

鉄負荷によるラット実験肝癌の抑制

山下 裕 人, 飯田 美佐枝, 石井 三和子
千馬 正 敬, 板倉 英 世

長崎大学熱帯医学研究所病理学部門

The Inhibitory Effect of Iron-overload on the Chemically-induced Hepatocarcinogenesis in Rats.

Hiroto YAMASHITA, Fusae IDA, Miwako ISHII, Masachika SENBA and Hideyo ITAKURA
(Department of Pathology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University)

Abstract : Effects of iron-overload on the chemically-induced carcinogenesis of the rat liver were studied. The rats were given 2% of ferric ammonium citrate in drinking water for 3 weeks, usual drinking water for 1 week and then 50 ppm diethylnitrosamine. The rats of the control group were given usual drinking water for 4 weeks and then 50 ppm diethylnitrosamine. Each paired group composed of treated rats and control rats given diethylnitrosamine for the same period was sacrificed simultaneously at the different experimental periods. The hepatoma nodules and the size of each nodule were examined. Then the histopathological study of the liver was done. The comparison of the development of the hepatoma, estimated by the number and sizes of the nodules, were made in each paired group. Although 16 paired groups were tested, the comparison could be made only in 10 pairs. Nine pairs showed more developed hepatoma nodules in the control group than in the treated group and one pair showed the reversed result. Sign test was done and the calculated probability of the observed result was 0.0107. This result suggests that iron-overload inhibits the carcinogenicity of diethylnitrosamine in rats.

Tropical Medicine, 22(3), 173-180, October, 1980

はじめに

我々は東アフリカ・ケニア国において種々の調査を行い、この国が肝癌の多発地帯でありB型肝炎ウイルスや毒性真菌類の高浸淫地帯であること、また肝鉄沈着症が高率に存在することを報告してきた(長崎大学熱帯医学研究所病理学部門, 1980)。この鉄沈着症が肝に与える影響、特にその fibrogenetic effect については、それを肯定する報告 (Bothwell and Bradlow, 1960) と否定する報告 (Higginson

et al., 1953) とがありまだ明確な結論は出ていない。また人の特殊な肝硬変症であるヘモクロマトーシス(肝硬変症+鉄沈着症)では一般の肝硬変症にくらべて肝癌の合併率が高い(Warren and Drake, 1950) ので鉄も肝発癌因子の一つと考えられている。しかし動物実験 (Dunn, 1976, Yamamoto *et al.*, 1971) や臨床的観察 (Jacobs, 1979) では鉄の肝発癌性に対して否定的な報告が多い。本研究では、これら鉄が肝に与える種々の影響のうちで発癌に対する影響に注目し鉄負荷が化学発癌に対し如何

なる影響を及ぼすかを調べた。そして鉄負荷が化学発癌に対しむしろ抑制的に作用する結果を得たのでここに報告する。

材料と方法

動物：体重 150g 前後のウィスター系のオスラットを用いた。飼料にはオリエンタル社製ラット用固

Table 1. Number and size of cancer nodules observed in the rat treated with 2% iron and 50 ppm DEN

Experimental No.	Duration of DEN treatment (weeks)	No. of cancer nodules	Size of the each nodule (mm in diameter)
N-111	4	0	
N-112	4	0	
N-113	4	0	
N-121	8	0	
N-122	8	0	
N-123	8	0	
N-131	12	0	
N-132	12	0	
N-133	12	0	
N-141	16	0	
N-142	16	0	
N-143	16	0	
N-151	18	0	
N-152	18	0	
N-153	18	1	2
N-161	20	2	2, 2
N-162	20	1	3
N-163	20	3	2, 2
N-171	22	3	5, 2, 2
N-172	22	0	
N-181	18	0	
N-182	18	0	
N-191	19	0	
N-192	19	0	
N-1101	20	0	
N-1102	20	0	
N-1111	21	0	
N-1112	21	0	
N-1121	22	0	
N-1122	22	0	
N-1131	23	6	10, 8, 5, 3, 2, 1
N-1132	died at 18 weeks of the DEN treatment after begining		
N-1141	24	0	
N-1142	24	0	
N-1151	25	0	
N-1152	25	0	
N-1161	26	5	20, 15, 10, 5, 5
N-1162	26	3	6, 1, 1

