

トロトラスト被注入症例におけるアルファ線被曝による
ヒト肝悪性腫瘍発生の病理学的検討

日 出 社

論文題目

トロトラスト被注入症例におけるアルファ線被曝による
ヒト肝悪性腫瘍発生の病理学的検討

指導教官 町並陸生教授

平成7年4月入学
東京大学大学院医学系研究科
病因病理学専攻

氏名 和田郁雄

緒言

1895年にRoentgenによりX線が発見されて診断に応用されるようになって以来、様々な管腔造影剤が開発されたが、重金属である二酸化トリウム ($^{232}\text{ThO}_2$ 及び $^{228}\text{ThO}_2$) が造影剤として用いられたのは、1915年に涙腺造影に用いられたのが最初である(1)。1928年Bluhbaumが気管支造影に二酸化トリウムをコロイド状にして用いてから(2)、水溶性造影剤として血管造影および肝・脾造影に使用されるようになった。さらに1929年ドイツのHyden社から血栓症や注入時の血管痛といった欠点を除いた二酸化トリウムのコロイド水溶液が「Thorotrast」という製品名で市販されてからは、その画像が極めて鮮明であるため、急速に広く世界で用いられるようになった。被投与者は全世界で約250万人から1000万人(3)、日本でも1928年頃より1954年頃までに数千人に使用されたと推定されている(4)。Thorotrastは肝臓、脾臓、血管、リンパ管、気管支、腎盂、精嚢、子宮、卵巣、涙腺、副鼻腔、脳、脊髓腔、瘻孔などの造影剤として用いられたが、日本では第二次世界大戦中に戦傷者の障害部位同定目的に主として血管造影剤として用いられた(5)(6)。

Thorotrastは二酸化トリウムの25%コロイド溶液で、淡褐色で高い粘性を示す(7)。その粒子は電子顕微鏡的に直径30-100Å(平均55Å)の微小で均一な大きさであるが、体内に注入されると急速に数 μm から数百 μm の顆粒に凝集する(8)。血管内に注入された二酸化トリウムは、分子状の場合には急速に尿から体外に排泄されるが、Thorotrastのようなコロイド状の場合には網内系細胞により選択的に貪食され、それらの細胞に数時間以内に多量に沈着する。血管内に注入されたThorotrastは、肝臓に40-60%、脾臓に20-40%、骨髄に2-10%、骨実質に3%、肺に1%、腎に0.1%の割合で臓器に分布すると報告されている(9)(10)(11)(12)が、体外に排泄されにくく、生物学的半減期は200-400年と長期である(13)(14)。一方、Thorotrastの主成分であるトリウム (^{232}Th) の物理学的半減期は 1.39×10^{10} 年と長く、トリウムとその娘核種が主として α 線を放出し続けるため、これらの臓器は注入後から生涯にわたり持続的に α 線の内部照射を受けることになる。 α 線はX線や γ 線より生物学的効果比(RBE: relative biological effectiveness)の高いエネルギー線で、その飛程は生体組織中では短く、例えば肝臓では100 μm 以下であるとされている(15)が、飛跡に沿って著しい組織破壊をもたらす。組織に照射された α 線の線量率を評価する際、Thorotrast顆粒による α 線の自己吸

収率が顆粒の巨大化に伴い10—80%と増加すること、及び臓器に沈着したThorotrast顆粒は不均一に分布（例えば肝臓では1—19倍(16)）することを考慮しなければならない(17)(18)(19)。これらを考慮すると、肝臓における平均線量率は0.3Gy/年であるが、局所線量率は直径5 μ mの顆粒より20 μ mの距離で100Gy/年、直径200 μ mの顆粒より20 μ mの距離で300Gy/年と算定されている(17)(20)(21)。 α 線の被曝が高線量率であると、被曝した組織は壊死に陥り、大量被曝による急性障害として固体は死亡するが、人体の血管内に投与されたThorotrast量は10-20ml(22)、放射能は 8×10^3 - 8×10^4 Bq程度であったため、むしろ晩発障害、特に悪性腫瘍発生が問題となった(23)。この内部被曝による腫瘍発生の可能性は、Thorotrastの皮下注入によるラットの線維肉腫の発生(24)により証明された。以後、マウス、モルモット、ハムスター、ウサギ等の動物実験において、種々の悪性腫瘍誘発作用が報告されている(25)(26)(27)。ヒトの腫瘍では、1942年にWohlwillがThorotrast血管内被注入者に発生した急性白血病を報告(28)したのが最初であり、Thorotrastによる肝腫瘍の報告は、1947年の血管肉腫が第一例目である(29)。日本ではThorotrast被注入後10年を経て生じた胆管細胞癌の剖検例が最初である(30)。以来今日まで、多くの悪性腫瘍発生の報告がなされ、日本(31)(32)(33)(34)(35)(36)(37)、ドイツ(38)(39)、デンマーク(40)(41)、ポルトガル(42)(43)(44)、スウェーデン(45)、アメリカ(46)等の各国にて疫学的調査が継続的に施行されている。これらの疫学的研究によると、有意な発生率の上昇が認められた腫瘍は、肝悪性腫瘍、白血病、骨肉腫であった。Thorotrast被注入者の死亡率の増加は肝悪性腫瘍で対照群の50-145倍、白血病で7-17倍、多発性骨髄腫で3倍、骨肉腫で3倍以上と、肝腫瘍で著しい(36)。

さて、日本の肝悪性腫瘍一般については、肝細胞癌が最多で95.6%を占め、次いで胆管細胞癌3.1%で、血管肉腫は0.1%未満ときわめて稀である(47)。肝細胞癌の頻度は世界各国と比較して高率で、これは肝炎ウイルスによる慢性肝炎、肝硬変症を経て肝細胞癌を生じる症例が多いためであると考えられる。一方、Thorotrast被注入者に発生する肝悪性腫瘍でもこれらの腫瘍が認められるが、日本のThorotrast被注入者の肝線維症においてはB型肝炎ウイルスの感染は少ないと報告されており(48)、胆管細胞癌が最多で35.3%を占め、ついで血管肉腫が24.8%、肝細胞癌が17.3%と報告されている(49)。この傾向はドイツ等の一般に肝腫瘍の少ない地域でも同様で(39)、世界の報告例の集計でも胆管細胞癌が最多で39.9%、次いで血管肉腫が29.3%、そ

して肝細胞癌が14.6%と報告されている(4)。このようにThorotrast被注入者の肝細胞癌の発生頻度は一般の症例に比して低い(34)。

以上の疫学的知見より、Thorotrastには肝腫瘍発生作用があると推測され、Thorotrastの関与した腫瘍発生過程は非被注入者における腫瘍発生過程と異なっていると考えられている。そこで、このような考えが妥当であるかどうかを明らかにするため、Thorotrast被注入者の症例を収集し、その腫瘍発生過程について検討することとした。この症例群は α 線被曝によるヒト腫瘍発生モデルと考えられる。

今日の宇宙時代を迎え、人類が宇宙旅行をする機会が増加すると、宇宙での放射線被曝が問題となると考えられる。宇宙で旅行者の受ける放射線被曝は、例えば火星までの往復旅行(約3年間)では放射線被曝は年間0.3シーベルト(職業被曝の年間線量限度の6倍に相当)で、この多くが α 線等の高LET線によるものと推定されている(50)。被曝防護の観点から、高LET線の人体に対する影響の基礎的研究が重要と考えられる。また、 α 線被曝によると考えられる晩発障害としての腫瘍発生は、その腫瘍発生機序の解明の点からも興味深い。

まず、全国より収集されたThorotrast被注入剖検例の肝プレパラート標本の組織学的再検討を行った。これまでの疫学調査は各施設における診断に基づいて行われており、施設による診断のばらつきがあったため、これを統一すると共に、新たに加わった新規症例の診断を行った。その上で肝のThorotrast関連腫瘍について組織学的分類をおこない、Thorotrastの注入量及び注入後腫瘍発生までの期間との関連について疫学的検討をおこなった。次に、腫瘍組織型と周囲の非腫瘍部におけるThorotrastの沈着量及び線維化との関連を検討した。

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックが入りてきた症例については、種々の腫瘍で腫瘍発生との関連が指摘されている腫瘍関連遺伝子rasおよび癌抑制遺伝子p53を免疫組織化学的に検索し、これらの遺伝子の変異が α 線被曝によるヒト腫瘍発生にも関与するかどうかを検討した。

さらに、肝腫瘍組織及び非腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックよりDNAを抽出してThorotrastによる遺伝子異常を検索し、 α 線障害に特有の遺伝子変化が認められるかを検討した。癌抑制遺伝子p53とRB、及びmannose 6 phosphate /insulin like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) 遺伝子のloss of heterozygosity (LOH)を調べ、これらの遺伝子の腫瘍発生へ

の関与について検討した。さらにp53遺伝子については、遺伝子変異が多くの腫瘍で報告されている exon 5,6,7,8について(51)、遺伝子変異の有無を検索した。

Thorotrastによる線維化は肝実質の類洞壁に強く認められ、小葉内の肝細胞は萎縮傾向にあり、肝細胞の再生像に乏しい。このため、肝硬変症に生じる肝細胞癌において前癌病変と考えられている巨大再生結節や腺腫様過形成の像は認められず、Thorotrastによる肝細胞癌の前癌病変は不明であった。今回の検討でThorotrast関連肝細胞癌の1剖検例に病理組織学的に異型を伴う胆管増生巣の合併を認めたので、免疫組織化学的及び分子生物学的検討を行い、この部分が前癌病変である可能性について検討した。

対象と方法

I. 剖検症例の病理組織学的検索

a. 検索した症例と組織診断

Thorotrast被注入者の剖検例肝プレパラート標本144例を文部省トロトラスト研究班として全国より収集した。この中にはこれまでの統計(36)に用いられていない新規症例15例が含まれている。症例は全例日本人、性別は男性131例、女性13例である。男性に多いが、これはThorotrastが主として戦傷者の診断に使用されたことによる。収集した標本の腫瘍組織型の再検討を原発性肝癌取り扱い規約(第3版)に基づいて行った。

b. 腫瘍組織型とThorotrastの注入量及び注入後腫瘍発生までの期間との関係

腫瘍組織型とThorotrastの注入量及び注入後腫瘍発生までの期間との関係について統計学的検定をおこなった。この際、Thorotrastが注入された年齢が高いと、腫瘍が発生するために必要な期間内に死亡してしまう傾向が認められるため(図1)、注入年齢が30歳未満の症例を抽出して解析した。Thorotrastの注入量及び注入後腫瘍発生までの期間は剖検時の臨床プロトコールに基づき、記載のない例については対象から除外したが、生前に診断のつかなかった例及び記載のない例の腫瘍発生の時期については、死亡年を代用した。これは、わが国のThorotrast血管内注入例では、肝腫瘍の予後が著しく悪く、発見から死亡までの期間が平均3ヶ月と短いことが知られているためである(52)(53)。検定法としては、対応のない多群間のNonparametric検定であるKruskal-Wallis法を用い、有意差の認められたものに対してDunnnett法にてNonparametric多重比較検定を行った。統計値はStat View Ver. J-4.5 (Abacus Concepts Co.) 及びNP Multi (by O.Nagata) を用いて計算した。

c. 非腫瘍部におけるThorotrastの沈着と線維化

腫瘍近傍の肝非腫瘍部における門脈域へのThorotrastの沈着の程度を以下の3段階(D1-3)に分類した。D1: Thorotrast沈着の認められる門脈域が全体の10%以下で、各門脈域における沈着量もわずかであるもの。D2: Thorotrast沈着量がD1とD3の間のもの。D3: Thorotrast沈着がほぼすべての門脈域に認められ、かつ、門脈域全体に沈着があるもの。(表1) また、肝小葉内の線維化の程度を次の4段階(F1-4)に評価した。F1: 門脈域の線維性拡大はほとんど認められず、肝小葉内の線維化もわずかなもの。F2:

軽度の門脈域の線維性拡大が認められ、周囲の類洞壁に軽度の線維化が認められるもの。F 3：門脈域の線維性拡大と小葉の広い範囲に高度の線維化が認められるが、残存する肝細胞の索状構造が認められるもの。F 4：高度の肝小葉内線維化が広い範囲に認められ、肝細胞は高度に萎縮し、索状構造が不明瞭化しているもの。偽胆管の増生が著明である。(表2) このgrade分類を用いて肝非腫瘍部のThorotrastの沈着度及び線維化度と腫瘍組織型との関係について統計学的検定をおこなった。検定法としては先の検定と同様に Kruskal-Wallis 法を用い、有意差の認められたものに対し Dunnett 法による多重比較検定を行った。

d. 腫瘍関連遺伝子の免疫組織化学的検討

腫瘍関連遺伝子rasおよび腫瘍抑制遺伝子p53の変化について免疫組織化学的に検討した。対象は、パラフィン包埋ブロックの入手できた剖検例の中で、非腫瘍部において組織学的に再生結節を示さずThorotrastに特徴的な線維化を示すもので、抗HBV抗体及び抗HCV抗体(表3)の免疫組織化学染色にてウイルス性肝炎陰性を示す標本とした。腫瘍の病理組織型は肝細胞癌11例、胆管細胞癌5例、血管肉腫3例の計19例であった。

免疫組織化学染色の方法は、まず4 μ m厚のパラフィン切片を作製し、脱パラフィンした。抗原の賦活化に必要な抗体については、検体を10mM クエン酸バッファー(pH 6.0) 中にて30分間microwave処理を行った。1% 過酸化水素水加メタノール中にて30分内因性peroxidaseをブロックした後、酵素抗体法(SAB法: Streptavidin-biotin-peroxidase complex method)にて染色した。染色にはHistofine SAB kit (Nichirei) を用い、染色法は使用説明書に準じて行ったが、希釈した一次抗体とは4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させる条件でおこなった。使用した一次抗体はrasはmouse monoclonal 抗体 Ab-1 (Oncogene Science)で希釈率 1:50、p53はmouse monoclonal 抗体 DO-7 (Novocastra)で希釈率 1:200、p53については抗原の賦活化をおこなった(表3)。陽性コントロールにはras、p53ともに大腸癌を用いた。陰性コントロールとしては、一次抗体作成に用いられた免疫動物種由来であるmouse IgG (DAKO)を一次抗体の代わりに使用して同じ処理を行った検体を用いた。染色の陽性陰性の判定については、検体の保存状態不良のためと考えられる抗原性の失活のために陽性であっても染色の程度が弱い傾向があるので、標本中に一部かつ弱くとも陽性を示す部分があれば、陽性と判定した。

e. 類洞の変化についての免疫組織化学的検討

Thorotrast被注入者の肝においては、類洞壁の線維化が目立つが、その変化をさらに検討するため、上記のパラフィン包埋ブロックの入手できた症例を対象に、以下の免疫組織化学的検討を行った。まず、類洞の血管としての性質を検討するため、血管内皮細胞のマーカーであるFactor VIII (Factor VIII related antigen, von Willebrand factor)及びCD34を染色した。次に、Kupffer細胞の数を調べるため、マーカーであるCD68を染色した。染色は、上記同様Histofine SAB kit (Nichirei) を用いた酵素抗体法 (SAB法) にて染色した。希釈した一次抗体とは4℃で一晩反応させる条件でおこなった。使用した一次抗体はFactor VIIIはmouse monoclonal 抗体 F8/86 (DAKO) で希釈率 1:50、CD34はmouse monoclonal 抗体 MY10 (Becton-Dickinson) で希釈率 1:25、CD68はmouse monoclonal 抗体 Kp-1 (DAKO) で希釈率 1:100である。Factor VIIIとCD68については抗原の賦活化をおこなった (表3)。陽性コントロールにはFactor VIII、CD34では標本内に存在する門脈域の血管内皮細胞を用いた。CD68では真菌症に認められた肉芽腫を用いた。陰性コントロールとしては一次抗体作成に用いられた免疫動物種由来であるmouse IgG (DAKO) を一次抗体の代わりに使用して同じ処理を行った検体を用いた。

