫異常が関与している可能性も考えられる。LECラットの血中 γ -globulinは、著明に低下している⁹。また、幸田らは細胞性免疫のうちB-リンパ球のLECラットでの機能異常を報告している⁹。

全く発癌物質を投与していないLECラットにおいて、化学発癌過程と同様にoval cellが増生し、AFPも産生され、oval cellから小型肝細胞への移行がみられた。化学発癌におけるoval cellの増生とその意義については、多少の異論はあるものの¹⁰、肝細胞のstem cellとなることは広く受け入れられている^{6,7,11,12}。特にアゾ色素の場合には、他の発癌剤の場合より形態的、機能的にも肝細胞に近い性格を示す移行型肝細胞が認められることはすでに報告した通りである。その意義については、発癌物質によって肝細胞の変性壊死が生じ、中間代謝産物による細胞毒性によって肝細胞自体の分裂、増殖能が著しく抑制されている環境下では、化学物質の代謝を営まない胆管系の細胞が増生し、肝細胞に分化するものと理解される。このような胆管上皮から肝細胞への分化は、個体発生において前腸から胆管と肝細胞が分化する過程でもみられ、特殊な病的状態における肝組織の修復現象と考えられる^{6,7,12}。LECラットでも同様な所見がみられたことは、肝細胞の増殖障害を示唆するものと考えられ、肝細胞の病的状態における再生と思われる。アゾ色素の場合のこのような病的再生の過程で、酸素偏倚巣が形成される機序についてはすでに報告した通りであり¹¹、LECラットの場合についても、同様のことをあてはめうるものと考えられる。いずれにしても、もっと年齢の増したLECラットに、肝腫瘍が高率に発生することとも考え合わせると、興味深い所見である。

早いものでは、生後5カ月のLECラットに、GST-p陽性の前癌病変と考えられる増生巣が認められた。Oyamada *et al.* は、LECラット肝における増生巣の出現頻度を経時的に検索し、年齢とともに増加する傾向を認めている¹⁵。これまで検索した1年半以降のLECラットでは、ほぼ全例に肝癌の発生をみている（未発表データ）。他のラットの系統でも、肝癌の自然発生の報告はなされているが、極めて少数であり、かつ肝癌の頻度も極めて低い¹⁶⁻¹⁸。したがって、LECラットは肝炎だけでなく、肝癌の高発系でもある。問題は、肝癌の発生機序である。現在、発癌過程はinitiation, promotionという、二つの過程からなることが、広く受け入れられている。LECラットにおいては、肝炎が一生続いているので、肝細胞の壊死に続く再生刺激が、promoterとして働くことは推定出来る。問題はヒトの家族性大腸腺腫症のような高発癌性の遺伝子が、LECに存在するか否か、すなわち先天的に“initiated cell”が存在するかどうかということである。我々は予備実験において、initiated cellの存在を示唆する結果を得ており、目下、遺伝子解析を含めた検索を進めている。

以上、LECラットの肝病変について、その概略を述べたが、前述したように、免疫系の異常も確かめられている。こうした肝病変と免疫異常が、共通の遺伝子によって支配されている可能性もあり得るであろう。

謝 辞 この研究のために、貴重な抗体の供与をいただいた弘前大学生化学・佐藤清美教授、動物の飼育を担当していただいた北大生物センター前技官・加賀美和子氏、札幌医大動物実験施設部・半沢武志、川野紀子氏、標本作製に御協力いただいた大谷静治氏に感謝いたします。

なお、この研究の一部は、文部省がん特別研究II（課題番号62015071）の援助を受けた。

文 献

1. 伝法公磨, 吉田迪弘: 疾病モデル動物としての遺伝性肝炎ラット (LEC) を樹立. 医学のあゆみ 141: 982, 1987.
2. Sasaki, M, Yoshida, MC, Kagami, K, Takeichi, N, Kobayashi, H, Dempo, K, and Mori, M: Spontaneous hepatitis in an inbred strain of Long-Evans rats. Rat News Letter 14: 4-6, 1985.
3. Yoshida, MC, Masuda, R, Sasaki, M, Takeichi, N, Kobayashi, H, Dempo, K, and Mori, M: New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rats. J Hered 78: 361-365, 1987.
4. Masuda, R, Yoshida, MC, Sasaki, M, Dempo, K, and Mori, M: Hereditary hepatitis of LEC rats is controlled by a single autosomal recessive gene. Lab Anim 22: 166-169, 1988.
5. Sato, K, Kitahara, A, Sone, Y, Inaba, Y, Hatayama, I, and Sato, K: 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, Kaneko, A, and Onoé, T: Immunofluorescent study on alpha-feto-protein producing cells in the early stage of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene carcinogenesis. Cancer Res 35: 1282-1287, 1975.
7. Onoé, T, Dempo, K, Kaneko, A, and Watabe, H: Significance of α -fetoprotein appearance in the early stage of azo-dye carcinogenesis. Gann Monogr Cancer Res 14: 233-247, 1973.
8. 森道夫, 小川勝洋: 再生 pp 157-168. 現代病理学大系 13A, 消化腺 I, 中山書店, 東京, 1985.
9. 幸田弘信, 上出利光, 伝法公磨, 森道夫, 菊地浩吉, 増田隆一, 吉田迪弘, 関谷千尋: 遺伝性肝炎ラット (LEC) における細胞性免疫機構の検討. 医学のあゆみ 144: 569-570, 1988.
10. Tatematsu, M, Kaku, T, Ekem, JK, and Farber, E: Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. Am J Pathol 114: 418-430, 1984.
11. Dempo, K, Sasaki, M, Kaku, T, Satoh, M, Oyamada, M, and Mori, M: Immunohistochemical studies on α -fetoprotein and albumin containing cells in the liver during ontogenesis and early stage of 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene and 4'-fluoro-4-dimethylaminoazobenzene. Ann NY Acad Sci 417: 195-202, 1983.
12. Onoé, T, Kaneko, A, Dempo, K, Ogawa, K, and Minase, T: α -fetoprotein and early histological changes of hepatic tissue in DAB-hepatocarcinogenesis. Ann NY Acad Sci 259: 167-180, 1975.
13. Price, JM, Harman, JW, Miller, EC, and Miller, JA: Progressive microscopic alterations in the livers of the rats fed the hepatic carcinogens 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene and 4'-fluoro-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res 12: 192-200, 1952.
14. Sell, S and Leffert, HL: An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma. Hepatology 2: 77-86, 1982.
15. Oyamada, M, Dempo, K, Fujimoto, Y, Takahashi, H, Satoh, M, Mori, M, Masuda, R, Yoshida, MC, and Sato, K: Spontaneous occurrence of placental glutathione S-transferase (GST-p)-positive foci in the livers of LEC rats. Jpn J Cancer Res (Gann) 79: 5-8, 1988.
16. 前川昭彦, 滝沢春雄, 林裕造: 癌原性試験に用いるマウス, ラットおよびハムスターの自然発生腫瘍, 変異原と毒性 14: 22-41, 1981.

17. Solleveld, HA, Haseman, JK, and McConnell, EE :
Natural history of body weight gain, survival, and
neoplasia in the F344 rat. JNCI 72 : 929-940, 1984.
18. Ward, JM : Morphology of foci of altered he-
patocytes and naturally-occurring hepatocellular
tumors in F344 rats. Virchows Arch (Pathol Anat)
390 : 339-345, 1981.