型飼料を使用した。

薬物：クエン酸鉄アンモニウム（石津）とジエチルニトロサミン（DEN）（東京化成）を用いた。

実験方法：ラットを2%クエン酸鉄含有飲料水にて3週間飼育し、1週間水道水にて飼育し、つぎに50ppmのDEN含有水にて飼育したものを実験群

Table 2. Number and size of cancer nodules observed in the rat liver treated with 50 ppm DEN

Experimental No.	Duration of DEN treatment (weeks)	No. of cancer nodules	Size of the each nodules (mm in diameter)
N-211	4	0	
N-212	4	0	
N-213	4	0	
N-221	8	0	
N-222	8	0	
N-223	8	0	
N-231	12	0	
N-232	12	0	
N-233	12	0	
N-241	16	1	4
N-242	16	0	
N-243	16	3	2, 2, 2
N-251	18	0	
N-252	18	2	9, 9
N-253	18	1	3
N-261	20	1	13
N-262	20	3	3, 3, 3
N-263	20	1	2
N-271	22	1	5
N-272	22	7	3, 3, 3, 3, 3, 2, 2
N-281	18	0	
N-282	18	0	
N-291	19	0	
N-292	19	0	
N-2101	20	0	
N-2102	20	2	1, 1
N-2111	21	0	
N-2112	21	0	
N-2121	22	0	
N-2122	22	1	15
N-2131	23	1	2
N-2132	23	0	
N-2141	24	1	2
N-2142	24	1	3
N-2151	25	2	40, 20
N-2152	25	1	2
N-2161	26	7	28, 20, 15, 10, 10, 10, 10
N-2162	26	4	5, 5, 5, 2

とした。対照群は4週間水道水にて飼育し5週間目から実験群と同様に50ppmのDEN含有水を与えた。つぎにTable 1, Table 2に示す間隔で動物を屠殺した。同一時期に屠殺した実験群と対照群を対として観察した。すなわち屠殺された個々のラットの肝における結節の個数、及びその結節の大きさを調べ、各対間にて、実験群と対照群とについて癌の発育生成度を比較した。つぎに肝の病理組織標本を作成し組織像を調べた。

結 果

Table 1に2%鉄と50ppmのDENで飼育された実験群のラットの肝に生じた癌結節の数と個々の結節の大きさを、Table 2に50ppm DENのみで飼育された対照群ラットの肝の癌結節の数と個々の結節の大きさを示した。代表的な癌結節の肉眼像をFig. 1~Fig. 4に、光顕像をFig. 5~Fig. 7に示してある。癌結節以外にも約1mmの黄白色砂粒の病変や白斑、血腫の形成等がみられた。しかし、

これらの病変は癌ではないので考慮に入れていない。また組織学的には癌か非癌かの判別がむずかしい組織もあるので肉眼的にははっきりとした結節を形成し組織学的に癌と確認されたもののみを取りあげた。また癌組織の構造異形、細胞異形からみた悪性度の差は無視した。癌結節が最初に見出されるのは実験群ではDEN投与開始後18週目であり3匹中の一匹にみとめられるのに対し対照群ではDEN投与開始後16週目であり3匹中2匹にみとめられ対照群の方が早く発癌している。つぎに同一時期に屠殺された実験群と対照群のラット肝癌の進行度を比較した。癌結節が肝を占める割合が大きいものほど癌が早く進行しているものとした。Table 3にその結果を示す。16組の対のうち6組は判定不能であった。判定可能であった残り10組のうち9組は対照群の方が癌の進行度が早く、残り1組は逆の結果を示した。この結果に基づいて符号検定を行うと $P_H(S_{10} \geq 9) = P_H(S_{10} \leq 1) = 0.0107$ となり、実験群と対照群の間には、癌の進行度において有意の差が