I I. Thorotrast関連肝腫瘍の分子生物学的検討

a. p53, RB, M6P/IGF2R遺伝子のLOHの検索

免疫組織化学的検索で用いたThorotrast関連肝腫瘍の19例について、p53、RB、M6P/IGF2Rの各遺伝子についてLOHの検索をおこなった。まず、各ブロックより10 μm厚のパラフィン切片を20枚ずつ作製し、脱パラフィンした。Hematoxylinにて核染色を行って、腫瘍及び非腫瘍部を区別し、実体顕微鏡下でメスで選択的に採取した。削り取った組織片をProtease Kで一晩処理した後、DNAを通常のフェノール・クロロホルム法で抽出し、エタノール沈殿で精製した。p53、RB、M6P/IGF2Rの各遺伝子近傍の多型を示すmicrosatelliteを選択し、後述の各々のprimerを用い、抽出したDNAを鋳型としてpolymerase chain reaction (PCR) を行った。

gene	site	chromosome	primer sequence
p53	TP53	17p13	(5'- CCCCATTCCTTTCCCTA -3') (5'- ACTATTCAGCCCGAGGTGC -3')

p53	D17S786	17p13	(5'- TGTTTTCCAAATCACATGTA -3')
			(5'- GAATTCTCTTTTATGGTTGT -3')
RB	D13S270	13q14	(5'- CTGGAAATGCCTTGGAAGGA -3')
			(5'- AGTGCCTGGGTATGAACGTG -3')
M6P/IGF2R	exon48	6q25-27	(5'- AGTCAGGAATGGCTGCACC -3')
			(5'- CAAATCAATCTTTGGGCAGG -3')

PCR反応は、10xPCR reaction buffer 2.5 μ l (100mM Tris-HCl(pH8.3 at 20°C), 15mM magnesium chloride, 500mM potassium chloride; Boehringer Mannheim Corp.), four dNTPs mixture 4nmol (Toyobo), forward and reverse primers 各 25pmol, Taq DNA polymerase 0.25 μ l (Boehringer Mannheim Corp.) [α -³²P] dCTP 0.1 μ l (6000Ci/mmol, 10mCi/ml; Amersham), DNA template 2.5 μ lを含む25 μ lの系で行った。PCR反応はPerkin Elmer GeneAmp PCR Systemを用いて、94°C 5分間反応させた後、denaturing (94°C 30秒間)、annealing (後述の最適温度にて60秒間)、extension (72°C 60秒間)の反応を35サイクル行い、最後に72°C 5分間反応させた。各primerのannealing温度はTP53 58°C、D17S786 57°C、D13S270 57°C、M6P/IGF2R exon48 63°Cである。反応後、loading buffer (90% formamide, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol and 0.05% xylene cyanol)で10倍に希釈し、99°Cにて10分間加熱してから、その2 μ lを89mM Tris-borate、2mM EDTA、7.0Mの尿素を加えた6% denaturing polyacrylamide gelで40W 20°Cの条件下に電気泳動した。泳動後、ゲルを乾燥させ、X線フィルムに-80°Cで一晩感光させた。結果の判定は、非腫瘍部においてalleleのheterozygosityが認められるものをinformativeと判定した。そして、informative caseのうち、非腫瘍部と比較して腫瘍部の1本のalleleがもう1本のalleleよりも明らかに減弱している場合(50%以下の強度に低下していることを条件にした)をLOHありと判定した。

b. p53遺伝子の遺伝子変異の検索

上記の19検体について、前項で比較的高頻度にLOHが認められたp53遺伝子の遺伝子変異を検索した。まず、遺伝子変異のhot spotとされるexon 5, 6, 7, 8について Single strand conformation polymorphism analysis (SSCP) analysisを

行って、遺伝子変異の有無を検索した。最初に、後述のprimerを用いてPCR法を行った。PCR反応溶液の組成は、microsatellite analysisの場合と同様である。PCR反応は、94℃で5分間反応させた後、denaturing (94℃ 30秒間)、annealing (後述の至適温度にて60秒間)、extension (72℃ 60秒間)の反応を35サイクル行い、最後に72℃ 5分間反応させた。annealingの温度は、exon 5は58℃、exon 6は67℃、exon 7は67℃、exon 8は62℃とした。PCR反応液をloading buffer (90% formamide, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol and 0.05% xylene cyanol)で10倍に希釈し、99℃にて10分間加熱してから、その2 μ lを89mM Tris-borate, 2mM EDTAを加えた6%のnon-denaturing polyacrylamide gelで3.5W 4℃の条件下に電気泳動した。泳動後、ゲルを乾燥させ、X線フィルムに-80℃で一晩感光させた。結果の判定は、非腫瘍部と比較して腫瘍部のbandの位置が変化している場合、そのbandを変位bandと判定した。

Primer sequences

- exon 5 (5'- TGCTTTATCTGTTCACTTGT -3')
(5'- AGAGCAATCAGTGAGGAATC -3')
- exon 6 (5'- GAGACGACAGGGCTGGTTG -3')
(5'- ACCCGGAGGGCCACTGAC -3')
- exon 7 (5'- CTTGCCACAGGTCTCCCCAA -3')
(5'- GGTCAGCGGCAAGCAGAGAC -3')
- exon 8 (5'- TTAAATGGGACAGGTAGGAC -3')
(5'- GATAAAAGTGAATCTGAGGCAT -3')

変位bandが認められたexonについては、sequencingを施行した。SSCP analysisの変位bandに対応する部分のgelをメスで切り出し、DNAを純水100 μ lに溶出させ、上記と同一の条件(但し、反応液は全量で100 μ l)でPCRを施行した。PCR産物をHigh Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN, USA)を用いて精製し、SequiTherm Cycle Sequencing Kit (Epicentre Technologies Corp., Madison, Wisconsin, USA)を用いてsequencingを施行した。sequencing反応は使用説明書に準じて行った。反応後、microsatellite analysisの場合と同様に処理し、6% denaturing polyacrylamide gelで40W 50℃の条件下に電気泳動した。泳動後、ゲルを乾燥させ、X線フィルムに-80℃で一晩感光させ、遺伝子変異を検索した。

111. Thorotrast関連肝細胞癌の前癌病変についての検討

群馬大学にておこなわれたThorotrast関連肝細胞癌の剖検例に病理組織学的に異型を伴う胆管増生巣の合併を認めたので、ホルマリン固定標本及び凍結材料を入手して以下の検討を行い、この部分が前癌病変である可能性について検討した。

a. 症例

症例は75歳の男性で、第二次世界大戦に従軍中、1942年に頭部外傷を受け、精査目的の血管造影の際、Thorotrastの注入を受けた。1953年に肝機能異常が出現した。1996年1月右側腹部痛が生じ、精査したところび慢性に広がる肝細胞癌を指摘された。手術の適応は無く、化学療法および放射線療法を勧められたが、本人が拒否し、対症療法のみにて経過観察された。肝機能低下が進行し、5月4日永眠された。解剖は死後4時間で行われた。

b. 免疫組織化学的検索

剖検時に採取された肝腫瘍および非腫瘍部の組織は、10% buffered formalin (pH7.4)中で3日固定してから、paraffinに包埋された。これらについてHE染色、AZAN染色、鍍銀法、Victoria Blue染色等にて組織像を観察した後、抗HBV抗体及び抗HCV抗体による免疫組織化学染色にてウイルス性肝炎の有無を検討した。さらに、腫瘍関連遺伝子ras、腫瘍抑制遺伝子p53、肝細胞の増殖を促進し、肝腺腫発生に関与しているとされるestrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PgR)、G0期以外の核に発現される細胞増殖マーカーのKi-67、2価金属のキレート剤であるmetallothioneinを免疫組織化学的に検索した。使用した一次抗体は、rasはmouse monoclonal 抗体 Ab-1 (Oncogene Science)で希釈率 1:50、p53はmouse monoclonal 抗体 DO-7 (Novocastra)で希釈率 1:200、ERはmouse monoclonal 抗体 (Nichirei)で希釈すみ、PgRはmouse monoclonal 抗体 (Nichirei)で希釈すみ、Ki-67はmouse monoclonal 抗体 MIB-1 (Immunotech)で希釈率 1:50、metallothioneinはmouse monoclonal 抗体 E9 (DAKO)で希釈率 1:50である。p53、ER、PgR、Ki-67については抗原の賦活化をおこなった(表3)。陽性コントロールにはras、p53、Ki-67は大腸癌、ER、PgRは正常子宮内膜、metallothioneinは化学療法後の卵巣癌の組織を用いた。陰性コントロールとしては一次抗体作成に用いられた免疫動物種由来であるmouse IgG (DAKO)を一次抗体の代わりに使用して同じ処理を行った検体を用いた。染色にはHistofine SAB kit

(Nichirei) を用い、染色方法は前述と同様におこなった。

c. 分子生物学的検索

組織学的検索に使用した組織の断面と対応する肝腫瘍、非腫瘍部の肝組織及び増生した異型胆管組織と、併せてThorotrastの沈着量の多いとされる脾、骨髄と、少ないとされる胃、膵臓を採取した。組織片はOCT compoundに包埋し、液体窒素で凍結、 -80°C で保存した。各組織よりクリオスタットによるHE染色用切片を1枚と $10\mu\text{m}$ 厚の未染切片を10枚ずつ作成し、HE染色での組織像を参考にして未染切片各々から腫瘍および非腫瘍成分を選択的に採取した。Protease Kで一晩処理した後、通常フェノール・クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿でDNAを精製した。方法は上記I I.にておこなったのと同様で、Primerも同じものを持ちいた。LOHの認められたp53遺伝子については、さらに上記と同様にSSCP analysis及びsequencingを行い、遺伝子変異を検索した。

結果

I. 病理組織学的所見

a. 症例と組織像

症例は144例で全例日本人、性別は男性131例、女性13例で、男性に多いが、これはThorotrastが主として戦傷者に使用されたことによる。発生する悪性腫瘍は(表4)、肝細胞癌21例(中分化型20例、低分化型1例)、胆管細胞癌37例(高分化型10例、中分化型20例、低分化型7例)、血管肉腫30例(sinusoid type 15例、cavernous type 11例、solid type 4例)、多重癌3例(肝細胞癌+胆管細胞癌1例、肝細胞癌+血管肉腫2例)、転移性腫瘍5例であった。腫瘍の認められない例は48例あった。Thorotrastの注入時年齢は平均 25.6 ± 5.9 歳、Thorotrast注入から腫瘍発生までの期間は平均 35.1 ± 7.2 年、Thorotrast注入量は平均 16.2 ± 12.6 mlであった。

Thorotrast関連肝腫瘍は、肝細胞癌では厚い索状構造を示す中分化型が主であるが、一部索状構造の不明瞭化した低分化型もみとめられた(図2)。その組織像は肝硬変症に続発する肝細胞癌と差違を認めなかった。胆管細胞癌の組織像は管腔構造を示す高分化型から線維化の強い低分化型まで認められたが(図3)、これも非Thorotrast被注入者におけるものと相違は認められなかった。肝血管肉腫については、取り扱い規約上の分類が未だ定まっていないが、神代らの分類(54)に従うと、紡錘形の腫瘍細胞が拡張した類洞に沿うsinusoidal type、腫瘍細胞が線維性結合織に沿い海綿状に増殖するcavernous type、腫瘍細胞が血管腔を形成せず充実性に増殖するsolid typeが認められた。ただし、これらの組織型は併存することが多く、また、血管肉腫の周囲にはしばしば拡張した類洞を示す非腫瘍性の肝組織が認められた(図4)。

注入されたThorotrastは主として肝被膜下や門脈域に沈着していた(図5)。肝小葉内ではThorotrastはKupffer細胞に貪食されているのが認められた(図6)。非腫瘍部には門脈域だけでなく類洞壁に強い線維化が認められ、肝硬変症の線維化のパターンと異なっていた(図7)。炎症細胞浸潤は門脈域には認められるが、小葉内には軽度であり、single cell necrosisもほとんど認められなかった。繊維化の高度な部分では、異型に乏しい偽腺管増生がしばしば認められた。(図8)。肝細胞は再生像に乏しく、再生結節は少なく、肝細胞癌の前癌病変の可能性が指摘されている腺腫様過形成の像は認められなかった。

b. 腫瘍組織型とThorotrastの注入量及び注入後腫瘍発生までの期間との関係

注入されたThorotrast量については、肝細胞癌 14.5 ± 6.5 ml、胆管細胞癌 12.6 ± 3.2 ml、血管肉腫 13.7 ± 4.5 ml、腫瘍なし 20.3 ± 18.6 mlと各組織型間に有意差は認められなかった(表5)。一方、注入後期間については肝細胞癌 39.5 ± 7.6 年、胆管細胞癌 35.0 ± 6.5 年、血管肉腫 37.7 ± 5.6 年、腫瘍なし 31.9 ± 7.0 年と、5%の有意水準で肝細胞癌は他の3群よりも注入から腫瘍発生(または死亡)までの期間が長いことが示された(表6)。

c. 非腫瘍部における線維化度とThorotrastの沈着度

線維化はThorotrastの沈着した門脈域だけでなく類洞壁にまで及んでおり、肝硬変症の線維化のパターンと異なっていた。判定可能な症例について肝Thorotrast沈着度を3段階に分類したところ(図9)、D1 18例、D2 91例、D3 11例となり(表7)、各組織型間に有意差は認められなかった。一方、肝線維化度を4段階に分類したところ(図10)、F1 14例、F2 61例、F3 28例、F4 17例となり、5%の有意水準で肝細胞癌は他の3群よりも線維化の高度な例に多いことが示された(表8)。

d. 腫瘍関連遺伝子の免疫組織化学的検索

腫瘍関連遺伝子ras、腫瘍抑制遺伝子p53の免疫組織化学染色による陽性率は全体で $2/19$ (10.5%) および $4/19$ (21.1%) であった(図11)(表9、10) rasは肝細胞癌 $2/11$ (18.2%)、胆管細胞癌 $0/5$ (0.0%)、血管肉腫 $0/3$ (0.0%) で陽性であった。また、p53は肝細胞癌 $3/14$ (21.4%)、胆管細胞癌 $2/4$ (50.0%)、血管肉腫 $0/4$ (0.0%) で陽性所見を示したが、いずれの陽性例も陽性細胞は少数であった。対照の非Thorotrast被注入肝細胞癌ではp53の陽性率は $5/10$ (50.0%) であり、Thorotrast症例の肝細胞癌は非Thorotrast症例の肝細胞癌に比べp53の陽性率は低かった。

e. 類洞内皮の免疫組織化学的検索

血管内皮細胞のマーカーであるFactor VIII related antigen、CD34は正常肝においては肝静脈の血管内皮には陽性を示すものの、類洞内皮細胞は陰性であった。しかし、Thorotrastの沈着した肝においては拡張した類洞の内皮細胞はFactor VIII related antigen、CD34共に陽性を示し、類洞の血管としての性質が変化していることを示唆している。また、血管肉腫の腫瘍細胞およびその周囲の異型の認められない類洞内皮細胞にも陽性像が認められた(図12)。

