

ヒト慢性肝疾患および diethylnitrosamine による 発癌過程ラット肝の feulgen DNA 量の検討

鈴木 陽 一

信州大学医学部第2内科学教室
(主任: 古田精市教授)

Feulgen DNA Content of Hepatocyte Nuclei in Human Chronic Liver Diseases and in DEN-Fed Rats

Yoichi SUZUKI

Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Seiichi FURUTA)

The feulgen DNA content in isolated hepatocytes and the liver tissue of patients with chronic liver diseases and of diethylnitrosamine (DEN)-fed rats was studied cytofluorometrically.

In isolated hepatocytes from normal human liver, ploidy histograms were mostly diploid, whereas tetraploid, triploid, and polyploid patterns increased in frequency with the progression of chronic liver diseases. The histograms for non-cancerous portions of hepatocellular carcinoma showed increased polyploidization, resembling the hepatocellular carcinoma portions. Liver tissue specimens revealed nearly the same ploidy histograms as those for isolated hepatocytes. The ratio of greater/lesser DNA content in paired nuclei of binucleated cells increased with the progression of the chronic liver diseases. These findings were also seen in experimental DEN-fed rats according to the duration of DEN-feeding.

These results indicate that abnormal cell kinetics had already occurred before the development of hepatocellular carcinoma and that patients with such abnormalities should be carefully followed up for early detection of hepatocellular carcinoma. *Shinshu Med. J.*, 30: 609-620, 1982

(Received for publication August 12, 1982)

Key words: ploidy histogram, feulgen DNA, cytofluorometry, hepatocellular carcinoma

プロイディヒストグラム, フォイルゲン DNA, 顕微蛍光測光法, 肝細胞癌

I 緒 言

慢性肝炎, 肝硬変から肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC 以下肝癌) 発生への一連の過程において, 臨床的に肝硬変が肝癌の前癌性病変として考えられているが, 肝硬変から肝癌発生の成因についてはまだに不明な点が多い。

前癌性病変と考えられる肝硬変症を, 肝機能検査,

α -fetoprotein, 肝シンチグラフィ, 肝エコーグラムなどにより経過観察しても, 肝癌の確診時にはすでに巨大腫瘤を形成していたり, 肝内転移を認めることが少なくない。最近の肝癌外科手術療法のめざましい進歩を考慮しても, 手術不能例が圧倒的に多いことは日常しばしば経験するところである。また同じ肝硬変でも長期間にわたって比較的安定した状態を持続し肝癌の合併をみない症例と, 比較的短期間に肝癌へ進展す

る症例の存在することも臨床経験される。このような経過の相異がいかなる機序によるものかについての研究は少なく、現在あきらかにされていない。また、肝癌を合併する確率の高い肝硬変と低い肝硬変を、臨床・病理学的に区別できれば、前者の経過観察、治療中に精力的に肝癌発生の有無を検索してゆくことにより、その早期診断率がより向上する可能性があると考えられる。

一般に癌細胞では染色体異常の多いことが報告されている。そこで著者は肝生検ならびに一部剖検時に得られた肝組織において、肝細胞 DNA 量を測定することにより、肝癌発生の早期予知が可能か否か、肝硬変が肝癌の前癌性病変として把握されるのか否かについて検討し、また併せてラットにおける diethylnitrosamine 投与時の肝癌発生過程における肝細胞 DNA 量の変化についても検討を行ったのでその成績を報告する。

II 対象および実験方法

A 対象

1 ヒト

外科的生検、腹腔鏡下肝生検、一部剖検により組織学的に診断された肝疾患患者26例を対象とした。その内訳は、慢性肝炎6例（非活動型2例、活動型4例）、肝硬変10例、肝癌例11例である。なお肝癌例については手術時の切除肝癌部、ならびに剖検例の肝癌部について6例を対象としたが、ほかの5例では腹腔鏡下の肝生検のため肝癌部についての検索は施行することができなかった。肝癌例では抗腫瘍剤の使用により正常肝細胞（硬変肝）の核酸代謝が障害される可能性が考えられる²⁾ため、抗腫瘍剤を使用していない症例を検討した。また対照としては、胃十二指腸潰瘍手術例および胆石手術例での手術時肝生検材料を用い、臨床病理学的に特別の異常のみられない6例を用いた。

2 ラット

Wistar 系雄ラット体重 150 ± 20 g を通常の飲料水を飲ませた対照群と、発癌物質として diethylnitrosamine (以下 DEN) を 50ppm 濃度に薄め飲料水として ad libitum に経口投与した DEN 投与群の2群に分け、投与後0週、2週、5週、10週、16週に断頭屠殺し肝組織を採取した。

B 方法

肝組織片を生検ないし剖検直後に、Eagle MEM 培養液 (pH 7.4) または生理食塩水中に浮遊し約1時間

以内に小型のハサミ、またはカミソリにて細切し、Daunce 型 loose-fit homogenizer を用いて軽く3～4回ストロークを加え肝組織片を破碎した。500 rpm 5分間遠沈し上清を除去、さらに生食を加え再度 500 rpm 5分間遠沈し上清を適宜除去した後、沈渣を無蛍光ガラスに塗抹乾燥後100% エタノールにて固定を行い分離肝細胞塗抹標本を作製した。一方、生検ないし剖検時に得られた肝組織片を10%ホルマリン液にて固定し、パラフィン包埋後通常組織像観察用の薄切切片と feulgen 染色用の厚切切片（厚さ12～13 μ m）を作製した。

切片標本は、キシロール・アルコール系列で型のごとく脱パラ、水洗。塗抹標本は5分、切片標本は10分間、60°C INHCl にて加水分解した。Stowell の緩衝 Schiff 液³⁾⁴⁾ (Schiff の試薬5ml+15% 重亜硫酸ナトリウム 10ml+Sørensen glycine buffer pH2.3, 85 ml) により30分間、feulgen DNA 染色を施行した。その後、Sørensen glycine buffer 9 容+15%重亜硫酸ナトリウム 1 容の洗浄液にて3回洗浄。切片標本は型のごとくアルコール・キシロールにて脱水、透徹、バルサムにて封入。非特異的蛍光の除去を目的として、約6時間緑色励起光により postirradiation⁵⁾⁶⁾ を施行した。