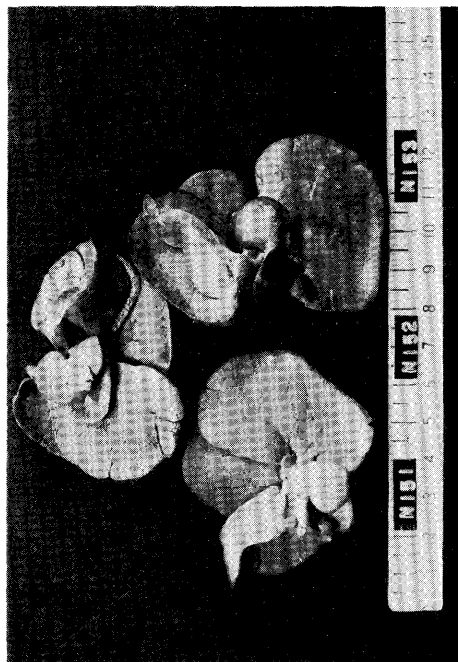


Fig. 1. Macroscopic appearance of livers of one experimental-group-rats. In this group only one nodule seen in Fig. 3 was counted as the cancer nodule.

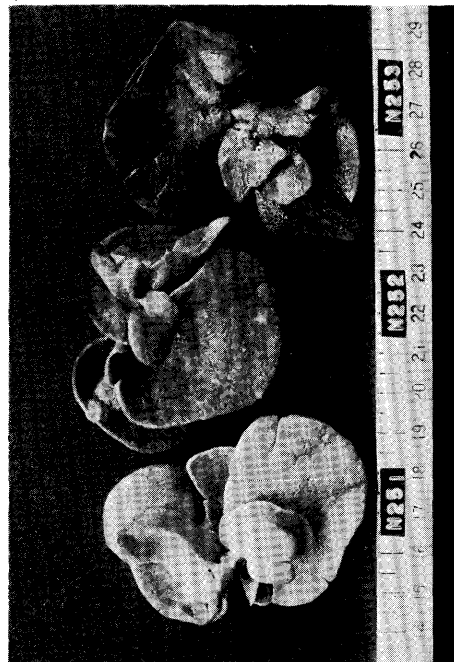


Fig. 2. Macroscopic appearance of the rat liver of the control group paired with the group seen in Fig. 1. In this group, 3 nodules were counted as the cancer nodules.

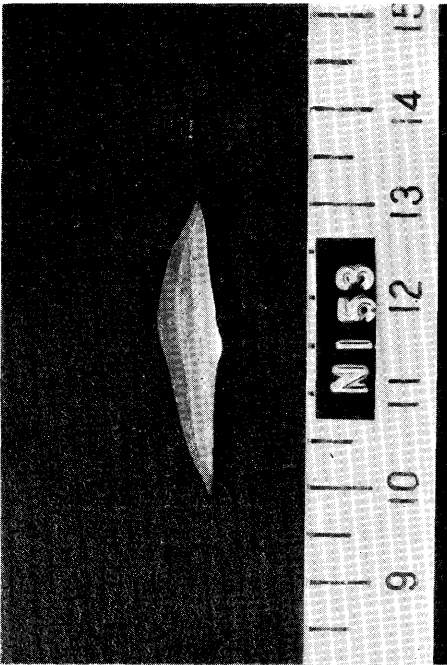


Fig. 3. Cross section of the liver lobe having the largest nodules in this experimental group.

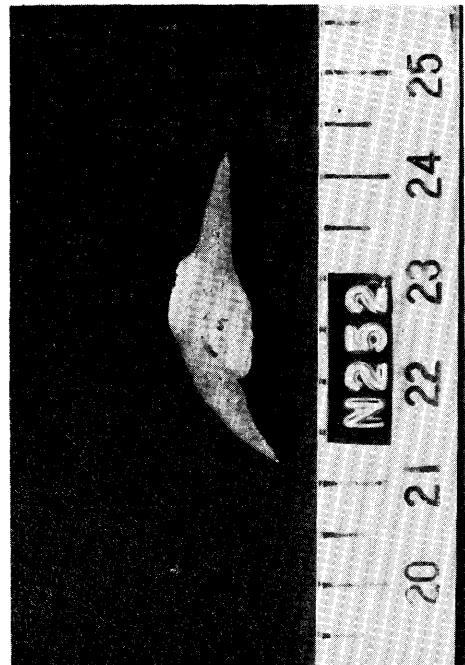


Fig. 4. Cross section of the liver lobe having the largest nodules in this control group.