一方、類洞壁に存在するKupffer細胞を認識するKp-1を免疫組織化学的に検討したところ、線維化の強い部分では陽性細胞数が減少する傾向が認められた(図13)。

I I. Thorotrast関連肝腫瘍の分子生物学的検討

a. p53, RB, M6P/IGF2R遺伝子のLOHの検索

p53 遺伝子の存在する chromosome 17p13, RB 遺伝子の存在する chromosome 13q14 及び igf2r 遺伝子の存在する chromosome 6q25-27 の microsatellite analysis を行った(図14)。結果は表11の通りである。LOHの頻度は肝腫瘍全体についてみると、17p13は4/15(26.7%), 13q14は1/11(9.1%), 6q25-27は0/10(0.0%)であった。腫瘍組織型別にみると、肝細胞癌では17p13は3/9(33.3%), 13q14は0/5(0.0%), 6q25-27は0/5(0.0%)、胆管細胞癌では17p13は0/4(0.0%), 13q14は1/3(33.3%), 6q25-27は0/3(0.0%)、血管肉腫では17p13は1/2(50.0%), 13q14は0/3(0.0%), 6q25-27は0/2(0.0%)という結果であった。非腫瘍部においてはLOHは認められなかった。

b. p53遺伝子の遺伝子変異の検索

遺伝子変異のhot spotとされるexon 5, 6, 7, 8について、SSCP analysis及び変位bandからのsequencingを行い、遺伝子変異を検索したところ、8例(42.1%)においてexon 5, 6, 7, 8内に遺伝子変異を認めた(表11)。腫瘍組織型別にみると、肝細胞癌では7/11(63.6%)、胆管細胞癌では1/5(20.0%)、血管肉腫では0/3(0.0%)という結果で、肝細胞癌に高頻度に認められた。遺伝子変異はLOHの認められない症例でも4例に認められた。intron部も含めた変位のスペクトラムは、transitionが7箇所(1症例は2箇所に存在)、transversionが2箇所、deletionが2箇所、transitionが多い傾向にあったが、特定のcodonや塩基配列による特徴は認められなかった。

I I I. Thorotrast関連肝細胞癌の前癌病変についての検討

a. 剖検所見

身長147cm、体重51.5kg。肝臓は1700gと強い胆汁鬱滞を示して腫大しており、線維化のため表面凹凸不整であった。右葉に径12.5cm大の黄白色の多結節癒合型腫瘍を認められた。また、肝全体に径3cmまでの結節性の白色腫瘍を多数認め、門脈塞栓も認めた。組織学的には異型のある核を持つ

腫瘍細胞が、比較的厚い索状構造をとりつつ増生する中分化型肝細胞癌であった。非腫瘍部の肝には門脈域の線維性肥厚と炎症細胞浸潤を認めたが、偽小葉は完成しておらず、肝線維症と診断された。類洞壁に線維化が認められ、線維化の高度な部分には偽胆管の増生が認められた。一部に周囲に対して圧排性に増生する胆管の集ぞく巣が認められた。但し、その細胞には組織学的に腫瘍と判定されるほどの異型は認められなかった(図15)。非腫瘍部に再生結節や腺腫様過形成の像は認められなかった。また、victoria blue染色陽性を示す肝細胞は認められなかった。

b. 免疫組織化学的検索

非腫瘍部における抗HBV抗体及び抗HCV抗体による免疫組織化学染色では、肝炎ウイルスは陰性であった。

腫瘍部ではp53、Ki-67共に陽性像を示したが、p53は弱陽性であった。非腫瘍部では偽胆管や拡張した類洞の内皮細胞を含めて、p53及びKi-67に陽性を示す細胞を認めなかった。胆管増生巣においても陰性であった。また、Ras、ER、PGRはいずれの部位でも陰性であった。metallothioneinの免疫組織化学では腫瘍及び非腫瘍部の肝細胞は強陽性所見を示した(図16)。

c. 分子生物学的検索

17p13 (p53)のmicrosatellite analysisの結果、肝腫瘍部及び胆管増生部にLOHを認めた。非腫瘍部の肝、脾、骨髄等の結果ではLOHは認められなかった。また、6q25-27 (M6P/IGF2R)にはいずれの検体にもLOHは認められなかった。一方、13q14 (RB)に関してはalleleがhomozygousであり、LOHは判定できなかった。

LOHの認められたp53については、さらに遺伝子変異のhot spotとされるexon 5, 6, 7, 8についてSSCP analysisを行い、変異の有無を検索したところ、腫瘍部においてはexon 5に変位bandを認めたが、胆管増生部では変異は認められなかった。腫瘍部に認められた変位bandをsequencingしたところ、codon 166に点突然変異(TCA→TAA)が認められた。TAAはStop codonであるので、p53蛋白は正常よりも短い異常産物となっていることが示された(図17)。

考察

これまで人体への放射線被曝の生物学的影響については、主として広島
の原爆被曝者の追跡調査をもとに検討されてきた(55)(56)。しかし、これは
X線を高線量率で一回照射された場合の影響で、低線量率での連続照射の
影響は高線量率一回照射と異なることが指摘されている(57)。また、X線
は低LET (Linear energy transfer : 線エネルギー付与) の線質であるが、 α
線などの高LET線の生物への影響は、単位吸収線量あたりの影響が低LET
放射線よりも一般に大きく(58)、低LET放射線と異なり低線量の連続照射
の影響は高線量率の一回照射に比べて変わらないか大きいとされている
(59)。しかし、高LET放射線の生物学的影響は主として動物実験から評価
されており、人体に対する影響についての報告は少ない。大規模な報告例
としては、ウラン鉱山労働者の肺癌発生率の上昇があり、その原因は吸入
したラドンの娘核種からの α 線を主体とする放射線による障害とされているが、
この場合同時に吸収されると考えられるシリカ等の粉塵や喫煙などの
発癌への影響のために α 線の発癌作用については正確な評価が困難であ
る(60)(61)。この点でThorotrast被注入者における肝腫瘍発生は、 α 線の内
部被曝によるヒトの晩発障害を評価する上で、より正確なモデルと考えら
れる。

今回の再診断と各施設における組織診断と今回の再診断との相違は17例
(11.9%)に認められた。この中で多いものは、自己融解などにより索状
構造が不明瞭となった肝細胞癌を血管肉腫としているものであった。

全国より収集されたThorotrast被注入肝剖検例の検討から、Thorotrast被注
入者の肝細胞癌は、血管肉腫、胆管細胞癌に比べ、注入後期間が長い例に
多く、また、線維化の高度な例に多かった。一方、Thorotrastの注入量及び
肝非腫瘍部におけるThorotrastの沈着量と発生する腫瘍組織型との間に有意
な相関は認められなかった。これらのことより、Thorotrast被注入者におけ
る肝細胞癌の発生には、肝組織に沈着したThorotrastから発生する α 線によ
る肝細胞への直接障害の他に、肝線維化が関与していることが示唆された。
これには、類洞の線維化と内皮の変化による網内系機能の低下が腫瘍発生
に影響している可能性が考えられる。Thorotrast肝の場合は網内系機能の低
下が肝機能低下よりも著しいと報告され(62)、Thorotrast被注入者の胆管細
胞癌症例で、画像上の腫瘍発見や肝機能低下に先行して、肝血流量が保た
れている場合には網内系細胞の取り込み能を反映するとされる。

ICG(indocyanine green) testの値が徐々に悪化していたとの報告もある(63)。Thorotrastは主として非腫瘍部の肝被膜下、門脈域に沈着し、線維化を生じさせるが、線維化はThorotrastの沈着した門脈域だけでなく肝実質の類洞壁にも強く認められる。本研究で類洞壁に存在するKupffer細胞を免疫組織化学的に検討したところ、線維化の強い部分ではKupffer細胞の数が減少する傾向が認められた。Kupffer細胞は異物・老廃物を貪食・消化したり、抗原物質を取り込んで抗原提示細胞として働くほか、リンホカインによって活性化され、細胞性免疫の効果細胞として働くとされる(64)(65)。一般の肝細胞癌の発癌過程においても、Kupffer細胞が肝腫瘍発生を抑制していると考えられており(66)(65)、腫瘍の進行に伴ってKupffer細胞の数が減少するとの報告もある(67)(68)。Thorotrast沈着肝においても、Kupffer細胞の減少は、発癌性を持つ異物・老廃物や α 線により損傷を受けた細胞の除去の低下につながると予想され、腫瘍発生の一因であると考えられる。

Thorotrastによる線維化は、肝硬変症の場合のような門脈域および肝静脈域間の架橋形成が主ではなく、肝実質の類洞壁に強く認められる。このため、小葉内の肝細胞は萎縮傾向にあり、肝細胞の再生像に乏しく、再生結節の形成があまり認められない。このため、肝硬変症に生じる肝細胞癌において前癌病変と考えられている巨大再生結節や腺腫様過形成の像は認められない。Thorotrastによる肝細胞癌発生は、線維化を背景としている点では同様であるが、肝硬変症に生じる肝細胞癌とは発生機序が異なることが予想される。肝細胞癌および胆管細胞癌の前癌病変の候補の一つとしては、散見される偽胆管の増生巣があるが、この部分にはp53、Ras、Ki-67、ER、PGRは、いずれも免疫組織化学的に陰性で、腫瘍化を示唆する所見は得られなかった。一方、群馬大学の剖検例に認められた胆管増生巣については、組織学的に腫瘍と判断されるほどの異型を認めず、免疫組織化学的検索でも異常を認めなかったが、p53遺伝子のLOHが認められ、この部分が単クローン性に増生していることが示された。さらに、近接する肝細胞癌に認められるp53遺伝子の遺伝子変異は検出されず、肝細胞癌の前癌病変である可能性が示唆された。

血管肉腫については、sinusoidal type、cavernous type、solid typeが混在して認められた。また、腫瘍周囲の非腫瘍部に、異型の認められない内皮細胞に裏打ちされた拡張した類洞をしばしば伴っていた。Factor VIIIおよびCD34の免疫組織化学的検討において、血管内皮細胞が正常類洞では陰性を

示すのに対し、このような拡張した類洞では血管肉腫細胞と同様に陽性を示すことから、血管内皮としての性質が既に変化していることを示すと考えられた。このことから、非腫瘍部の拡張した類洞に認められる内皮細胞は、既に前腫瘍病変である可能性があると考えられたが、腫瘍関連遺伝子ras、腫瘍抑制遺伝子p53の免疫組織化学的検討では、血管肉腫自体が陰性で、拡張類洞での血管内皮細胞が前腫瘍病変であることを支持する所見は得られなかった。

Thorotrastに曝露された肝のmetallothioneinの発現を免疫組織化学的に検討したところ、非腫瘍部の肝細胞及び肝細胞癌共に強陽性を示す細胞を認めた。metallothioneinは2価の金属イオンとキレート結合作用をもち、生理学的には銅、亜鉛などの代謝に関わっている(69)。カドミウムなどの2価の金属イオンに曝露された際には、発現が高まると報告されている(70)。また、metallothioneinの高発現はシスプラチン等の化学療法剤の投与によっても認められ(71)、metallothioneinが高発現した腫瘍は薬剤抵抗性を持つようになる(72)。Thorotrastに被曝された肝でのmetallothioneinの発現が上昇しているのは、Thoriumの影響であろうと推察されるが、通常低発現とされている肝細胞癌部でもmetallothioneinの発現が認められることから、Thorotrast関連腫瘍は化学療法剤への薬剤抵抗性を持つ可能性が高いことが示唆された。

近年、各種の癌遺伝子、癌抑制遺伝子が発見され、様々な腫瘍において、それらの遺伝子の突然変異や欠失、過剰発現などの異常が腫瘍発生と密接に関わっていることが明らかとなってきた。そこで、ヒトの様々な腫瘍で遺伝子の変異が報告されている、17番染色体の短腕に存在する腫瘍抑制遺伝子p53、13番染色体の長腕に存在する腫瘍抑制遺伝子RB、6番染色体の長腕に存在する腫瘍抑制遺伝子M6P/IGF2RについてLOHの検索を行った。

p53蛋白は最初SV40により形質転換した腫瘍細胞内に存在する蛋白質として発見された(73)。p53遺伝子は腫瘍抑制遺伝子で、腫瘍細胞では高頻度に欠失・変異しており、そのために変異型蛋白が高発現するとされている(74)(75)。野生型p53蛋白は、cyclin dependent kinase (CDK)の阻害蛋白質であるp21を誘導し、RB蛋白のリン酸化を抑制することで、細胞周期をG1で停止させ、細胞増殖を抑制する働きを持つ(76)が、変異型蛋白にはこの能力が失われていることが示されている(77)。以来、脳腫瘍、喉頭癌、咽頭癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、大腸癌、膵癌、胆道癌、甲状腺癌、副腎

皮質癌、腎癌、膀胱癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮体癌、子宮頸癌、白血病、悪性リンパ腫、骨軟部腫瘍、皮膚癌などの多くの悪性腫瘍でp53遺伝子の欠失・変異が認められている(51)。胆管細胞癌、肝細胞癌についても、p53遺伝子およびp53遺伝子により間接的に転写制御されているRB遺伝子が、比較的高頻度で欠失・変異しているとの報告がされている(78)(79)(80)(81)(82)。

一方、M6P/IGF2R蛋白は、細胞増殖抑制能を持つ transforming growth factor beta (TGF β)を活性化させる働きを持っており、やはり腫瘍増殖抑制能を示す(83)(84)。その失活・変異により細胞増殖は加速されると考えられ、これまでに乳癌、卵巣癌、腎癌、悪性リンパ腫、悪性黒色腫などの腫瘍で欠失・変異が認められている(85)(86)(87)(88)(89)(90)。肝細胞癌についても早期より高頻度で欠失・変異していると報告されている(91)(92)。