肝細胞核内 DNA 相対量（以下 DNA 量）の測定は、オリンパス光学社製落射式顕微蛍光測光装置 (OLYMPUS, BH2-QRFL system) を用いて行った。すなわち水銀ランプ光源から励起フィルター、吸収フィルターを経た緑色励起光（波長 545nm）をダイクロイックミラー (DM 580) を経て検体を照射し、細胞核から放出される赤色蛍光量を測光フィルター（ピーク値 630nm）を通して被検材料の DNA を測光定量した。測光定量された DNA 量は、接続されたパーソナルコンピューターに記憶され同時にヒストグラムとして描出される。

顕微鏡下に細胞核を観察しながら、標本内に混在するリンパ球30個の DNA 量を測定し、個々のリンパ球の DNA 量を基準にそれに相当する核 DNA 量を diploid (2n) とし、2 倍量、4 倍量をそれぞれ tetraploid (4n), octaploid (8n) としておのおのの ploidy の分析を行った。なお、切片標本における肝細胞核 DNA 量の測定にあたっては、核相互の重複、切断のない核を選択し、任意の細胞を1核細胞、2核細胞に分けて計約200個の肝細胞について核 DNA 量を測定した。

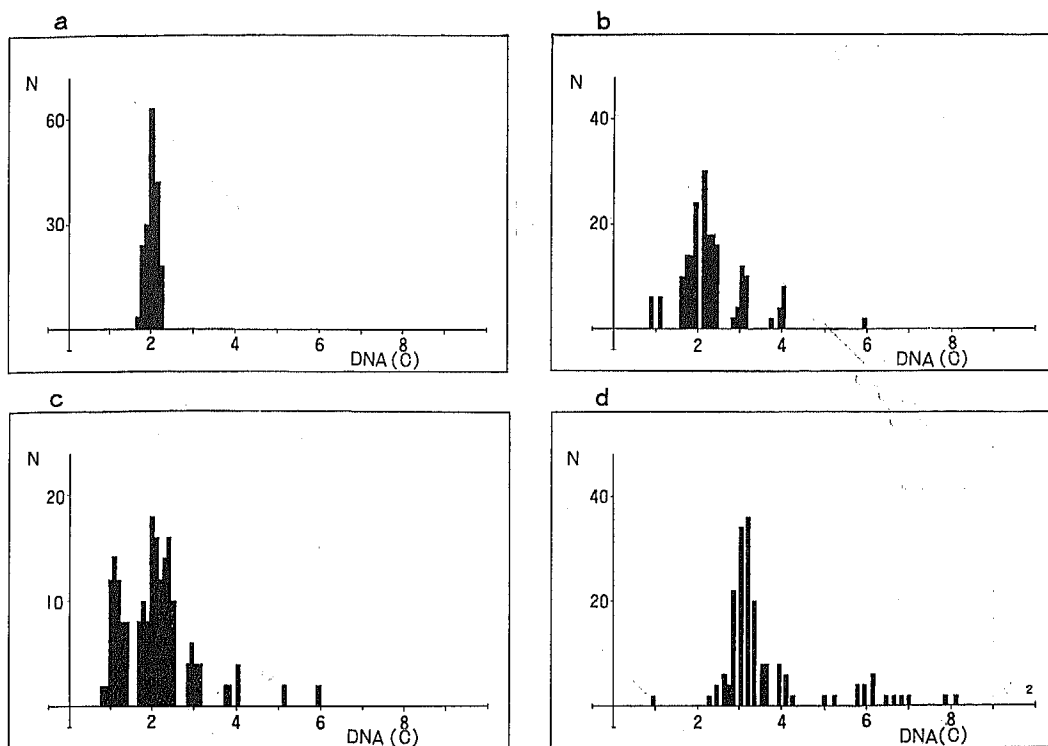


Fig. 1 Ploidy histograms (Human)

a. Normal liver b. Liver cirrhosis & HCC c. Liver cirrhosis & HCC d. HCC

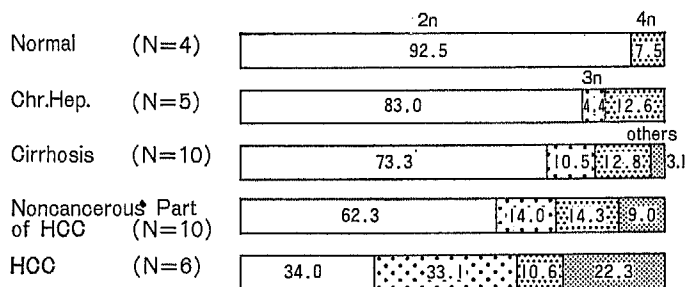


Fig. 2 Proportion of ploidy classes of hepatocyte nuclear DNA content in chronic liver diseases (isolated hepatocyte)

Ⅲ 成 績

A ヒト慢性肝疾患肝細胞 DNA 量について

1 分離肝細胞標本の検討

正常肝, 肝硬変, 肝癌非癌部硬変肝, 肝癌部のそれぞれ1例ずつの ploidy histogram を Fig. 1 に示した。また, Böhm と Sandritter の方法⁷⁾でそれぞれ

の ploidy histogram より ploidy を display し集計したグラフを Fig. 2 に示した。正常肝においては1核細胞は90%以上が diploid で占められており, 少数の tetraploid をみるのみであった。組織学的に慢性肝炎を示した症例では, 次に述べる肝硬変例と正常肝の中間の pattern をとることが多く, diploid の減少傾向と tetraploid の増加傾向が認められた。肝