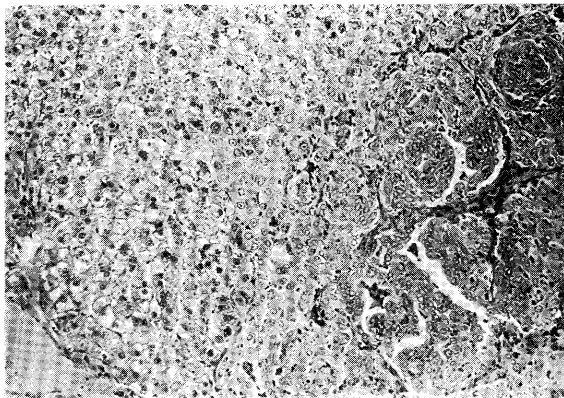


Fig. 5. Microscopic appearance of the cancer nodules seen in Fig. 3. Hepatocellular carcinoma is seen in the right side of this picture. Slightly unclear distinction between carcinoma tissue and normal tissue. x200, H. E. stain.

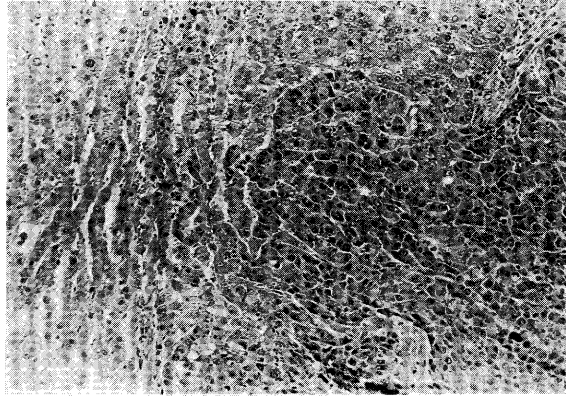


Fig. 6. Microscopic appearance of the cancer nodule in Fig. 4. Hepatocellular carcinoma occupies right side of this picture. Clear distinction between carcinoma tissue and normal tissue. x100. H. E. stain.

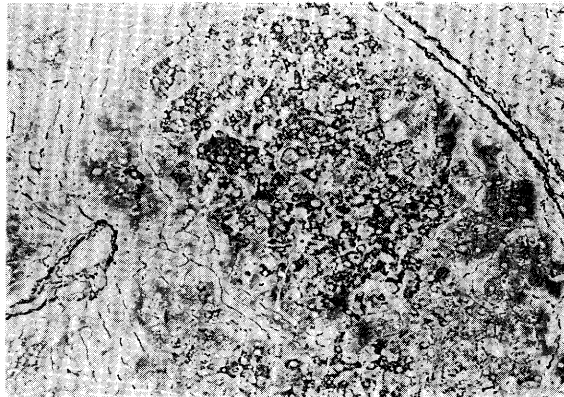


Fig. 7. Reticulin stain reveal clear-cut distinction between carcinoma tissue and normal tissue. x200, Reticulin stain.

あり、実験群の方が癌の進行が遅れており、したがって鉄負荷が発癌に抑制的に作用するものと考えられた。

考 案

鉄は tissue culture において細胞障害性のあること (Richmond, 1961), その作用は chemical carcinogen に類似していること (Vasiliev and Guelstein, 1963), ラットの皮下に肉腫を形成することが報告されている。(Richmond, 1959). また

犬を用いての実験で鉄の大量長期投与によって人のヘモクロマトーシスに類似した病変を生じさせたとの報告もある (Lisboa, 1971). Jacobs (1977) は頻回の輸血で鉄が大量に負荷された患者に肝癌が発生した報告がないと述べ、またヘモクロマトーシスの患者から治療によって鉄を抜き取っても、肝癌の発生率は、未治療の患者の肝癌発生率と有意の差がなく (Powell, 1970), またはむしろ高い (Bomford and Williams, 1966). これらのことから鉄そのものには肝発癌性はないと考えられる。

Table 3. Comparison of the development of cancer nodules in each group between controls (DEN only) and treated (iron and DEN)