今回、免疫組織化学的にp53蛋白の発現を観察すると共に、p53、RB、M6P/IGF2R各遺伝子についてThorotrast関連肝腫瘍のmicrosatellite analysisによるLOHを検索した。その結果は、免疫組織化学的にはp53は肝細胞癌3/14例、胆管細胞癌2/4例で陽性所見を示したが、陽性例も陽性細胞は少数で、染色強度は弱陽性であった。対照の非Thorotrast被注入肝細胞癌ではp53の陽性率は5/10であり、Thorotrast症例の肝細胞癌は非Thorotrast症例の肝細胞癌に比べてp53の陽性率は低かった。但し、検討したThorotrast関連肝腫瘍の多くは、ホルマリンの固定時間が長い傾向があり、抗原性が失活して免疫組織化学反応が減弱している可能性は否定できないため、さらにLOHの検索を行ったところ、腫瘍全体で17p13は4/15(26.7%)、13q14は1/11(9.1%)、6q25-27は0/10(0.0%)のLOHが認められた。これらの結果からは α 線による肝腫瘍の多段階腫瘍発生過程へのRBおよびM6P/IGF2R遺伝子の欠失・変異の関与は大きくないと考えられた。

p53遺伝子については、sequencingをおこなったところ、細胞癌において7/11(63.6%)と比較的高率に遺伝子変異を認めた。ヒトp53遺伝子は393個のアミノ酸をコードしているが、codon 102から292までのコアドメインは転写因子として標的遺伝子のpromotorの特異的DNA配列に結合するために必要な部分である(93)。腫瘍におけるp53遺伝子変異の80%は1塩基置換型の点突然変異であるが、なかに変異頻度の極めて高いhot spotと呼ばれる部位がある(51)。具体的には、codon 175 (Arg)、codon 245 (Gly)、codon 248 (Arg)、codon 249 (Arg)、codon 273 (Arg)、codon 282 (Arg)等で、いずれもコアドメイン内に存在している。これらの部位に変異が生じると、p53蛋白

の高次構造が変化してDNAと結合できなくなり、転写活性化能を失ってしまう(94)。いずれのhot spotにもCpG配列が含まれており、このことが大腸癌や脳腫瘍など多くの腫瘍でC:G→T:A transitionが高頻度で認められる原因であると考えられている(95)(96)(97)。

一方、腫瘍発生の誘因別にみるとp53遺伝子の変異には差がある。例を挙げると、喫煙者における肺癌では、p53遺伝子のcodon 248, codon 273と共に、他の腫瘍ではあまり認められないcodon 157の変異頻度が高い。これはベンゾ[α]ピレンの代謝産物がGのN2位に結合し、G→T transversionを生じることがタバコ発癌の原因であるためと考えられている(98)。また、紫外線によるp53遺伝子変異では、CC→TTという重複塩基のtransitionが特徴とされている(99)。一方、電離放射線では、放射線によるDNA鎖の切断は錯結合の原因となるDNA鎖の部分的変性を起こしやすいため、すべり、錯結合による1から数十塩基の欠損が生じるとされている(100)(101)(102)。これは一般のp53遺伝子の欠損変異では、単純リピート配列部分の少数塩基欠損が8割を占めるのと異なっている(100)。Thorotrastによる腫瘍発生の動物実験でも、認められたp53遺伝子変異の80%は比較的長い塩基欠損であったと報告されている(103)。しかし、主としてα線障害によると考えられているラドン被曝に関連したヒトの肺癌では、p53遺伝子の変異はあるものの、特定の変異は認められていない(104)。このため、ラドン関連肺癌がα線障害により発生するのか、鉱山労働環境で曝露を受けやすい喫煙・粉塵により発生するのか議論となっている。

肝細胞癌については、中国や東南アジア等、肝細胞癌の発生にカビの毒素の一種であるアフラトキシンB1の関与が強いと考えられている地域では、codon 249のAGG→AGTというG→T transversionが中国や東南アジアで発生する肝細胞癌に高率に観察されている(105)(106)。一方、日本や欧米諸国等アフラトキシンB1による環境の汚染の少ない地域では肝細胞癌のp53 codon 249の変異は低率で、一般の肝細胞癌ではこの変異が生じないと推察されている(107)。一般の肝細胞癌においては、p53の遺伝子変異は肝炎ウイルスの関与が高頻度で認められる日本で約30%、肝炎ウイルスの関与があまりない欧米諸国で10-40%と報告されているが、特徴的な変異は報告されていない。また、p53遺伝子変異のタイプについては、deletionは少なくとも20%以下で多くが点突然変異であるが、transitionの頻度は報告により10-65%とばらつきがある(108)(109)(110)(81)(78)(79)(111)。

以上のように、腫瘍の原因となる物質への被曝と遺伝子変異との間に対応がある例も存在することから、Thorotrastに代表される α 線障害による肝腫瘍に、特異的なp53遺伝子の変異が認められるかどうかは興味のある問題であった。今回の結果では、 α 線をはじめとする高LET線に特徴的とされるdeletionは遺伝子変異の2/11 (18.2%)と低頻度で、7/11 (63.6%)が1塩基のtransitionであった。しかし、これらの変異の認められる部位は一定でなく、CpG部位でも低頻度で、特徴的と考えられるような変異は認められなかった。Thorotrastによる肝腫瘍のp53遺伝子の遺伝子変異の報告は多くなく、文献上は肝細胞癌の一例 (codon 176のT→G transversion) (112)及び多発変異を認めた胆管細胞癌の一例 (codon 138のC→T transition及びcodon 248のG→A transition)(113)が報告されているのみであるが、これら報告例でも特徴的な変異は認められない。このように、p53遺伝子の変異にdeletionの頻度が少なく非特異的な点突然変異が多いことは、Thorotrast関連肝腫瘍の腫瘍発生機序におけるp53遺伝子変異は、 α 線によりDNAが直接障害され変異を生じているというよりはむしろ、 α 線の障害により亢進した細胞の壊死と再生の過程で、DNA複製に非特異的な異常を生じ、p53遺伝子変異が発生している可能性を示唆していると考えられた。

結語

1. Thorotrastから発せられる α 線によって発生する肝腫瘍の特徴を明らかにするため、Thorotrast被注入の既往のある患者の剖検症例について、病理組織学的、免疫組織化学的、分子生物学的に検討を行った。

2. Thorotrast関連肝腫瘍には組織学的に特徴的な所見は認められなかった。但し、肝細胞癌の発生は注入後経過が長く、非腫瘍部の肝の線維化の高度な症例に多く認められた。線維化の強い部分ではKupffer細胞の数が減少する傾向が認められ、このことが肝細胞癌の発生に関与していることが示唆された。

3. 免疫組織化学的および分子生物学的検討からは、腫瘍関連遺伝子のras、腫瘍抑制遺伝子のRB、M6P/IGF2Rの遺伝子変化の関与は大きくないことが示された。一方、p53遺伝子については、比較的高頻度に遺伝子変異が認められ、その多くはdeletionではなく1塩基のtransitionであった。このことから、Thorotrast関連肝腫瘍に認められるp53遺伝子変異は、 α 線のDNAへの直接障害によるものではなく、亢進した細胞の再生過程で生じた非特異的なものである可能性が示唆された。

4. Thorotrastによる線維化は肝実質の類洞壁に強く認められ、小葉内の肝細胞は萎縮傾向にあり、肝細胞の再生像に乏しい。このため、肝硬変症に生じる肝細胞癌において前癌病変と考えられている腺腫様過形成は認められず、Thorotrastによる肝細胞癌の前癌病変は不明であった。今回の検討でThorotrast関連肝細胞癌の1剖検例に病理組織学的に異型を伴う胆管増生巣の合併を認めた。この胆管増生巣にp53遺伝子のLOHが認められることから、この部分が単クローン性に増生していることが示され、前癌病変である可能性が示唆された。

謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科病因病理学専攻病理学講座、町並陸生教授に深甚なる感謝の意を表します。また、貴重な剖検材料を御提供いただきました群馬大学医学部第二病理学教室、中島孝教授に深謝いたします。さらに、本研究について御指導をいただき、示唆に富む御意見を賜りました放射線医学総合研究所、森武三郎博士、癌研究会癌研究所、石川雄一主任研究員、東京大学大学院医学系研究科病因病理学専攻病理学講座、岡輝明講師、虎の門病院病理部、堀内啓医長、森正也先生に感謝いたします。さらに、実験を行うにあたり様々な補助をいただいた、東京大学大学院医学系研究科病因病理学専攻病理学講座、岩坂茂技官、大平嘉一技官、小柴喜代子氏、増村祥子氏、癌研究会癌研究所病理部、野村起美恵主任研究助手に深く感謝致します。なお、本研究は文部省トロトラスト研究班の研究の一環として行われました。

参考文献

1. Rudolphi H. Späntwicklung eines Unterlidkarzinoms nach Thoriumoxydinjektion. Beitr. Pathol. Anat. 111: 158, 1950.
2. Bluhbaum. Eine neue Anwendungsart der Kolloide in der Röntgendiagnostik. Fortschritte auf dem gebiete der Röntgenstrahlen und der nukleomedizin 37: 18, 1928.
3. Abbatt J D. History of the use and toxicity of thorotrast. Environmental Research 18: 6-12, 1979.
4. Kido C, Ariyoshi H. The significance of CA19-9 as a tumor marker for intrahepatic cholangiocarcinoma caused by Thorotrast. In: Kido C, Barron JP eds, Thorotrast and Carcinogenesis. Basic and Clinical Studies, Yamato Insatsu, Tokyo 120-123, 1989.
5. 森武三郎, 野末侑信, 岡本亮, 田中利彦, 杉田暉道, 津田忠美. 「トロトラスト」注入者の予後調査. 日本医学放射線学会誌 25: 1144, 1966.
6. 館野之男. 放射線医学史. (岩波書店, 東京, 1973).
7. Miyamoto S. Experimentelle Sarkomerzeugung durch Thorotrast. Strahlentherapie 64: 683-690, 1939.
8. 大河原重之. トロトラストの放射線学的研究. 文部省「電離放射線による日本人の悪性腫瘍発の研究」班報告書 1964.
9. Hursh J B. Body content of thorium 232 daughters after thorotrast injection. British Journal of Radiology 38: 776-784, 1965.
10. Kaul A. Tissue distribution and steady state activity ratios of Th232 and daughters in man following intravascular injection of thorotrast. Riso Report 294: 14-30, 1973.
11. Ishikawa Y, Kato Y, Mori T, Machinami R, Kitagawa T. Alpha-particle dose to the liver and spleen tissues of Japanese Thorotrast patients. Health Physics 65: 497-506, 1993.
12. Ishikawa Y, Mori T, Kato Y, Machinami R, Priest N D, Kitagawa T. Systemic deposits of thorium in thorotrast patients with particular reference to sites of minor storage. Radiation Research 135: 244-248, 1993.
13. Hursh J B, Steadman L T, Looney W B, Colodzin M. The excretion of thorium and thrium daughters after Thorotrast administration to human subjects. Acta Radiologica 47: 481-498, 1953.

14. Baserga R, Yokoo H, Heneger G C. Thorotrast-induced cancer in man. *Cancer* 13: 1021-1031, 1960.
15. Whaling W. The energy loss of charged particles in matter. *Handbuch der Physik*, Springer 34: 193-217, 1953.
16. Wesch H, Kampmann H, Wegener K. Assessment of organ distribution of thorium by neutron-activation-analysis. In; *Proceedings of The Third International Meeting on The Toxicity of Thorotrast*. *Ris Report* 294: 52, 1973.
17. Kato Y. Alpha-ray dosage near thorotrast aggregate. *Nippon Igaku Hoshasen Gakki Zasshi* 26: 1547-1556, 1967.
18. Kaul A, Foll U, Haase V A, Palme G, Riedel W, Stolpmann H J. Microdistribution of thorotrast and dose to cellular structures. *Environmental Research* 18: 13-22, 1979.
19. Dalheimer A R, Kaul A. Calculation of local dose to tissue adjacent to Thorotrast conglomerates. (BIR Report 21) *British Institute of Radiology*, London 108-111, 1989.
20. Kato Y. Determination of amounts of thorium in the body of patients who have taken Thorotrast. *Nippon Igaku Hoshasen Gakki Zasshi* 28: 217-228, 1968.
21. Kato Y, Mori T, Kumatori T. Thorotrast dosimetric study in Japan. *Environmental Research* 18: 32-36, 1979.
22. Kathren R L, Hill R L. Distribution and dosimetry of Thorotrast in USUR case 1001. *Health Physics* 63: 72-88, 1992.
23. Editorial. Thorotrast, report of concil on pharmacy and chemistry. *JAMA* 99: 2183, 1932.
24. Oberling P, Guerin M. Action du Thorotrast sur le sarcome de Jensen du rat blanc. *Bulletin de l Association Francaise pour l Etude du Cancer* 22: 469, 1933.
25. 吉田富三, 鶴崎宏. トリウムによる肉腫の実験的発生。特に其組織発生に就て。 . *癌* 37: 404, 1943.
26. Mori T. [Pathological and radiological studies of chronic Thorotrast injury. II. Experimental study]. *Nippon Igaku Hoshasen Gakki Zasshi* 26: 1089-1129, 1966.
27. Okamoto T. [Hepatic cholangiocarcinoma in Syrian hamster induced by thorotrast administration]. *Nippon Igaku Hoshasen Gakki Zasshi* 34: 254-266,

1974.

28. Wohlwill F. Untersuchungen über die Gewebesreaktion auf Thorotrast bei Anwendung dieser Substanz zu diagnostischen Zwecken am Menschen. Schweizerische Zeitschrift für allgemeine Pathologie und Bakteriologie 5: 25, 1942.

29. MacMahon H E, Murphy A S, Bates M I. Endothelial-cell sarcoma of liver following Thorotrast infections. American Journal of Pathology 23: 585, 1947.

30. 渡辺豊輔, 杉村隆. トロトラストを証明せる肝臓腫瘍の1剖検例. 日本病理学会誌 42: 418-419, 1953.

31. Mori T, Sakai T, Nuzue Y, Okamoto T, Wada T, Tanaka T, Tsuya A. Malignancy and other injuries following Thorotrast administration: follow-up study of 147 cases in Japan. Strahlentherapie 134: 229-254, 1967.

32. Mori T, Nozue Y, Miyazi T, Takahashi S. Thorotrast injury in Japan. Riso Report 294: 175-192, 1973.

33. Mori T, Maruyama T, Kato Y, Takahashi S. Epidemiological follow-up study of Japanese thorotrast cases. Environmental Research 18: 44-54, 1979.

34. Mori T, Kato Y, Kumatori T, Maruyama T, Hatakeyama S. Epidemiological follow-up study of Japanese Thorotrast cases--1980. Health Physics 1: 261-272, 1983.

35. Kato I, Kido C. Increased risk of death in Thorotrast exposed patients during the late follow-up period. Japanese Journal of Cancer Research 78: 1187-1192, 1987.

36. Mori T, Kato Y. Epidemiological, pathological and dosimetric status of Japanese thorotrast patients. Journal of Radiation Research 2: 34-45, 1991.