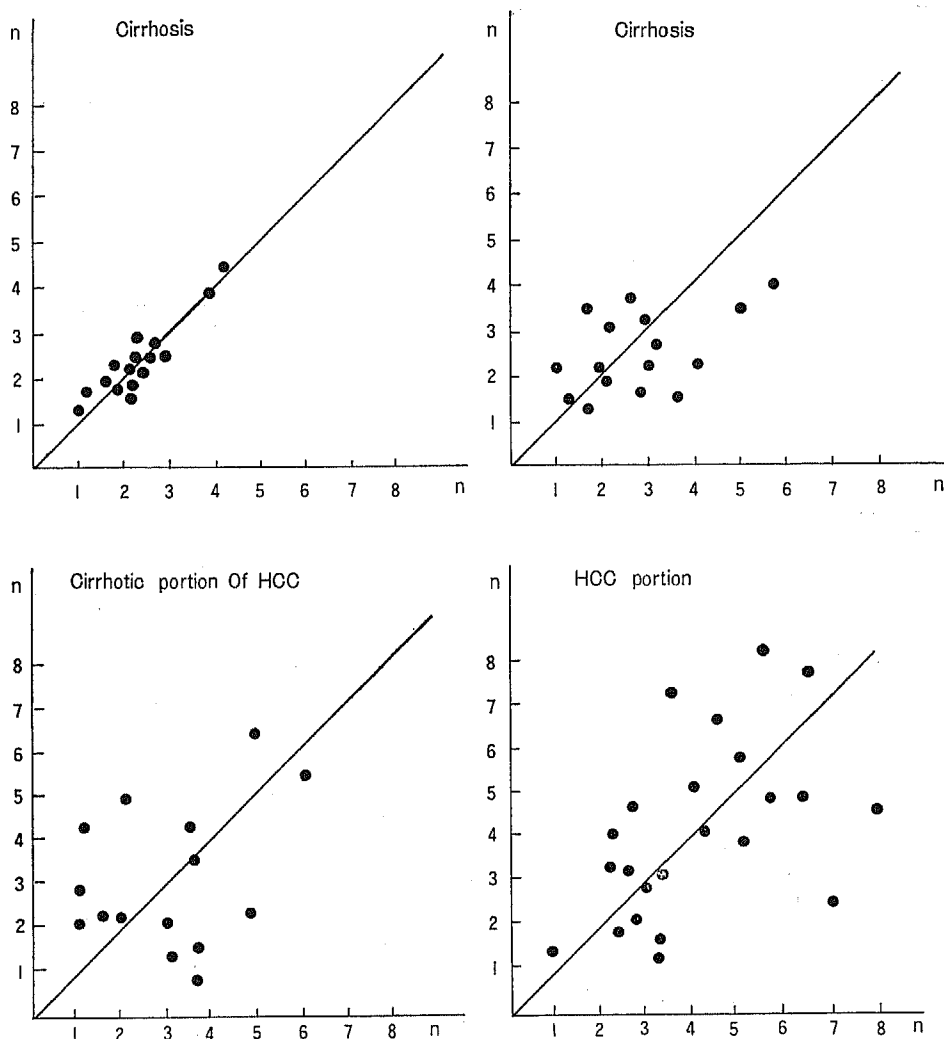


Fig. 3 Correlation of paired nuclear DNA contents in binucleate cells

硬変例（臨床的に肝癌を伴わない）では慢性肝炎とほぼ同様の pattern を示したが、一部の症例においては diploid の減少と tetraploid の増加、DNA 量 $3n$ と考えられる triploid の出現および少数の octaploid などが認められた。肝癌非癌部硬変肝では diploid の比率は約 62% と減少し、triploid, tetraploid, および図では others として示した $6n$, $8n$ など polyploid cells の比率が増加していた。肝癌部では腫瘍細胞の DNA 量は主に $2n \sim 4n$ の位置を占め、 $5n \sim 6n \sim 7n \sim 8n$, さらに feulgen DNA 量が $10n$ を越え scale out するような巨大核も出現し、ploidy histogram は広

範不規則な分布を呈した。

一方 2 核細胞については対核の DNA 量の差異を検討した成績を Fig. 3, 4 に示した。肝硬変の一部および肝癌非癌部硬変肝では対核の DNA 量の差が著しい傾向を示した。Fig. 3 は 2 核細胞の対核の一方を縦軸に他方を横軸にとりその分布を表わしたものであるが、組織学的に同程度の肝硬変でも対核の DNA 量がほぼ等しい症例と異なる症例がみられた。肝癌部 2 核細胞では、対核の DNA 量はそれぞれの量の増加傾向とその差がより著しい分布を示した。Fig. 4 に feulgen DNA 量の大きい核と小さい核の比 G/L

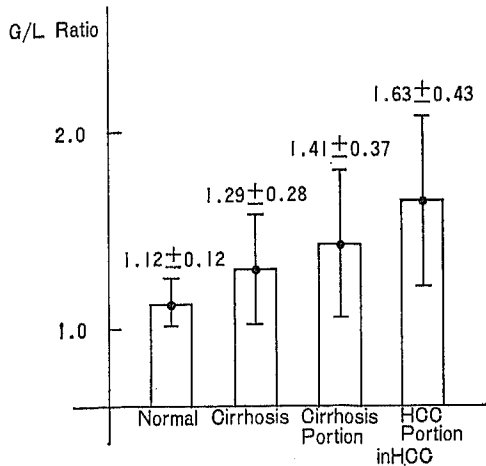


Fig. 4 Ratio of paired nuclear DNA contents in binucleate cells in cirrhosis and HCC (mean ± SD)

(Greater/Lesser Ratio) について, 正常肝, 肝硬変, 肝癌非癌部硬変肝, 肝癌部のそれぞれにおける成績を示した。推計学的に各疾患の間に有意差は認めないが, 慢性肝疾患ではその病態の進展につれて2核細胞対核DNA量の変異が著しくなる傾向がみとめられた。

2 組織切片標本の検討

厚さ12~13 μ mの厚切切片を用いた feulgen DNA 染色標本について測定した ploidy histogram を分離標本の場合と同様に display し集計したグラフを Fig. 5 に示した。慢性肝疾患の進展に伴い, diploid の減少 tetraploid の増加, triploid の出現とその増加傾向, polyploid の増加がみられる点で, 分離細胞標本での成績 (Fig. 2) と同様の傾向を示した。また, 各 ploidy ごとの比率も分離細胞標本での成績と類似していた。