Paired groups treated.	control ^{#1}	Direction of difference ^{#2}	Sign
N-11	and N-21	N-11 = N-21	0
N-12	and N-22	N-12 = N-22	0
N-13	and N-23	N-13 = N-23	0
N-14	and N-24	N-14 < N-24	+
N-15	and N-25	N-15 < N-25	+
N-16	and N-26	N-16 < N-26	+
N-17	and N-27	N-17 < N-27	+
N-18	and N-28	N-18 = N-28	0
N-19	and N-29	N-19 = N-29	0
N-110	and N-210	N-110 < N-210	+
N-111	and N-211	N-111 = N-211	0
N-112	and N-212	N-112 < N-212	+
N-113	and N-213	N-113 > N-213	-
N-114	and N-214	N-114 < N-214	+
N-115	and N-215	N-115 < N-215	+
N-116	and N-216	N-116 < N-216	+

^{#1} Rats of paired groups were treated with DEN for the same period and sacrificed at the same day.

^{#2} Comparison of cancer development was based on the number and size of cancer nodules observed in each group.

Willson (1977) は鉄が free-radical 反応を触媒し、その反応が癌原性物質を活性化すると述べ鉄が co-carcinogen として作用する可能性を示唆した。Dunn (1967) は ethionine と鉄負荷併用群と ethionine 単独投与群との比較において肝癌の発生率に有意の差がない事を報告した。Yamamoto ら (1971) は肝に急速に鉄沈着症を起す 8-Hydroxy-quinoline を N-2-fluorenylacetylacetamide と併用投与すると肝癌の発生率が N-2-fluorenylacetylacetamide 単独投与群よりも低くなることを報告し鉄負荷が癌過程に抑制的に働くことを述べている。本実験でもクエン酸鉄アンモニウム投与後、肝細胞ならびにクーパー細胞内に鉄が沈着していることを確認しており鉄負荷が癌過程に抑制的に作用していると考えら

れる。この結果はヘモクロマトーシスでは他の肝硬変よりも発癌率が高い (Warren and Drake, 1950, Shikata et al, 1977) という報告と矛盾しているように思われる。しかし原因別からみた肝硬変症では萎縮性肝硬変 (Purtilo et al, 1973) や肝炎性肝硬変 (Shikata et al., 1977) の方が、ヘモクロマトーシスよりも肝癌の合併率が高い。MacSween (1974) はヘモクロマトーシスの患者のほとんどが男性である (MacDonald and Mallory, 1960) ところから、肝硬変患者の男性の肝癌発生率とヘモクロマトーシスの患者の肝癌発生率とを比較したところ両者に有意の差はみとめられなかったと報告している。肝癌を合併したヘモクロマトーシス患者の剖検年齢は Warren and Drake (1950) によれば、最若年者で59才、最高令者で79才、平均65.5才であり日本での肝癌を合併した肝硬変患者の剖検年齢が40才台から50才台にかけてピークに達する (松下, 1970) ことと比べると、ヘモクロマトーシスでは癌の発育がかなり遅れるものと考えられる。これも鉄沈着が癌に抑制的に作用する為であると思われる。

鉄負荷が肝癌を抑制する機構は不明である。しかし、肝鉄沈着症と肝癌の合併例では鉄は組織学的に正常の組織に認められるが、癌結節ならびに前癌結節には染め出されないことが知られている (Williams and Yamamoto, 1972)。また肝癌患者では血中に ferritin (含鉄蛋白) が増加することも知られている (高後ら, 1976)。肝癌細胞が鉄を取り込むことはすでに報告してある (Yamashita, 1979)、したがって癌細胞は正常細胞に比べて比較的容易に鉄を細胞外へと放出するものと考えられる。鉄は細胞内では Fe^{+3} の形で存在し Fe^{+2} の形で細胞外へ放出される (Underwood, 1975)。鉄が電子を一個受け取って細胞外へ放出されることが癌の抑制と関係があるのかも知れない (Szent-Gyorgyi, 1979)。我々は鉄が前癌結節においても染め出されないことから、その機構は不明であるが、鉄の存在自体が癌を抑制するものと考えている。すなわち鉄を負荷された細胞が癌化する為には、まず鉄を細胞外に排出することが必要であり、したがって、それだけ癌がおくれるのではないかと考えている。