37. Ishikawa Y, Mori T, Machinami R. Lack of apparent excess of malignant mesothelioma but increased overall malignancies of peritoneal cavity in Japanese autopsies with Thorotrast injection into blood vessels. Journal of Cancer Research & Clinical Oncology 121: 567-570, 1995.

38. van Kaick G, Lorenz D, Muth H, Kaul A. Malignancies in German Thorotrast patients and estimated tissue dose. Health Physics 35: 127-136, 1978.

39. van Kaick G, Lieberman D, Lorenz D, Lorenz W J, Luhrs H, Scheer K E, Wesch H, Muth H, Kaul A, Immich H, Wagner G, Wegener K. Recent results of the German Thorotrast study - Epidemiological results and dose effect

relationships in Thorotrast patients. *Health Physics* 1: 299-306, 1983.

40. Faber M. Malignancies in Danish thorotrast patients. *Health Physics* 35: 153-158, 1978.

41. Faber M. Current (1981) status of the Danish Thorotrast study. *Health Physics* 1: 259-260, 1983.

42. Horta J da S, Abbatt J D, Motta L d, Tavares M H. Leukaemia, malignancies and other late effects following administration of Thorotrast. *Zeitschrift fur Krebsforschung und Klinische Onkologie Cancer Research & Clinical Oncology* 77: 202-216, 1972.

43. da Silva Horta J, da Silva Horta M E, Cayolla de Motta L, Tavares M H. Malignancies in Portuguese Thorotrast patients. *Health Physics* 35: 137-151, 1978.

44. da-Motta L C, Horta-J-da S, Tavares M H. Prospective epidemiological study of thorotrast-exposed patients in Portugal. *Environmental Research* 18: 152-172, 1979.

45. Blomberg R, Larsson L E, Lindell B, Lindgren E. Late effects of thorotrast in cerebral angiography. *Annals of New York Academy of Science* 145: 853-858, 1967.

46. Janower M L, Miettinen O S, Flynn M J. Effects of long-term thorotrast exposure. *Radiology* 103: 13-20, 1972.

47. 日本肝癌研究会. 第13回全国原発性肝癌追跡調査報告(1994-1995). . 1998.

48. Machinami R, Mori T, Ishikawa Y. Pathology of thorotrast associated hepatocellular carcinoma in Japan with special reference to hepatitis B surface antigen and p53 protein. In: G van Kaick, A Karaoglou, and AM Kellerer(eds.). *Health Effects of Internally Deposited Radionuclides: Emphasis on Radium and Thorium*. Singapore: World Scientific Publishing Co. 261-265, 1995.

49. 森武三郎. トロトラス被注入者の疫学調査ならびに剖検例の統計学的研究と線 調査. . 平成2年度科学研究費補助金研究調査報告書 12-33, 1991.

50. Taylor G N, Mays C W, Gerber G B, Thomas R G. Risk from Radium and Thorotrast. (BIR Report 21) British Institute of Radiology, London 1989.

51. Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R,

Harris C C. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Research* 24: 141-146, 1996.

52. 畠山茂, 岩田志郎. トリウム系燃料原子炉に関する生物学的基礎研究。文部省科学研究費補助金エネルギー特 研究 昭和55-61年度研究成 報告書 1987.

53. 久保淑幸, 田中文彦, 森亘, 入江宏, 森武三郎. トロトラスト被注入患者剖検例におけるnatural historyの特徴。医学のあゆみ 136: 961-962, 1986.

54. Ito Y, Kojiro M, Nakashima T, Mori T. Pathomorphologic characteristics of 102 cases of thorotrast-related hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and hepatic angiosarcoma. *Cancer* 62: 1153-1162, 1988.

55. Shimizu Y, Kato H, Schull W J, Preston D L, Fujita S, Pierce D A. Studies of the mortality of A-bomb survivors. 9. Mortality, 1950-1985: Part 1. Comparison of risk coefficients for site-specific cancer mortality based on the DS86 and T65DR shielded kerma and organ doses. *Radiation Research* 118: 502, 1989.

56. Delpla M. Fear of nuclear power could be met statistically with data from Hiroshima. *Nucleaire Europ* 42: 3, 1989.

57. Elkind M M. Repair processes in radiation biology. *Radiation Research* 100: 425-449, 1984.

58. ICRP Publication 55. Optimization and decision-making in radiological protection. A report of a Task Group of Committee 4 of the International Commission on Radiological Protection. *Annals of the ICRP* 20: 1-60, 1989.

59. Ullrich R L. Tumor induction in Balb/C mice after fractionated or protracted exposures to fission-spectrum neutrons. *Radiation Research* 97: 587-597, 1984.

60. BEIR IV. Health risks of radon and other deposited alpha emitters. National Academy Press, Washington 1988.

61. Ishikawa Y, Mori T, Kato Y, Tsuchiya E, Machinami R, Sugano H, Kitagawa T. Lung cancers associated with thorotrast exposure: high incidence of small-cell carcinoma and implications for estimation of radon risk. *International Journal of Cancer* 52: 570-574, 1992.

62. 林茂樹. トロトラスト沈着症患者の発癌予知に役立つ臨床検査値。トロトラスト-とくにその臨床について-厚生省社会援護局トロトラスト沈

着者健康管理委員会編 47-49, 1996.

63. Kiyosawa K, Akahane Y, Miyazaki Y. Resection of thorotrast-induced cholangiocarcinoma. *American Journal of Gastroenterology* 78: 429-432, 1989.

64. Smedsrod B, De Bleser P J, Braet F, Loviseti P, Vanderkerken K, Wisse E, Geerts A. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. [Review] [163 refs]. *Gut* 35: 1509-1516, 1994.

65. Yamamoto H, Tsuji T. [Role of Kupffer cells in liver diseases]. [Review] [5 refs] [Japanese]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 18: 701-703, 1995.

66. Manifold I H, Triger D R, Underwood J C. Kupffer-cell depletion in chronic liver disease: implications for hepatic carcinogenesis. *Lancet* 2: 431-433, 1983.

67. Tanaka M, Nakashima O, Wada Y, Kage M, Kojiro M. Pathomorphological study of Kupffer cells in hepatocellular carcinoma and hyperplastic nodular lesions in the liver. *Hepatology* 24: 807-812, 1996.

68. Wakasa K, Haba T, Hamada T, Sasaki M, Sakurai M. Early hepatocellular carcinoma macroscopically resembling adenomatous hyperplasia: pathological resemblance to carcinoma-in-situ. *Pathology International* 47: 54-59, 1997.

69. Skroch P. Regulation of human and yeast metallothionein gene transcription by heavy metal ions. In: Klaassen CD and Suzuki KT, eds. *Metallothionein in biology and medicine*. Boston: CRC Press 5, 1991.

70. Onosaka S, Tanaka K. Cd-hem method and its application. In: Klaassen CD and Suzuki KT, eds. *Metallothionein in biology and medicine*. Boston: CRC Press 1, 1991.

71. Lazo J S, Basu A. Metallothionein expression and transient resistance to electrophilic antineoplastic drugs. *Seminars in Cancer Biology* 2: 267-271, 1991.

72. Imura N. Possible application of metallothionein in cancer therapy. In: Klaassen CD and Suzuki KT, eds. *Metallothionein in biology and medicine*. Boston: CRC Press 30, 1991.

73. Crawford L V, Pim D C, Lamb P. The cellular protein p53 in human tumours. *Molecular Biology & Medicine* 2: 261-272, 1984.

74. Baker S J, Fearon E R, Nigro J M, Hamilton S R, Preisinger A C, Jessup J M, vanTuinen P, Ledbetter D H, Barker D F, Nakamura Y. Chromosome 17

deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221, 1989.

75. Nigro J M, Baker S J, Preisinger A C, Jessup J M, Hostetter R, Cleary K, Bigner S H, Davidson N, Baylin S, Devilee P. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708, 1989.

76. Reich N C, Levine A J. Growth regulation of a cellular tumor antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 308: 199-201, 1984.

77. Zambetti G P, Levine A J. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB Journal* 7: 855-865, 1993.

78. Challen C, Lunec J, Warren W, Collier J, Bassendine M F. Analysis of the p53 tumor-suppressor gene in hepatocellular carcinomas from Britain. *Hepatology* 16: 1362-1366, 1992.

79. Kress S, Jahn U R, Buchmann A, Bannasch P, Schwarz M. p53 Mutations in human hepatocellular carcinomas from Germany. *Cancer Research* 52: 3220-3223, 1992.

80. Nishida N, Fukuda Y, Kokuryu H, Sadamoto T, Isowa G, Honda K, Yamaoka Y, Ikenaga M, Imura H, Ishizaki K. Accumulation of allelic loss on arms of chromosomes 13q, 16q and 17p in the advanced stages of human hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer* 51: 862-868, 1992.

81. Nose H, Imazeki F, Ohto M, Omata M. p53 gene mutations and 17p allelic deletions in hepatocellular carcinoma from Japan. *Cancer* 72: 355-360, 1993.

82. Yumoto Y, Hanafusa T, Hada H, Morita T, Ooguchi S, Shinji N, Mitani T, Hamaya K, Koide N, Tsuji T. Loss of heterozygosity and analysis of mutation of p53 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* 10: 179-185, 1995.

83. Kovacina K S, Steele-Perkins G, Purchio A F, Lioubin M, Miyazono K, Heldin C H, Roth R A. Interactions of recombinant and platelet transforming growth factor-beta 1 precursor with the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 160: 393-403, 1989.

84. Dennis P A, Rifkin D B. Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America 88: 580-584, 1991.

85. Devilee P, van Vliet M, van Sloun P, Kuipers Dijkshoorn N, Hermans J, Pearson P L, Cornelisse C J. Allelotype of human breast carcinoma: a second major site for loss of heterozygosity is on chromosome 6q. *Oncogene* 6: 1705-1711, 1991.

86. Millikin D, Meese E, Vogelstein B, Witkowski C, Trent J. Loss of heterozygosity for loci on the long arm of chromosome 6 in human malignant melanoma. *Cancer Research* 51: 5449-5453, 1991.

87. Saito S, Saito H, Koi S, Sagae S, Kudo R, Saito J, Noda K, Nakamura Y. Fine-scale deletion mapping of the distal long arm of chromosome 6 in 70 human ovarian cancers. *Cancer Research* 52: 5815-5817, 1992.

88. Gaidano G, Hauptschein R S, Parsa N Z, Offit K, Rao P H, Lenoir G, Knowles D M, Chaganti R S, Dalla-Favera R. Deletions involving two distinct regions of 6q in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 80: 1781-1787, 1992.

89. Hankins G R, De Souza A T, Bentley R C, Patel M R, Marks J R, Iglehart J D, Jirtle R L. M6P/IGF2 receptor: a candidate breast tumor suppressor gene. *Oncogene* 12: 2003-2009, 1996.

90. Chappell S A, Walsh T, Walker R A, Shaw J A. Loss of heterozygosity at the mannose 6-phosphate insulin-like growth factor 2 receptor gene correlates with poor differentiation in early breast carcinomas. *British Journal of Cancer* 76: 1558-1561, 1997.

91. De Souza A T, Hankins G R, Washington M K, Fine R L, Orton T C, Jirtle R L. Frequent loss of heterozygosity on 6q at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor locus in human hepatocellular tumors. *Oncogene* 10: 1725-1729, 1995.

92. Yamada T, De Souza A T, Finkelstein S, Jirtle R L. Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 10351-10355, 1997.

93. Arrowsmith C H, Morin P. New insights into p53 function from structural studies. *Oncogene* 12: 1379-1385, 1996.

94. Cho Y, Gorina S, Jeffrey P D, Pavletich N P. Crystal structure of a p53

tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265: 346-355, 1994.

95. Tornaletti S, Pfeifer G P. Complete and tissue-independent methylation of CpG sites in the p53 gene: implications for mutations in human cancers. *Oncogene* 10: 1493-1499, 1995.

96. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715, 1993.

97. Schmutte C, Yang A S, Nguyen T T, Beart R W, Jones P A. Mechanisms for the involvement of DNA methylation in colon carcinogenesis. *Cancer Research* 56: 2375-2381, 1996.

98. Denissenko M F, Pao A, Tang M, Pfeifer G P. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274: 430-432, 1996.

99. Nakazawa H, English D, Randell P L, Nakazawa K, Martel N, Armstrong B K, Yamasaki H. UV and skin cancer: Specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 360-364, 1994.

100. Greenblatt M S, Bennett W P, Hollstein M, Harris C C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research* 54: 4855-4878, 1994.

101. Brachman D G, Hallahan D E, Beckett M A, Yandell D W, Weichselbaum R R. p53 gene mutations and abnormal retinoblastoma protein in radiation-induced human sarcomas. *Cancer Research* 51: 6393-6396, 1991.

102. Tada M, Sawamura Y, Abe H, Iggo R. Homozygous p53 gene mutation in a radiation-induced glioblastoma 10 years after treatment for an intracranial germ cell tumor: case report. *Neurosurgery* 40: 393-396, 1997.

103. Atkinson M J, Dahlke C D, Hartmann E, Mitreiter K, Hofler H, Strauss G, Schmid J, Erfle V, Luz A. Mutation of the tumor suppressor gene p53 in murine osteosarcomas induced by alpha emitting radionuclides. In: G van Kaick, A Karaoglou, and AM Kellerer(eds.), *Health Effects of Internally Deposited Radionuclides: Emphasis on Radium and Thorium*. Singapore: World Scientific Publishing Co. 389-392, 1995.

104. Vahakangas K H, Samet J M, Metcalf R A, Welsh J A, Bennett W P, Lane

D P, Harris C C. Mutation of p53 and ras genes in radon-associated lung cancer from uranium mines. *Lancet* 339: 576-580, 1992.

105. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 350: 429-431, 1991.

106. Ozturk M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 338: 1356-1359, 1991.

107. Soini Y, Chía S C, Bennett W P, Groopman J D, Wang J S, DeBenedetti V M, Cawley H, Welsh J A, Hansen C, Bergasa N V, Jones E A, DiBisceglie A M, Trivers G E, Sandoval C A, Calderon I E, Munoz Espinosa L E, Harris C C. An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from Mexico. *Carcinogenesis* 17: 1007-1012, 1996.

108. Oda T, Tsuda H, Scarpa A, Sakamoto M, Hirohashi S. P53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 52: 6358-6364, 1992.

109. Nishida N, Fukuda Y, Kokuryu H, Toguchida J, Yandell D W, Ikenaga M, Imura H, Ishizaki K. Role and mutational heterogeneity of the p53 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 53: 368-372, 1993.

110. Hayashi H, Sugio K, Matsumata T, Adachi E, Urata K, Tanaka S, Sugimachi K. The mutation of codon 249 in the p53 gene is not specific in Japanese hepatocellular carcinoma. *Liver* 13: 279-281, 1993.