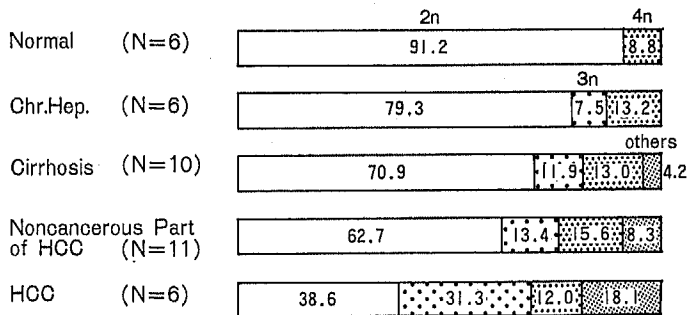


Fig. 5 Proportion of ploidy classes of hepatocyte nuclear DNA content in chronic liver diseases (liver tissue specimen)

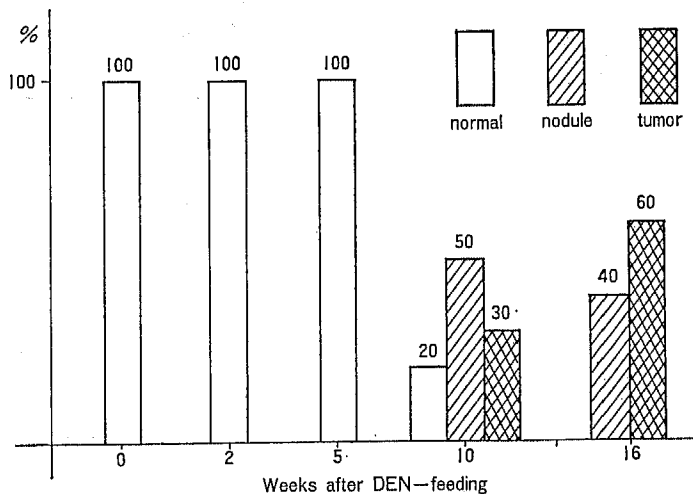


Fig. 6 Sequential histological changes in DEN-fed rats

DEN-feeding

	2n	4n	others
2WK	36.1	50.5	13.4
5WK	26.7	45.3	28.0
10WK	25.2	43.9	30.9
16WK	19.4	34.8	45.8
control			
0WK	41.5	49.0	9.5
2WK	38.1	52.2	9.7
5WK	37.2	51.4	11.4
10WK	39.9	49.4	10.7
16WK	36.5	50.6	12.9

Fig. 9 Proportion of ploidy classes of hepatocyte nuclear DNA content in DEN-fed rats (isolated hepatocytes)

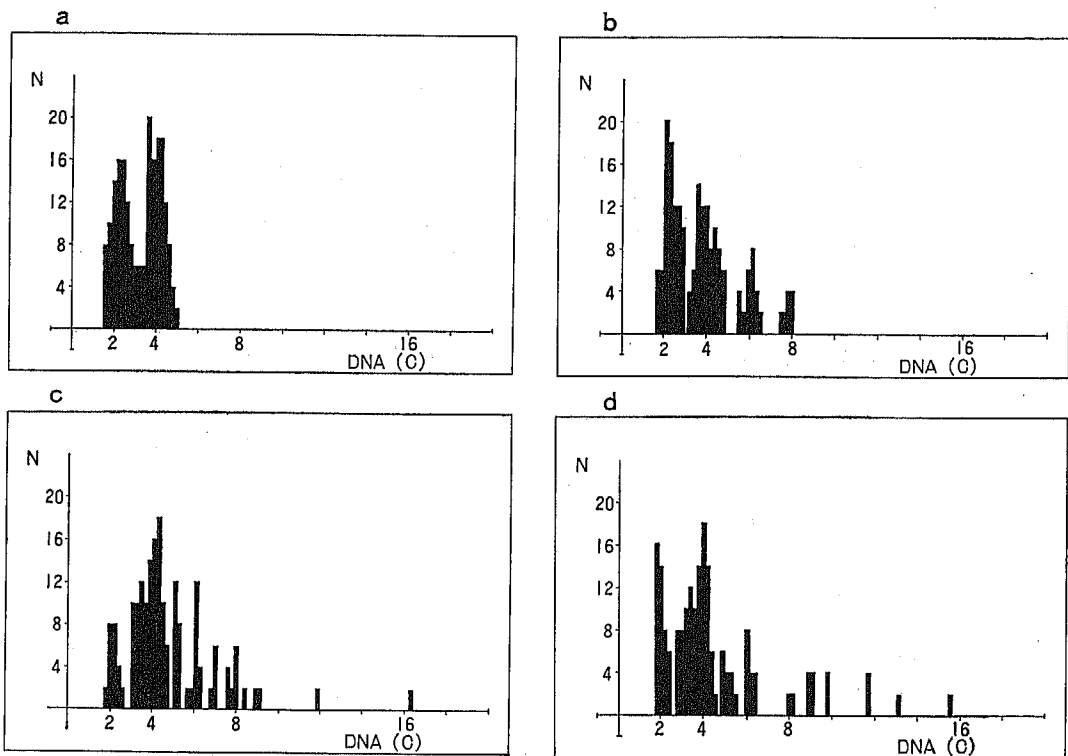


Fig. 10 Ploidy histograms (Rats)

- control
- DEN-fed 10W non-tumorous portion
- DEN-fed 16W non-tumorous portion
- DEN-fed 16W tumor portion