文 献

- 1) Bomford, A., & Williams, R. (1976): Long term results of venesection therapy in idiopathic hemochromatosis. *Q. J. Med.* 45, 611-623.
- 2) Bothwell, T. H., & Bradlow, B. A. (1969): Siderosis in the Bantu. A combined histopathological and chemical study. *Arch Path.*, 70, 279-292.
- 3) Dunn, W. L. (1967): Iron-loading, fibrosis and hepatic carcinogenesis. *Arch Path.*, 83, 258-266.
- 4) Jacobs, A. (1977): Ciba foundation sym. Iron Metabolism. 51, 351.
- 5) Higginson, J., Gerristen, T., & Walker, A. R. P. (1953): Siderosis in the Bantu of Southern Africa. *Am. J. Path.*, 29, 779-815.
- 6) Lisboa, P. E. (1971): Experimental cirrhosis in dogs caused by chronic massive iron overload. *Gut*, 12, 363-318.
- 7) MacDonald, R. A., & Mallory, G. K. (1960): Hemochromatosis & hemosiderosis. Study of 211 autopsied cases. *Arch. Intern. Med.* 105, 686-700.
- 8) MacSween, R. N. M. (1974): A clinico-pathological review of 100 cases of primary malignant tumor of the liver. *J. Clin. Pathol.*, 27, 669-692.
- 9) 松下 寛 (1975): 日本の肝硬変と肝癌. *臨床科学*, 11, 275-286.
- 10) 長崎大学熱帯医学研究所病理学部門 (1980): 東アフリカ・ケニア共和国における肝臓疾患の疫学と病理. 文部省科学研究費海外学術調査報告書.
- 11) Powell, L. W. (1970): Tissue damage in haemochromatosis: an analysis of the roles of iron and alcoholism. *Gut*, 11, 980.
- 12) Purtilo, D. T., & Gottlieb, L. S. (1973): Cirrhosis and hepatoma occurring at Boston City Hospital. (1971-1968). *Cancer*, 32, 458-462.
- 13) Richmond, H. G. (1995): Induction of sarcoma in the rat by iron-dextran complex. *Br. Med. J.* 11, 947-949.
- 14) Richmond, H. G. (1961): The toxic effects of iron-dextran complex on mammalian cells in tissue culture. *Br. J. Cancer*, 15, 549-606.
- 15) Shikata, T., Yamazaki, S., & Uzawa, T. (1977): Hepatocellular carcinoma & chronic persistent hepatitis. *Acta Pathol. Jpn.*, 27, 297-304.
- 16) Szent-Gyorgyi, A. (1979): Ciba foundation symp. Submolecular biology and cancer, 52, 3-18.
- 17) 高後 裕, 新津洋司郎, 渡辺直樹, 大塚 忍, 小関純一, 柴田恵子, 漆崎一朗 (1976): 血清 ferritin の radioimmunoassay 法とその消化器疾患における臨床的応用に関する研究. *日・消・病・誌*, 73, 75-88.
- 18) Underwood, E. J., 日本化学会訳編 (1975): 微量元素-栄養と毒性-, 15-56, 丸善
- 19) Vasiliev, J., & Guelstein, V. (1963): Sensitivity of normal and neoplastic cells to the damaging action of carcinogenic substances: A review. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1123-1143.
- 20) Warren, S., & Drake, W. L. (1950): Carcinoma of the liver in hemochromatosis. *Am. J. Pathol.*, 27, 573-609.
- 21) Williams, G. M., & Yamamoto, R. S. (1972): Absence of stainable iron from preneoplastic and neoplastic lesions in rat liver with 8-Hydroxyquinoline-induced siderosis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 49, 685-692.
- 22) Willson, R. L. (1977): Ciba Foundation sym. Iron Metabolism, 51, 331-334.
- 23) Yamamoto, R. S., Williams, G. M., Frankel, H. H., & Weiburger, J. H. (1971): 8-Hydroxyquinoline: chronic toxicity and inhibitory effect on the carcinogenicity of N-2-Fluorenyl acetamide. *Toxicology and applied Pharmacology*, 19, 687-698.
- 24) Yamashita, H. (1979): Radio-iron uptake of rat hepatoma. *Gann*, 70, 593-600.