111. Kazachkov Y, Khaoustov V, Yoffe B, Solomon H, Klintmalm G B G, Tabor E. P53 abnormalities in hepatocellular carcinoma from United States patients: analysis of all 11 exons. *Carcinogenesis* 17: 2207-2212, 1996.

112. Andersson M, Jonsson M, Nielsen L L, Vyberg M, Visfeldt J, Storm H H, Wallin H. Mutations in the tumor suppressor gene p53 in human liver cancer induced by alpha-particles. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 4: 765-770, 1995.

113. Iwamoto K S, Mizuno T, Kurata A, Masuzawa M, Mori T, Seyama T. Multiple, unique, and common p53 mutations in a thorotrast recipient with four primary cancers. *Human Pathology* 29: 412-416, 1998.

(表1)

肝非腫瘍部のThorotrast沈着度の分類

-
- D1 : Thorotrast沈着の認められる門脈域が全体の10%以下で、
各門脈域における沈着量もわずかであるもの。
- D2 : Thorotrast沈着量がD1とD3の間のももの。
- D3 : Thorotrast沈着がほぼすべての門脈域に認められ、かつ、
門脈域全体に沈着があるもの。
-

(表2)

肝非腫瘍部の線維化度の分類

-
- F 1 : 門脈域の線維性拡大はほとんど認められず、肝小葉内の線維化もわずかなもの。
- F 2 : 軽度の門脈域の線維性拡大が認められ、周囲の類洞壁に軽度の線維化が認められるもの。
- F 3 : 門脈域の線維性拡大と小葉の広い範囲に高度の線維化が認められるが、残存する肝細胞の索状構造が認められるもの。
- F 4 : 高度の肝小葉内線維化が広い範囲に認められ、肝細胞は高度に萎縮し、索状構造が不明瞭化しているもの。
偽胆管の増生が著明である。
-

(表 3)

本研究において使用した抗体一覧
(mouse monoclonal antibody)

Antibody Specificity	Clone	Source	Antigen	
			Dilution	Retrieval
pan-ras	Ab-1	Oncogene Science	1:50	none
p53	DO-7	Novocastra	1:200	Microwave heating
ki-67	MIB-1	Immunotech	1:50	Microwave heating
Metallothionein	E9	DAKO	1:50	none
CD68	KP1	DAKO	1:100	Microwave heating
Factor VIII	F8/86	DAKO	1:50	Microwave heating
CD34	MY10	Becton-Dickinson	1:25	Microwave heating
ER	—	Nichirei	1:1	Microwave heating
PGR	—	Nichirei	1:1	Microwave heating
HBsAg	3E7	DAKO	1:50	none
HBcAg	—	Nichirei	1:1	none
HCV capsid	—	Chemicon	1:10	Trypsin digestion
HCV capsid	—	Vivo-stat	1:50	Microwave heating

Factor VIII : Factor VIII related antigen (von Willebrand factor)

ER : Estrogen Receptor

PGR : Progesterone Receptor

(表 4)

Thorotrast 関連肝腫瘍

Total 144cases (Male 131, Female 13)

Diagnosis	cases	M	F
Hepatocellular carcinoma(HCC)	21	20	1
well differentiated	0	0	0
moderately differentiated	20	19	1
poorly differentiated	1	1	0
Cholangiocellular carcinoma(CCC)	37	34	3
well differentiated	10	9	1
moderately differentiated	20	18	2
poorly differentiated	7	7	0
Angiosarcoma(AS)	30	27	3
sinusoid	15	14	1
cavernous	11	11	0
solid	4	2	2
Multiple tumors	3	3	0
AS + HCC	2	2	0
HCC + CCC	1	1	0
Metastatic tumors	5	4	1
No tumors(NT)	48	43	5

(表 5)

腫瘍組織型と注入されたThorotrastの量の関係

(注入年齢29歳以下)

症例数	平均	±標準偏差	平均順位
HCC	14	14.5 ±6.5	46.6
CCC	28	12.6 ±3.2	42.7
AS	20	13.7 ±4.5	48.2
NT	33	20.3 ±18.6	53.0
Total	95	16.2 ±12.6	

HCC : Hepatocellular carcinoma

CCC : Cholangiocellular carcinoma

AS : Angiosarcoma

NT : No tumor

* Kruskal-Wallis' test : $p > 0.05$

(表6)

腫瘍組織型とThorotrast注入後腫瘍発生までの期間の関係

(注入年齢29歳以下)

症例数	平均	±標準偏差	平均順位
HCC	14	39.5 ±7.6	71.7
CCC	28	35.0 ±6.5	49.1
AS	20	37.7 ±5.6	60.4
NT	33	31.9 ±7.0	39.7
Total	95	35.1 ±7.2	

HCC : Hepatocellular carcinoma

CCC : Cholangiocellular carcinoma

AS : Angiosarcoma

NT : No tumor NTについては期間は死亡時までの期間

* Kruskal-Wallis' test : $p < 0.01$

* Dunnet's test

* HCC-CCC, AS-NT : $p < 0.05$

** HCC-NT : $p < 0.01$

(表7)

腫瘍組織型と肝非腫瘍部のThorotrast沈着度の関係

	症例数	D1	D2	D3
HCC	18	2	15	1
CCC	32	5	24	3
AS	23	5	17	1
NT	47	6	35	6
Total	120	18	91	11

HCC : Hepatocellular carcinoma

CCC : Cholangiocellular carcinoma

AS : Angiosarcoma

NT : No tumor

* Kruskal-Wallis' test : $p > 0.05$

(表 8)

腫瘍組織型と肝非腫瘍部の線維化度の関係

	症例数	F1	F2	F3	F4
HCC	18	0	5	5	8
CCC	32	3	18	10	1
AS	23	2	14	6	1
NT	47	9	24	7	7
Total	120	14	61	28	17

HCC: Hepatocellular carcinoma

CCC: Cholangiocellular carcinoma

AS: Angiosarcoma

NT: No tumor

* Kruskal Wallis' test : $p < 0.01$

* Dunnet's test

* HCC-CCC, HCC-AS, HCC-NT : $p < 0.01$

(表9)

パラフィン包埋ブロックの得られた症例

Case Number	Diagnosis	Sex	Duration (year)	Injected amount(ml)
1	HCC(中分化型)	M	53	6
2	HCC(中分化型)	M	22	13
3	HCC(中分化型)	M	39	15
4	HCC(中分化型)	M	34	12
5	HCC(中分化型)	F	40	10
6	HCC(中分化型)	M	47	15
7	HCC(中分化型)	M	46	10
8	HCC(中分化型)	M	50	15
9	HCC(中分化型)	M	40	12
10	HCC(中分化型)	M	46	10
11	HCC(中分化型)	M	54	10
12	CCC(中分化型)	M	51	10
13	CCC(高分化型)	M	49	12
14	CCC(低分化型)	M	53	15
15	CCC(低分化型)	M	30	10
16	CCC(中分化型)	M	42	10
17	AS(cavernous)	M	50	10
18	AS(cavernous)	M	55	15
19	AS(cavernous)	M	58	15

(表 10)

腫瘍関連遺伝子の免疫組織化学的検索

Case Number	Diagnosis	pan-ras	p53
1	HCC	-	+
2	HCC	-	-
3	HCC	-	-
4	HCC	-	-
5	HCC	+	-
6	HCC	-	+
7	HCC	+	-
8	HCC	-	-
9	HCC	-	-
10	HCC	-	-
11	HCC	-	+
12	CCC	-	-
13	CCC	-	-
14	CCC	-	+
15	CCC	-	-
16	CCC	-	-
17	AS	-	-
18	AS	-	-
19	AS	-	-

(+ : 陽性、- : 陰性)

(表 1 1)

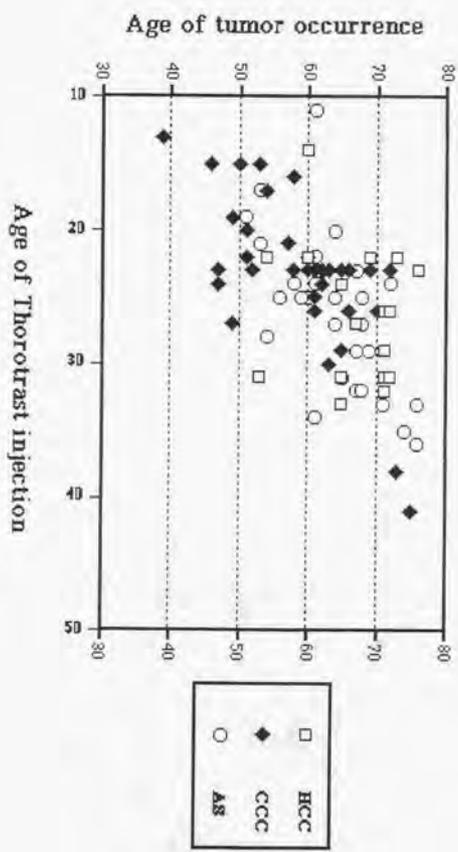
腫瘍関連遺伝子の遺伝子変化

症例	診断	LOH			Mutation of p53 gene (locus)
		17p13	13q14	6q25-27	
1	HCC	+	NI	-	(ex5) codon 166 TCA→TAA
2	HCC	NI	-	-	(ex6) codon 219 C deletion
3	HCC	-	NI	NI	
4	HCC	ND	ND	ND	
5	HCC	-	-	-	
6	HCC	-	NI	-	(ex7) codon 250 CCC→CTC (ex7) codon 260 TCC→CCC
7	HCC	-	ND	ND	(ex8) codon 286 GAA→GAG
8	HCC	-	-	NI	(ex8) codon 273 CGT→TGT
9	HCC	-	-	NI	(ex8) codon 273 CGT→TGT
10	HCC	+	-	NI	(int7) T→C
11	HCC	+	NI	-	(ex5) codon 144-155 33bp deletion
12	CCC	-	+	-	
13	CCC	-	-	-	
14	CCC	NI	ND	ND	(ex6) codon 193 CAT→TAT
15	CCC	-	ND	ND	
16	CCC	-	-	-	
17	AS	+	-	-	(int8) A→C
18	AS	ND	-	ND	
19	AS	-	-	-	

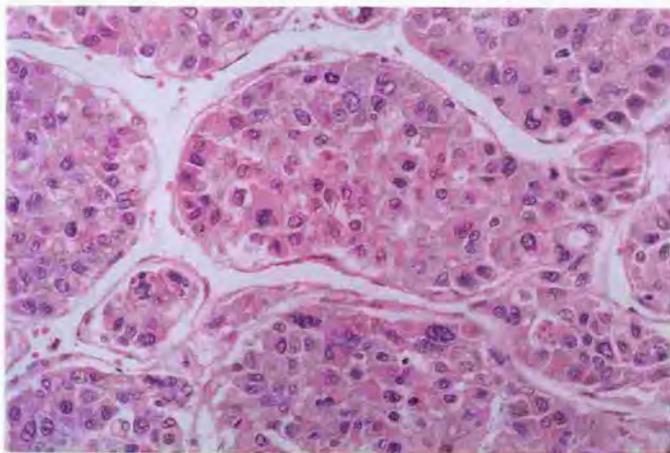
- : LOH positive, + : LOH negative

NI : not Informative, ND : not determined

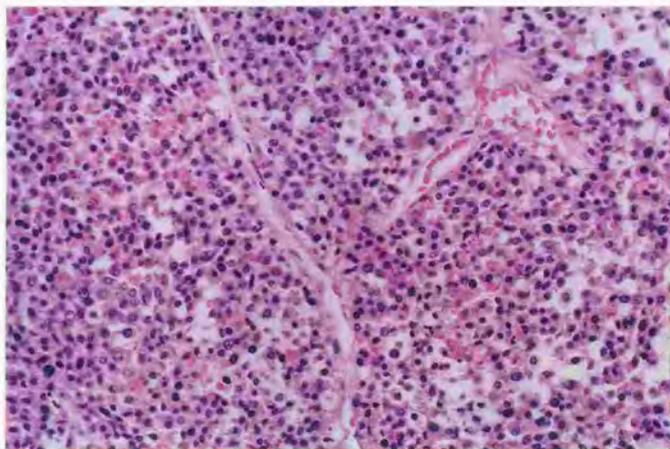
Thorotrast related primary liver tumors



(図2) Thorotrast関連肝細胞癌

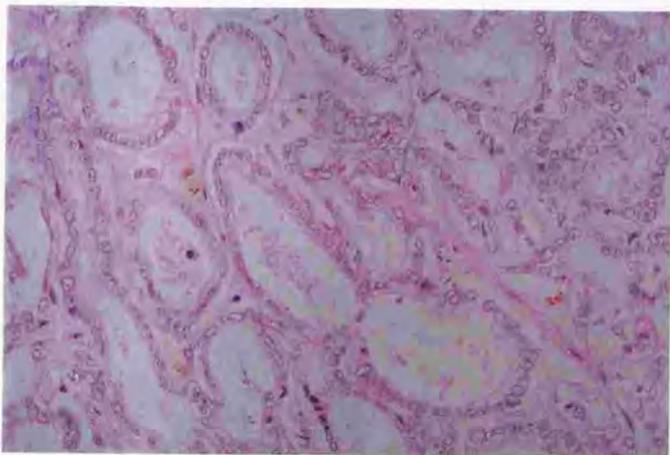


肝細胞癌、中分化型。厚い索状構造を示す。(HE)

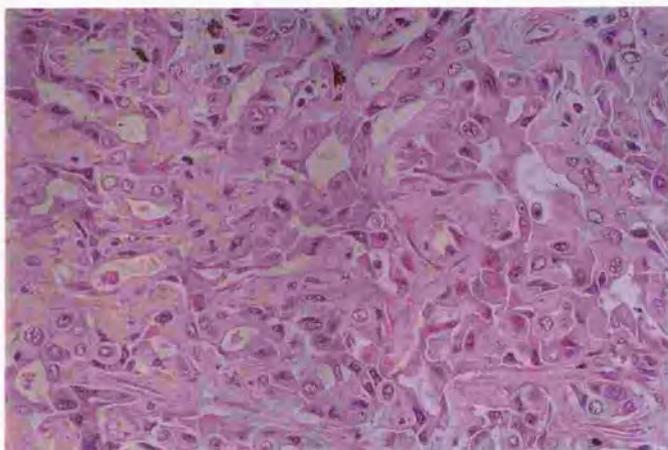


肝細胞癌、低分化型。索状構造は不明瞭化している。(HE)

(図3) Thorotrast関連胆管細胞癌

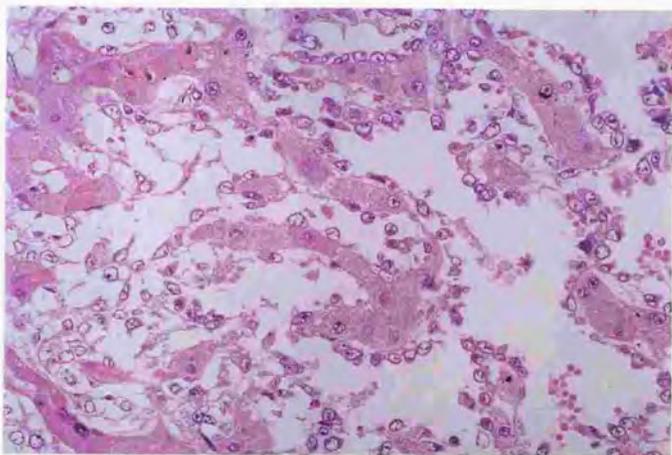


胆管細胞癌、高分化型。腺管形成を示す。(HE)