B DEN 投与ラット

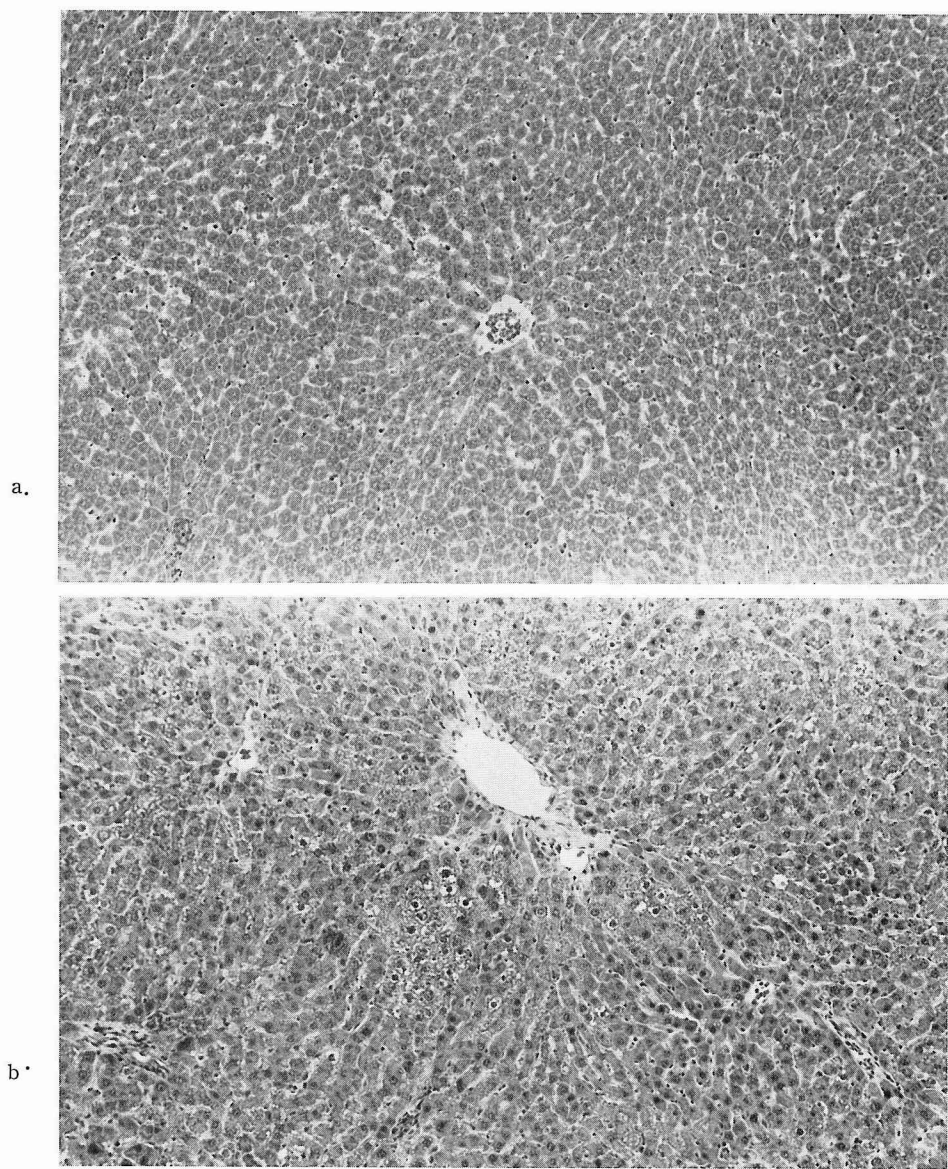
1 肝の肉眼的, 組織学的変化 (Fig. 6, 7, 8,)

DEN 投与後 2 週では, 肉眼的および組織学的に对照群と比較して特別な変化は認められなかった (Fig. 7-a)。5 週後には, 肝表面は平滑であるが, 对照群に比して白色調が強く浮腫性の外観を示していた。組織学的には数個の肝細胞集団の変性所見が散在性にみとめられた。 (Fig. 7-b) 10 週では, 10 匹中 8 匹に肝表面の凹凸と, 粟粒大の小結節形成がみとめられた。この結節部の組織所見では, 5 匹ではやや大型の肝細胞が主体の増殖性変化であったが, (Fig. 8-a) 残りの 3 匹には腫瘍がみとめられた。16 週では, 肝は对照群に比して著明に腫大しており肉眼的に小結節および直径 7~8 mm の大結節の形成がみとめられた。組織学的検索では 6 例に腫瘍をみとめた (Fig. 8-b)。

2 ラット肝 feulgen DNA 量

a 分離肝細胞標本の検計

对照群ラットの 1 核細胞 feulgen DNA 量は, Fig. 9 のごとく 16 週間の飼育期間中 diploid 40%前後,

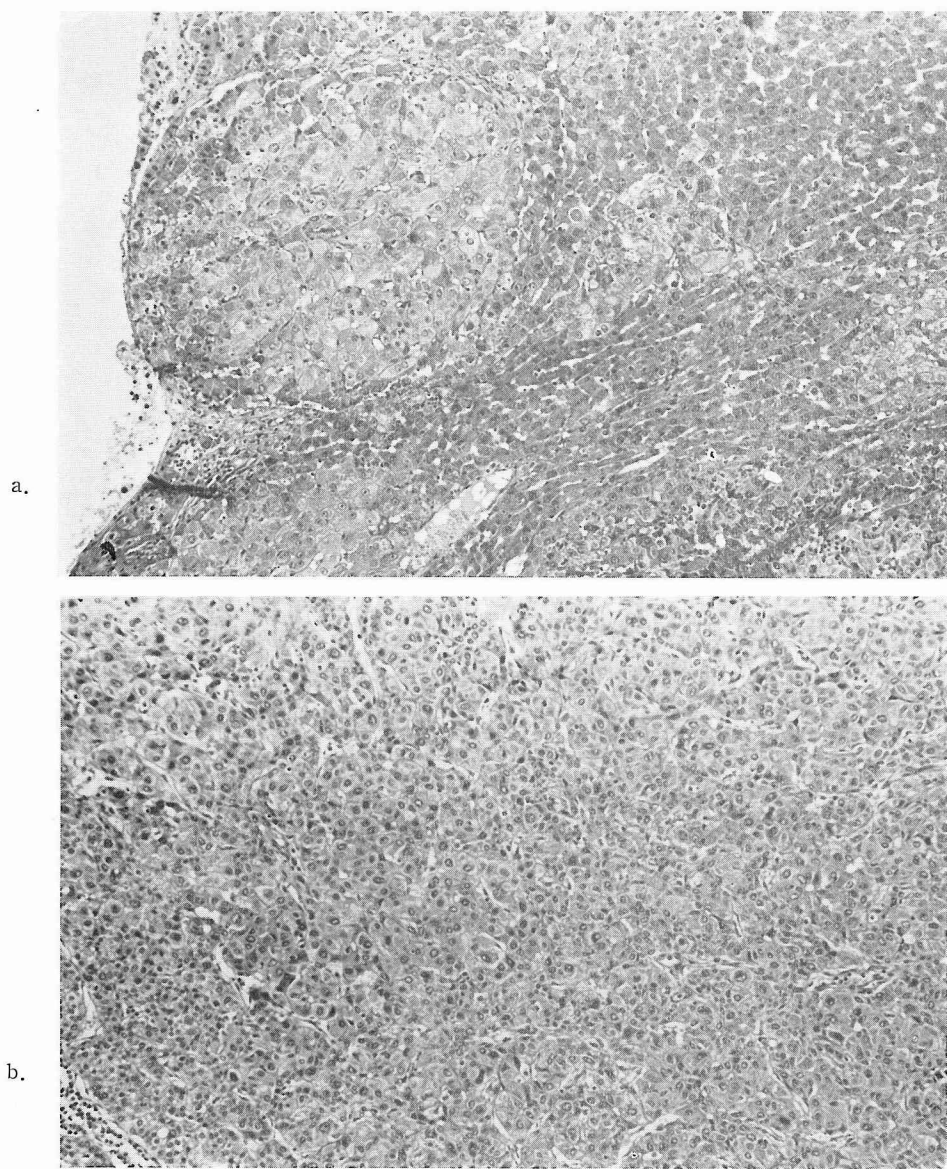


(H.E. staining, 100×)

Fig. 7 Histological findings in DEN-fed rats

a. DEN-fed 2w.

b. DEN-fed 5w.



(H.E. staining, 100×)

Fig. 8 Histological findings in DEN-fed rats
a. hyperplastic nodule (DEN-fed 10w)
b. liver cell carcinoma (DEN-fed 16w)

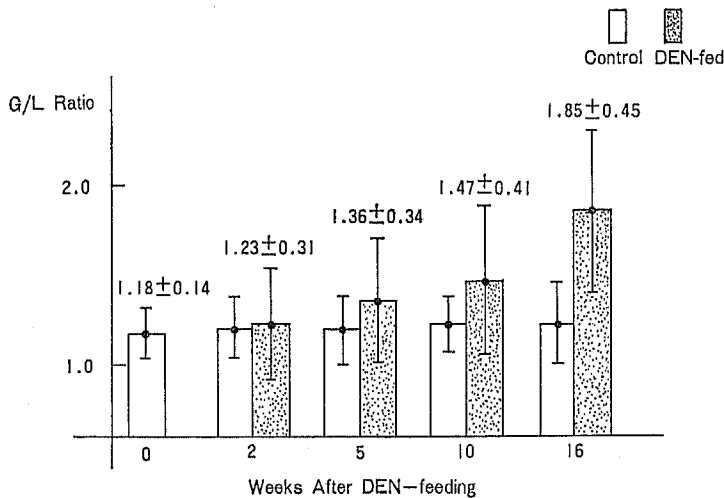


Fig. 11 Ratio of paired nuclear DNA contents in binucleate cells in DEN-fed rats (mean ± SD) (Greater / Lesser Ratio)

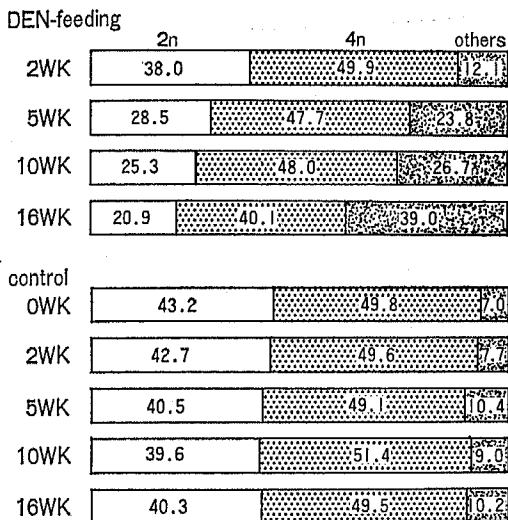


Fig. 12 Proportion of ploidy classes of hepatocyte nuclear DNA content in DEN-fed rats (liver-tissue specimen)

tetraploid 50%前後であり、とくに変化はみられなかった。これに対して DEN 投与群の非腫瘍部肝細胞では, triploid, hypodiploid, hyperdiploid, polyploid よりなる others で示した ploidy class が DEN 投与 2 週目よりすでに増加し、以後 5 週、10 週、16 週と次第に diploid が減少し、ほかの ploidy class の細胞の増加がみとめられた。Fig. 10 に DEN 投与前、お

よび投与後 10 週、16 週の非腫瘍部と 16 週の腫瘍部の ploidy histogram を例示した。対照群ラットの二核肝細胞は diploid と tetraploid より構成されているが、DEN 投与によりその ploidy pattern はしだいに広範不規則な分布を示した。16 週飼育例の非腫瘍部肝細胞の ploidy pattern は腫瘍部のそれとわけて類似の所見を示していた。

一方 2 核細胞における検討では、その対核の DNA 量の変異が DEN 投与により一層著明となる傾向がみとめられた (Fig. 11)。

b 組織切片標本の検討

12~13 μ m 厚切片における成績を Fig. 12 に示した。DEN 投与により diploid が減少し, triploid, polyploid の増加、各 ploidy の境界が不明瞭となる傾向がみとめられ、その傾向は分離標本でみとめられた所見とほぼ同様であった。