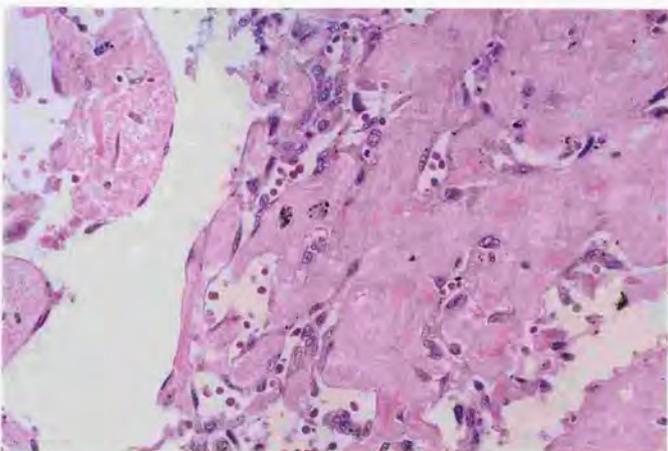


胆管細胞癌、低分化型。線維化が著明で、腺管構造は不明瞭化している。(HE)

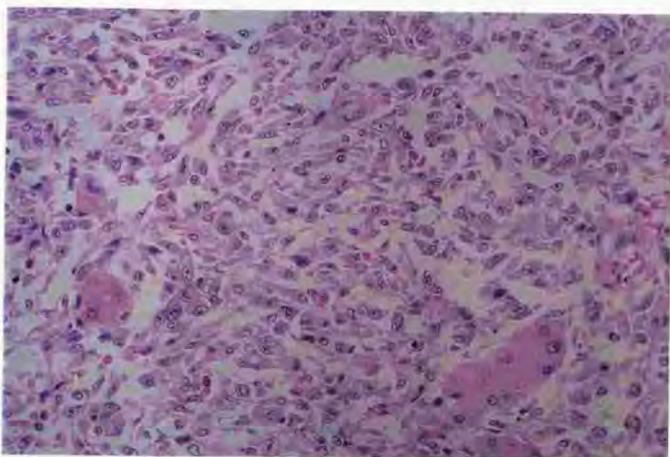
(図4) Thorotrast関連血管肉腫



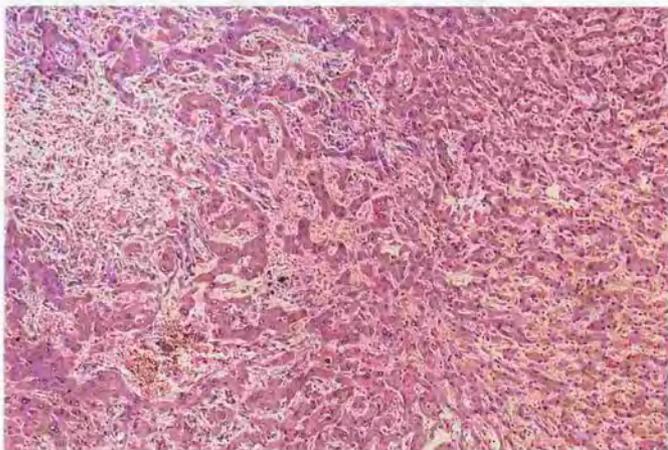
血管肉腫、sinusoidal type。紡錘形の腫瘍細胞が拡張した類洞に沿っている。
(HE)



血管肉腫、cavernous type。腫瘍細胞は線維性結合織に沿い海綿状に増殖している。(HE)

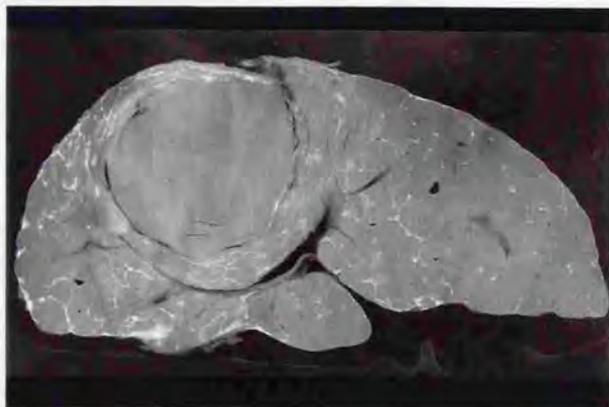
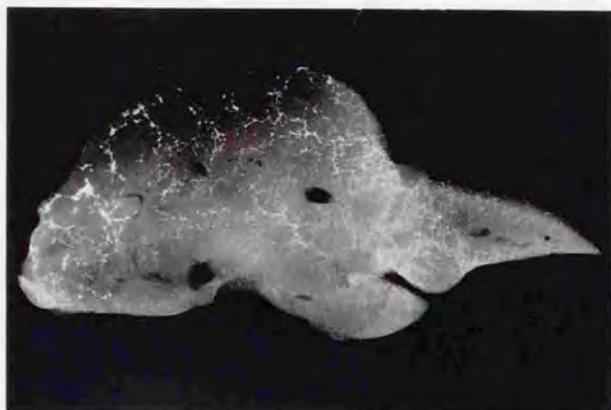


血管肉腫、solid type。腫瘍細胞が血管腔を形成せず充実性に増殖している。
(HE)



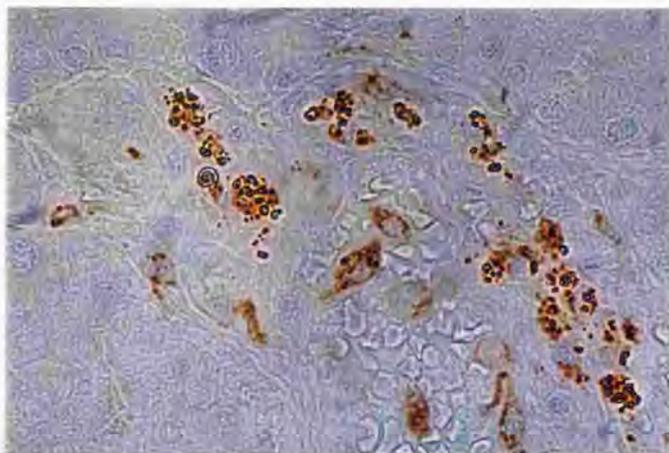
血管肉腫とその周辺部。腫瘍の周囲には類洞の拡張した肝組織を認める。(HE)

(図5) Thorotrastの肝への沈着

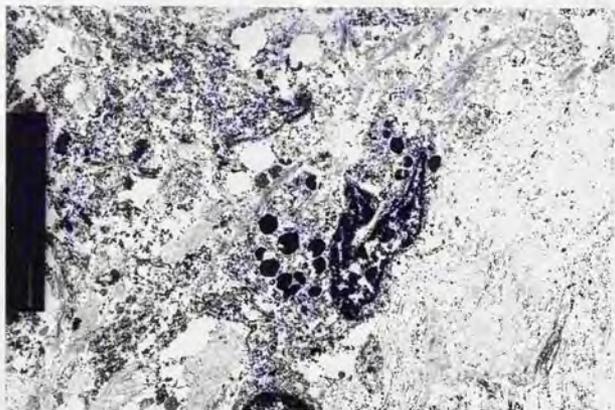


Thorotrast被注入肝標本の軟線撮影。Thorotrastは肝被膜下及び門脈域に沈着している。肝腫瘍内にはほとんど沈着が認められない。

(図6) ThorotrastのKupffer細胞への取り込み

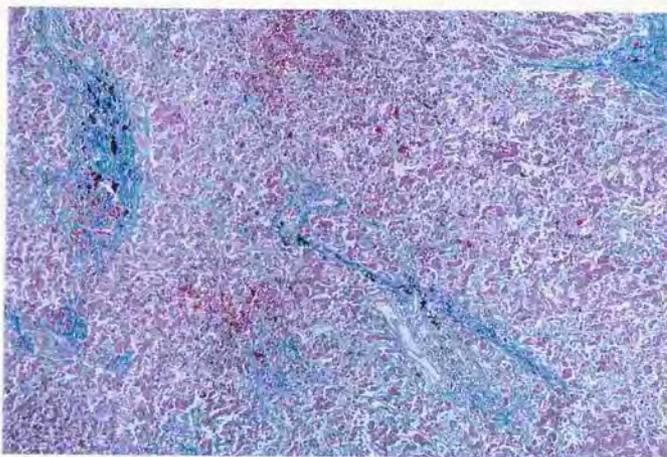


Kupffer細胞を認識する抗CD68抗体(Kp1)陽性細胞の細胞質内にThorotrastが取り込まれている。(Kp1)



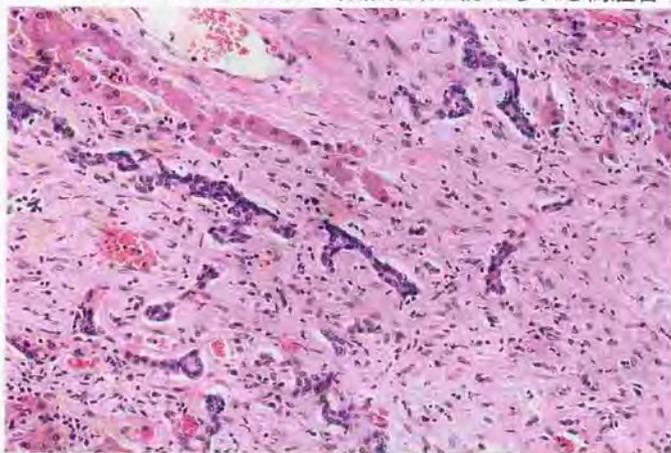
パラフィン包埋ブロックからの戻し電子顕微鏡写真。膠原線維に接している細胞の細胞質内に電子密度の高いThorotrast顆粒が認められる。

(図7) Thorotrastによる肝線維化



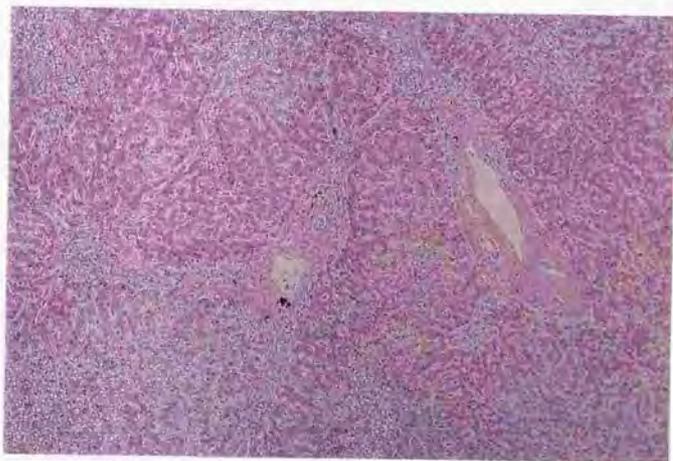
非腫瘍部では門脈域だけでなく類洞壁に強い線維化が認められた。
肝細胞は再生像に乏しく、再生結節を形成しない。炎症細胞浸潤は門脈域
には認められるが、小葉内には軽度であった。(AZAN)

(図8) Thorotrastの沈着した肝の線維化巣に認められる偽胆管増生

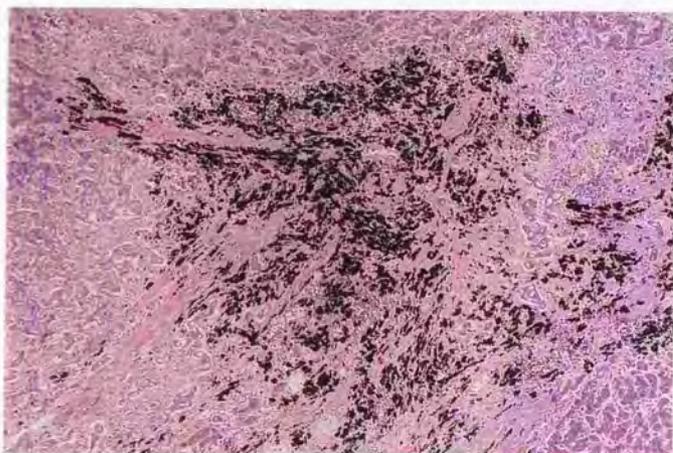


線維化巣内には偽胆管増生が目立つ。異型性は認められない。(HE)

(图9) 肝Thorotrast沉着度

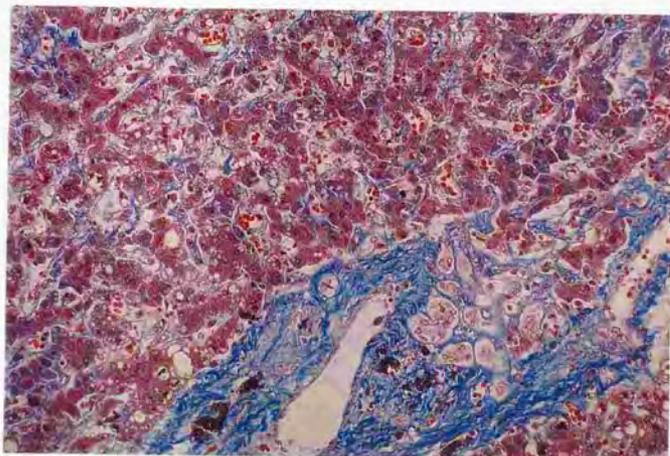


Thorotrast沉着度：D1 (HE)

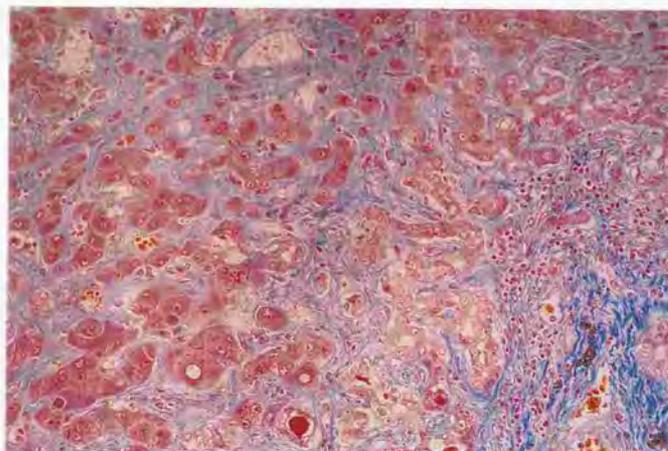


Thorotrast沉着度：D3 (HE)