IV 考 察

1936 年 Caspersson が紫外線により顕微鏡下で細胞の核酸定量を試みたのを始めとして、顕微分光測光法は著しい進歩をとげ、DNA と特異的に結合する⁸⁾ feulgen 色素を用いた feulgen DNA 染色標本について、永田³⁾、藤田ら⁴⁾⁸⁾⁹⁾の染色法の改善、ならびに落射型顕微分光測光装置の開発、post-irradiation による蛍光の安定化等の研究⁵⁾⁶⁾により、その DNA 定量の信頼性が確立されている。一方、病理組織切片標

本における非特異蛍光の問題、細胞核の分断、重なりなどの問題の解決のため、測定にあたってはできるだけ分離細胞を用いることの有用性も強調されている¹⁰⁾。今回の研究において、以上の諸問題を落射型顕微蛍光測光装置オリンパス BH2-QRFL システムを使用することにより軽減し、肝生検および一部剖検によって得られた肝組織片を用いて、臨床的に前癌性病変と考えられている肝硬変症から肝癌が発生することの早期予知ができるか否かについて検討した。分離肝細胞塗抹標本による所見と厚切切片標本による所見での差異についても合わせて検討した。

ヒト慢性肝炎においてみとめられた polyploid cell の増加が肝硬変になるとさらに著明となり、肝硬変症の一部、肝癌非癌部硬変肝ではいわゆる hyperpolyploidization により不規則広範な ploidy pattern を示すという事実は、このような病態においては、正常肝と比較すると明らかに DNA 合成、肝細胞回転の異常が存在することを示唆すると考えられる。また adenomatous hyperplasia をみた症例に 4 年後肝癌が発症したとの臨床例の報告¹⁾と、発癌実験で癌出現前に過形成結節の出現をみる¹¹⁾点などから、病理学的な変化と肝細胞回転の関連¹²⁾も論じられている。北村ら¹³⁾¹⁴⁾は、5 例の慢性肝炎および肝硬変の持続ないし増悪過程で 2 回の経時生検肝組織において feulgen DNA 量を測定し、初回にみられた polyploid cell の比率が維持されるか増加したと報告している。さらに北村ら¹⁰⁾は、ヒトおよびラットの肝細胞の ploidy の加齢による変化を研究し、正常肝細胞で加齢により polyploid cell の増加を認め、さらに慢性肝疾患の進行過程では肝細胞の老化が加速されるのではないかとの仮説を述べている。今回の著者の研究では慢性肝炎から肝硬変への進展により、polyploid cell の増加がみられ、一方肝癌非癌部硬変肝においては、hyper ないし hypodiploid から triploid へかけての細胞がより高頻度に出現し、各 ploidy ごとの境界が比較的不明瞭になる成績を得た。また、ラットにおいても DEN 投与 10~16 週で各 ploidy の境界が不明瞭となる傾向を示し、ヒトと類似していた。この所見は、同じく DEN をラットに経口投与し、その経過中 overt liver tumor の出現以前に染色体数の異常がみられたとの報告¹⁵⁾¹⁷⁾と符号するものと考えられる。

一方各種肝疾患における ³H-Thymidine を用いた radioautography による肝細胞回転について、竹原¹⁸⁾、滝野ら¹⁹⁾は慢性肝疾患では、慢性肝炎活動型~

一部の肝硬変で肝の増殖活性は最も高いと報告している。また、肝癌非癌部硬変肝、肝癌発症前の肝硬変においても肝細胞の DNA 合成能が高いことも報告されている²⁰⁾。これを ploidy pattern から検討すると、いわゆる DNA 合成期 (S 期) に相当する ploidy class の増加として示されるはずであり、今回の成績で肝硬変~肝癌非癌部硬変肝で triploid の増加がみられたことは増殖活性の上昇を示唆する可能性がある。

2 核細胞の対核の DNA 量が慢性肝疾患の進展とともに変異する所見も肝細胞回転の異常をあらわすと考えられる。正常肝の 2 核細胞はほぼ等しい DNA 量を持つとされているが、今回の成績で肝硬変~肝癌非癌部硬変肝においてその変異の著しい点は、2 核細胞の場合も 1 核細胞の場合と同様に DNA 合成、肝細胞の分裂ないし肝細胞回転に質的な異常が生じていることが示唆された。

1 核細胞の個々の DNA 量が変異すること、2 核細胞の対核の DNA 量が異なる傾向を示すことの 2 点が慢性肝疾患の進展につれほぼ同時期に発生し増強することから、その発起始源が同じ可能性が強いと思われる。何らかの障害を受けた肝細胞が、その増殖刺激に対し、完全な DNA 複製ができないこと、染色体分離の不均衡が起こること、細胞分裂が行われない場合があることなどによって異常肝細胞が生ずると考えられる。佐藤と杉村²¹⁾は、癌化について initiation と promotion の 2 つの段階を想定し、DNA の面から次のように解釈している。すなわち正常細胞が何らかの原因によりその DNA が修飾、固定化され (initiation) さらに種々の因子の加重によって癌化の方向へ進展する (promotion) とする考えである。今回の成績でみとめられた肝硬変例の一部の肝細胞や、肝癌例の非癌部肝細胞における polyploid 化、2 核細胞対核の DNA 量の著しい相異は、これら疾患における肝細胞 DNA が修飾された状態を示唆しているものと考えられ、その意味での前癌性病変である可能性が推察される。

今回著者は分離肝細胞標本と組織切片標本の両者において、その ploidy histogram を作製し検討を行った。その結果 1 核肝細胞においては両者ともほぼ同様の所見を得られたことより ploidy histogram は通常の針生検で得られる肝組織量でも十分検討が可能であると考えられ、今後、肝硬変例で、肝癌が発生した症例と肝癌発生のみみられない症例における肝硬変時の組織について ploidy histogram の差がみられるか否か

を検討し, 肝癌発生の危険の高い肝硬変症のスクリーニングを行ってゆく予定である。

V 結 論

ヒトの慢性肝疾患と肝癌例, ならびにラットの実験的発癌過程における分離肝細胞および組織切片標本を用い, それらの feulgen DNA 量を検討し, 以下の結論を得た。

1 慢性肝炎, 肝硬変, 肝癌非癌部硬変肝で, 1 核肝細胞 DNA 量は病変の進展につれてしだいに polyploid cell が増加し, その histogram は広範な分布を呈し一部では肝癌部のそれに類似した。

2 肝硬変および肝癌非癌部では 2 核肝細胞の対核の DNA 量の変異がみられ, 肝癌細胞ではより著明であった。

3 DEN 投与によるラットの実験的発癌過程においても, DEN 投与期間の延長とともに肝細胞 DNA 量

の変異, 2 核細胞対核 DNA 量の相異の程度が次第に著明となり, 10週, 16週目に腫瘍の発生がみられた。

4 Feulgen DNA 染色は厚さ 12~13 μm の厚切組織切片標本を用いれば, 比較的簡便な操作で分離肝細胞標本とほぼ同様の所見を得ることができ, 臨床的なスクリーニング検査としては組織切片標本でも十分であると考えられた。

稿を終るにあたり, 終始御指導, 御校閲を賜りました信州大学第2内科古田精市教授に深く感謝の意を表わすとともに, 御助言を戴きました信州大学第1解剖学教室永田哲士教授, 御援助を戴きました信州大学第2内科小池ゆり子先生に厚く御礼申し上げます。

なお, 本論文の要旨は, 第79回日本内科学会総会(1982年4月東京), 第18回日本肝臓学会総会(1982年7月東京)において発表した。

文 献

- 1) 古田精市, 小池ゆり子, 長田敦夫, 清沢研道, 赤羽賢浩, 山村伸吉, 川原健治郎, 小松敬直, 中谷 均, 三浦正澄, 上條賢介, 村山伸介, 袖山 健, 宜保行雄, 小田正幸, 井内正彦: 肝癌発生の臨床病理学的研究—肝炎・肝硬変からの追跡例44例を中心に—. 肝臓, 20: 839-851, 1979
- 2) 太田和雄, 高本 滋: 細胞回転と制癌—化学療法の立場から—. 癌の臨, 27: 1499-1506, 1981
- 3) 永田哲士: 顕微分光測光法の理論と応用. 信州医誌, 15: 148-157, 1966
- 4) Fujita, S.: DNA cytofluorometry on large and small cell nuclei stained with pararosaniline feulgen. Histochemie, 36: 193-199, 1973
- 5) Fujita, S. and Fukuda, M.: Irradiation of specimens by excitation light before and after staining with pararosaniline feulgen: A New Method to Reduce Non-specific Fluorescence in Cytofluorometry. Histochemistry, 40: 59-67, 1974
- 6) Fukuda, M., Nakanishi, K., Sawamura, I. and Fujita, S.: Standardization of the post-irradiation method to eliminate primary fluorescence in cytofluorometry. Histochemistry, 52: 119-127, 1977
- 7) Böhm, N. and Sandritter, W.: DNA in human tumors: A cytophotometric study. Curr Top Pathol, 66: 151-219, 1975
- 8) 藤田哲也: 顕微分光測光法. 医学のあゆみ, 82: 251-256, 1972
- 9) 藤田哲也, 福田 優: 核酸, DNA の組織化学. 武内忠男, 小川和朗, 森 富(編), 新組織学, pp. 469-500, 朝倉書店, 東京, 1975
- 10) 北村 収, 日高 硬, 芦原 司, 竹岡 成, 香川恵造, 奥田健治, 高橋示人, 滝野辰郎: ヒトおよびラットの肝細胞におけるプロイディの加齢による変化—Feulgen-DNA 顕微分光測光法による解析—. 日消会誌, 76: 223-230, 1979
- 11) Farber, E.: Hyperplastic liver nodules. Methods in Cancer Research, 7: 345-375, 1973
- 12) 奥田健治, 香川恵造, 北村 収, 富増寛夫, 高橋示人, 滝野辰郎, 芦原 司: Diethylnitrosamine 肝癌発生過程の肝細胞過形成領域における細胞増殖の解析. 日消会誌, 78: 677-683, 1981
- 13) 北村 収, 芦原 司, 竹岡 成, 香川恵造, 奥田健治, 高橋示人, 滝野辰郎, 増田正典: 慢性肝炎進展過程における肝細胞 ploidy pattern の解析, 肝臓, 18: 202, 1977
- 14) Ashihara, T., Kitamura, O., Takeoka, O., Kagawa, K., Okuda, K., Takino, T. and Fujita, S.: Ploidy patterns of human liver cells in chronic liver diseases. Gastroenterology, 73: 1211,

1977

- 15) Hitachi, P.M., Yamada, K. and Takayama, S. : Diethylnitrosamine-Induced chromosome changes in rat liver cells. *J Natl Cancer Inst*, 53 : 507-516, 1974
- 16) Grover, S. and Fischer, P. : Cytogenetic studies in Sprague-Dawley rats during the administration of a carcinogenic nitroso compound —Diethylnitrosamine. *Eur J Cancer* ,7 : 77-82, 1971
- 17) Gerzeli, G. and Barni, S. : Changes in liver cells ploidy of young rats following isoprenaline treatment. *Cell Tissue Kinet*, 9 : 267-272, 1976
- 18) 竹原謙三 : 肝障害時における肝構成細胞の核酸代謝に関する研究. 第1編 肝疾患臨床例における観察. *日消会誌*, 72 : 527-535, 1975
- 19) 滝野辰郎, 奥田健治, 北村 収, 増田正典, 芦原 司 : 肝細胞の増殖動態からみた肝炎の経過と予後—³H-Thymidine ARG 法による—. 第7回大山シンポジウム, pp. 161-173, 中外医学社, 東京, 1976
- 20) Koike, Y., Suzuki, Y., Nagata, A., Furuta, S. and Nagata, T. : Studies on DNA content of hepatocytes in cirrhosis and hepatoma by means of microspectrophotometry and radioautography. *Histochemistry*, 73 : 549-562, 1982
- 21) 佐藤茂明, 杉村 隆 : 発癌機構. 杉村 隆・山村雄一 (編), 岩波講座現代生物科学15, 癌, pp. 17-34, 岩波書店, 東京, 1976

(57.8.12 受稿)