(圖 10) 肝線維化度

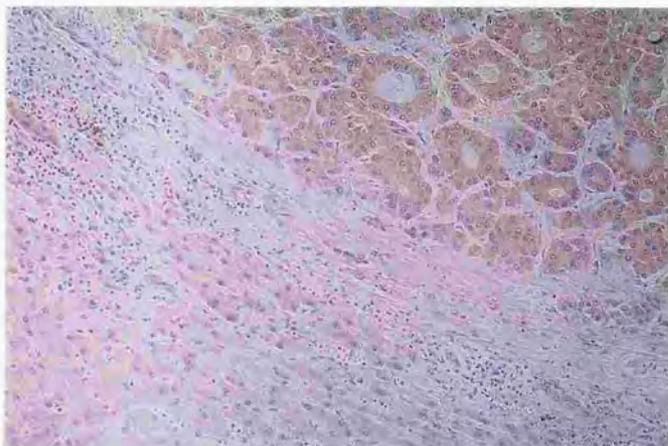


肝線維化度：F 2 (AZAN)



肝線維化度：F 3 (AZAN)

(図 1 1) 抗Pan-ras、p53抗体による免疫組織化学染色

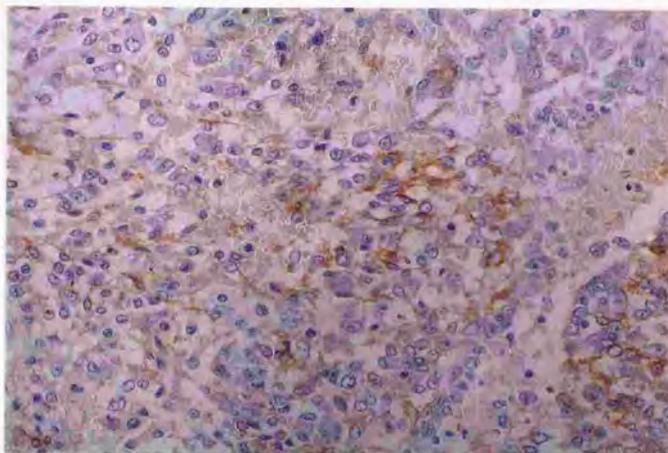


抗Pan-ras抗体の免疫組織化学染色にて中分化型肝細胞癌の細胞質に陽性所見を認める。(AB-1)

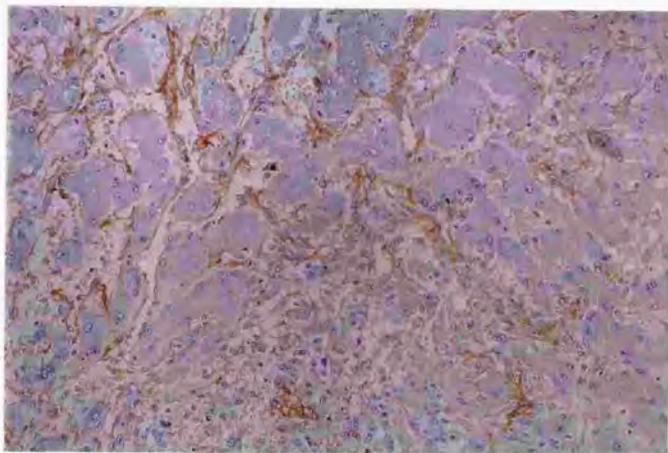


抗p53抗体の免疫組織化学染色で低分化型胆管癌の核に陽性所見を認める。(DO-7)

(図 1 2) 抗CD34抗体による免疫組織化学染色

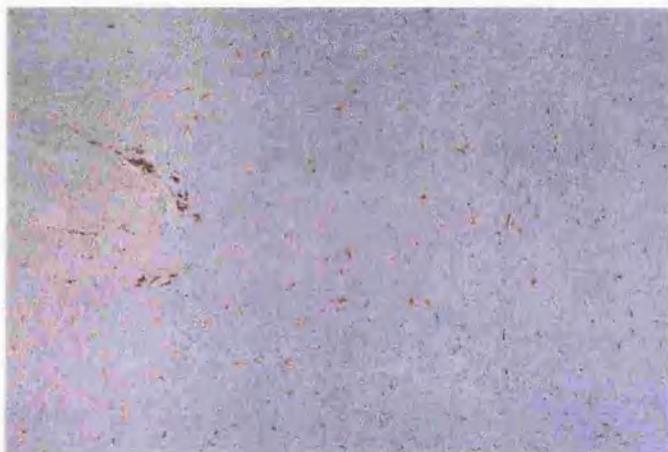


血管肉腫(solid type)は抗CD34抗体(MY10)に対して、陽性を所見を示す。(MY10)



抗CD34抗体に対して、類洞血管内皮細胞は通常陰性を示す。
しかし、血管肉腫の周囲に認められる拡張した類洞の血管内皮細胞は腫瘍同様に陽性所見を示す。(MY10)

(図13) 線維化と抗CD68抗体(Kp-1)陽性細胞

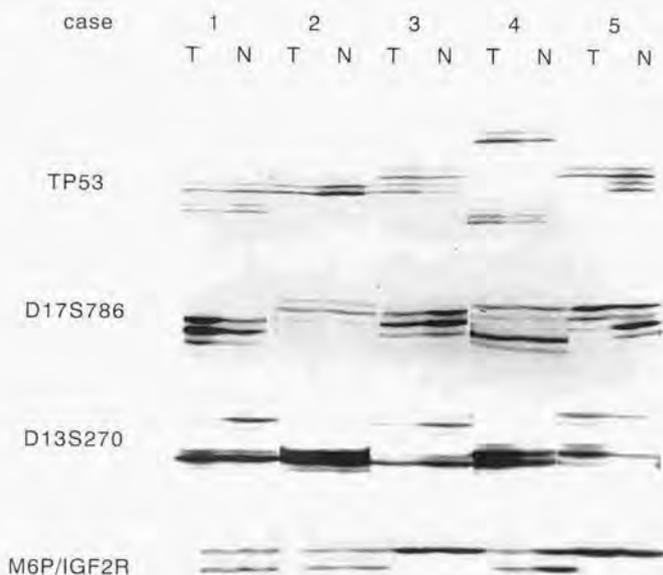


線維化の軽度な部分では、Kupffer細胞を認識する抗CD68抗体(Kp1)陽性細胞が比較的多数認められる。(Kp1)



一方、線維化の高度な部分では、抗CD68抗体(Kp1)陽性細胞はほとんど認められない。(Kp1)

(図14) Thorotrast関連肝腫瘍のmicrosatellite analysis



Thorotrast関連肝腫瘍のMicrosatellite analysis.

TP53 : case 1, 3, 4, 5がinformative。このうちcase 5 にLOHを認める。

D17S786 : case 1, 3, 4, 5がinformative。このうちcase 5 にLOHを認める。

D13S270 : case 1, 3, 5がinformative。このうちcase 1 にLOHを認める。

M6P/IGF2R : case 1, 2, 4がinformative。LOHのcaseを認めない。

(LOH : Loss of heterozygosity)

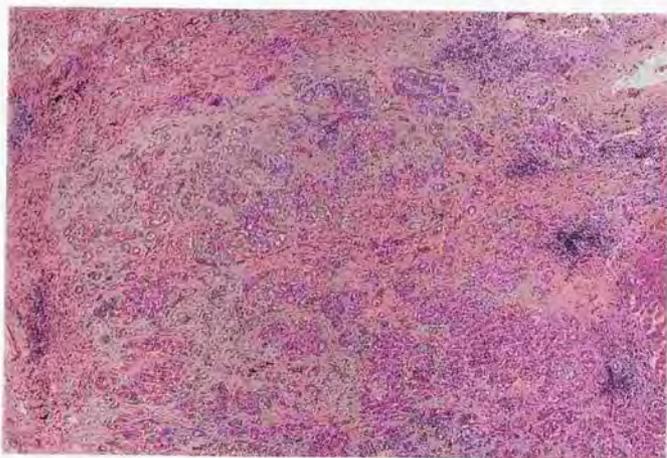
(図15) Thorotrast関連肝細胞癌剖検例



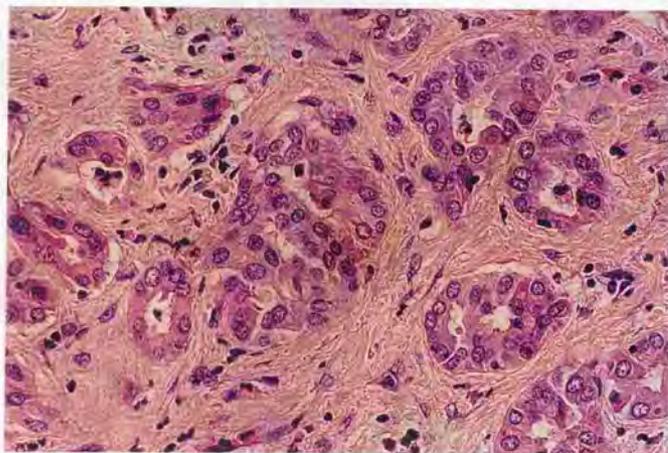
群馬大学剖検肝肉眼像。肝臓は強い胆汁鬱滞を示し、腫大(1700g)しており、線維化を伴って表面凹凸不整であった。



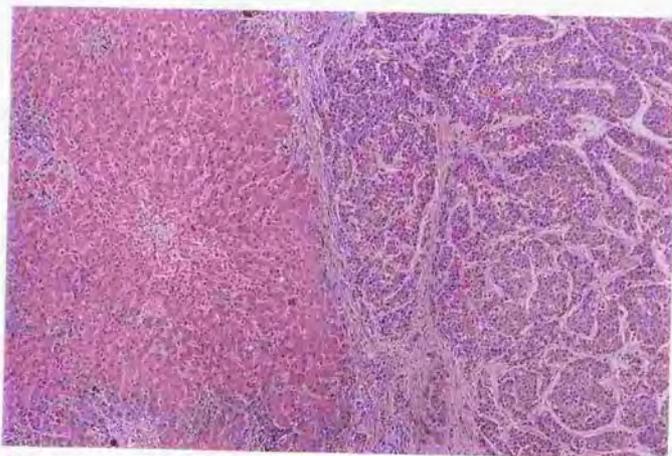
断面の肉眼像。右葉に径12.5cm大の黄白色の多結節癒合型腫瘍を認めた。また、肝全体に径3cmまでの結節性の白色腫瘍を多数認めた。



周囲に対して圧排性に増生する胆管増生巣を認める。(HE)

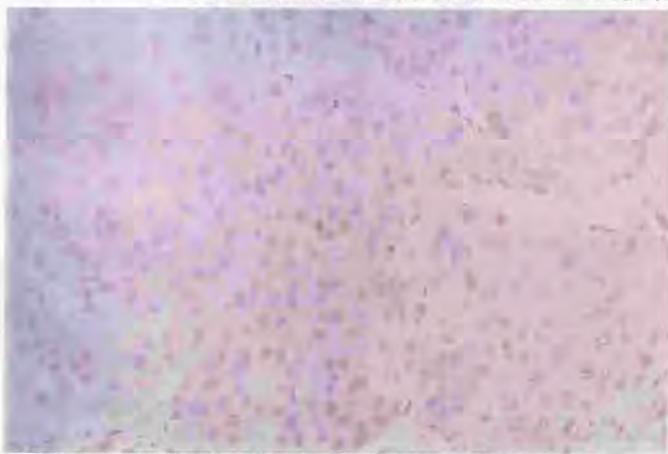


増生する胆管細胞に異型性を認めない。(HE)

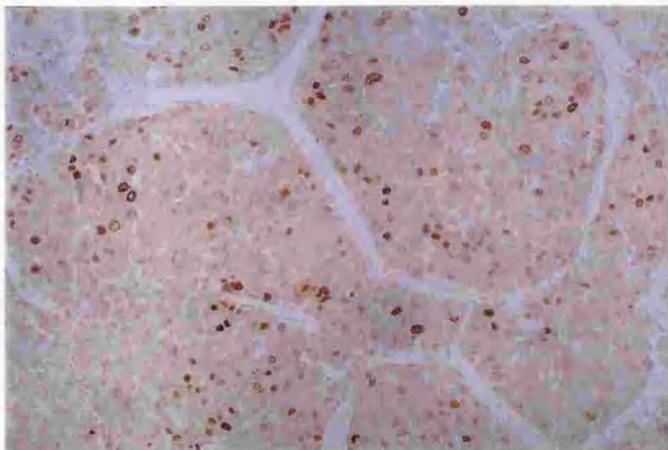


索状配列を示しつつ増生する中分化型肝細胞癌を認める。(HE)

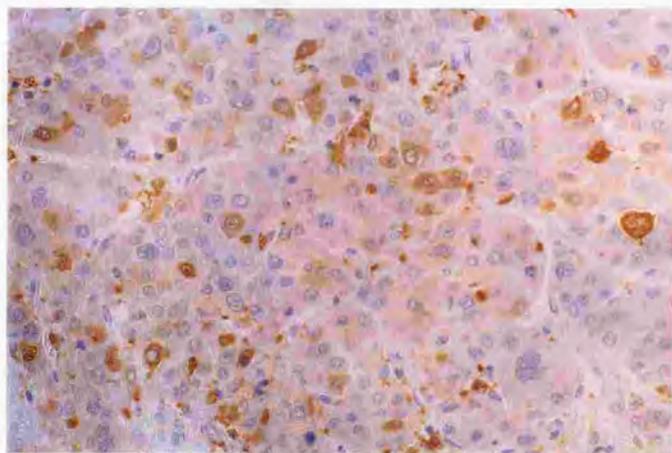
(図16) Thorotrast関連肝細胞癌剖検例の免疫組織化学的検索



抗p53抗体による免疫組織化学染色では、肝細胞癌の核は弱陽性を示す。(DO-7)

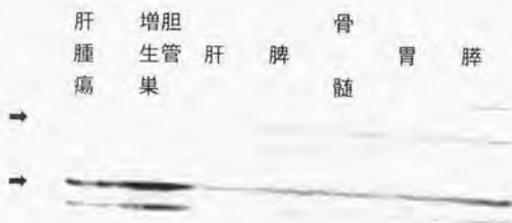


抗Ki-67抗体による免疫組織化学染色では、肝細胞癌の核は陽性を示す。
(MIB-1)



抗Metallothionein抗体による免疫組織化学染色では、Thorotrast
関連肝細胞癌の細胞質は陽性を示す。(E9) (非腫瘍部でも陽性を示す。)

(図 1 7) Thorotrast関連肝細胞癌剖検例のp53の分子生物学的検索

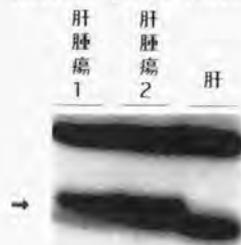


17p13のmicrosatellite analysis. 腫瘍及び胆管増生巢にLOHが認められる。

Sequencing of p53 exon5



SSCP p53 exon5



SSCP法にてp53 exon5に異常bandが認められた。sequencing では、codon 166 に point mutation (TCA->TAA)を認めた。

