

# Pathological Significance of Mallory Body Formation in Hepatocellular Carcinoma : Feulgen-DNA Cytophotometric and Morphometric Analysis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8058">http://hdl.handle.net/2297/8058</a>

## 肝細胞癌に出現するマロリ体の病理学的意義：フォイルゲン-DNA 顕微蛍光測光法および組織計測法による検討

金沢大学医学部病理学第二講座（主任：中沼安二教授）

細 正 博

（昭和63年8月19日受付）

マロリ体は肝細胞、肝細胞癌に出現する特異な細胞内硝子体であり、最近、肝細胞癌発生との関連性が注目されている。今回、肝細胞癌内のマロリ体の意義を検討するため、マロリ体陽性肝細胞癌（肝癌）22例を用い、肝癌細胞核のDNA量をフォイルゲン顕微蛍光測光法で、また、肝癌細胞の形態像を組織計測法により検索した。正常肝と肝硬変再生結節の肝細胞のDNAヒストグラムはディプロイドパターンを示した。一方、マロリ体陽性肝癌は、同陰性肝癌や非癌部肝細胞に比べて、核DNA量が有意に多く、DNAヒストグラムでは、ハイパープロイド化、アニュープロイド化が顕著であった。同一症例でマロリ体が密在する癌組織では互いに離れていても、マロリ体陽性肝癌細胞のDNAヒストグラムは同一であり、マロリ体陽性肝癌は単クローン性に発生、増殖した可能性が示唆された。切片上で核および、胞体の大きさを組織計測により求めると、核の面積、胞体の面積ともに、マロリ体陽性肝癌細胞が、陰性肝癌細胞よりも大きく、特に胞体の大型化が顕著であった。核/胞体比は、マロリ体陰性肝癌では、正常肝細胞と比べて有意に大きかったのに対し、同陽性肝癌では正常肝細胞と同じ程度であった。以上、マロリ体陽性肝癌には、共通した特徴が見られ、クローナルなプロイディパターンを示す症例もあり、マロリ体形成が肝癌の1つの遺伝形質である可能性が示唆された。

---

**Key words** hepatocellular carcinoma, Mallory body, Feulgen cytophotometry, morphometry

---

マロリ体は、肝細胞内に出現する境界不明瞭な硝子体であり<sup>1)</sup>、電顕的には、中間径フィラメントが主成分をなしている<sup>2)</sup>。1911年に初めてマロリ体が記載されて以来<sup>3)</sup>、アルコール性肝障害（特に、アルコール性肝炎）に特徴的な所見とされて来たが、近年、原発性胆汁性肝硬変やWilson病でも高率にみられることが明らかになっている<sup>4)</sup>。マロリ体はまた、肝細胞癌（肝癌）にも出現することが知られている<sup>5)</sup>。最近、Frenchら<sup>6)</sup>、Borenfreundら<sup>7)</sup>は、実験肝癌系を用いた研究により、マロリ体を肝癌にみられる遺伝形質の1つとして捉えており、マロリ体が前癌段階で既に出現することを報告している。一方、Nakanumaら<sup>8)-11)</sup>は、ヒト肝癌の全割切片を作製し、マロリ体陽性肝癌細胞をマッピングし、マロリ体陽性癌細胞がしばしば集団性に出現することから、肝

癌内のマロリ体はヒトにおいても、1つの遺伝形質ではないかと述べている。しかし、肝癌とマロリ体形成との関連に関して、いまだ不明な点が多く残されている。

さて、細胞核のDNA量を細胞単位で測定する顕微蛍光測光法は、癌細胞のDNAヒストグラムの決定、癌細胞の生物学的性状、増殖動態の解明に応用され、最近では、前癌病変と癌との関連性についての研究<sup>12)</sup>、さらには癌の悪性度の評価、臨床的予後の判定等に有効であるとの報告がなされている<sup>13)-18)</sup>。また、切片上で核や胞体の面積を測る組織計測法は、形態学的変化を数値化し、組織所見の特徴を客観的に捉える一助として、広く病理学の領域で使用されている<sup>19)-22)</sup>。

今回著者は、肝癌とマロリ体形成との関連性、ま

---

Abbreviations: C, chromosomal complement; HE, hematoxylin and eosin; 肝癌, 肝細胞癌。

たマロリ体を持つ肝癌細胞の生物学的性状を明らかにするため、ヒト肝癌を用い、肝癌細胞の核 DNA を顕微蛍光測光により求め、また肝癌細胞の組織計測を行なった。

## 材料および方法

### I. 材 料

昭和47年から昭和62年までに、金沢大学医学部第二病理学教室で剖検された肝細胞癌は193症例である。これらの症例の組織標本を検索したところ、49例(25.4%)で肝癌内マロリ体が陽性であった。なお、マロリ体の定義は Norkin ら<sup>2)</sup>に従った。即ち、細胞内に見られる好酸性の周辺部不明瞭な封入体で、芋虫状あるいは棍棒状のものをマロリ体とした。マロリ体はアザン・マロリ染色で青あるいは深紅色に染まるものが多かったが、中心部赤、周辺部青に染まるものもあった。

これら49症例において、癌部が1~20個、非癌部から1~5個のホルマリン固定後パラフィン包埋ブロックが保存されていた。これら49例の内17例では、後述のフォイルゲン染色の染色性が不十分で、顕微蛍光測光が不可能であり、今回の顕微蛍光および組織計測の検索対象から除外した。これらのフォイルゲン染色不成功例の多くはホルマリン固定が長期間に及んだものであった。対照として、上述の肝癌例の非癌部肝硬変部の再生結節と、対象例とほぼ同様の年齢分布を示す正常剖検肝9例を用いた。

これら症例のパラフィンブロックより、厚さ5 $\mu$ と12 $\mu$ の連続切片を交互に作成し、5 $\mu$ の切片にはヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin and eosin, HE)染色とアザン・マロリ染色を行なった。12 $\mu$ の切片は、フォイルゲン染色に供した。なお、12 $\mu$ の厚さの切片では、切片中での核の重なりや核の切断が少ないとされている<sup>12)</sup>。

### II. 方 法

#### 1. 肝癌組織内でのマロリ体の分布

HE 標本にて、肝癌内のマロリ体陽性細胞の分布を観察した。そして、Nakanuma ら<sup>9)</sup>の分類に従い、び漫型、集簇型、散布型の3型に分類した。つまり、i) び漫型：マロリ体を持つ多数の癌細胞が、癌組織内にび漫性に密在して認められるもの。ii) 集簇型：マロリ体を持つ多数の癌細胞が、癌組織内の一カ所ないし多発性に集簇巣を形成するもの(図1)。iii) 散布型：マロリ体を持つ少数の癌細胞が癌組織内に不規則に散在し、集簇していないもの、とした。

#### 2. フォイルゲン顕微蛍光測光法

フォイルゲン染色は、Koike ら<sup>12)</sup>の方法に従って行った。即ち、パラフィン切片を、型の如くキシレン-アルコール系列で脱パラフィンし、水道水中で水洗した。なお、プレパラートは無蛍光のものを使用した。その後、37°C 1N 塩酸中で1分間、60°C 1N 塩酸中で7分間、37°C 1N 塩酸中で1分間反応させ、DNA の加水分解を行った。DNA が加水分解することにより、プリン基が遊離してチミン酸を生じ、これが Schiff 試薬中のパラローズアニリンと反応して蛍光を発することが知られているためである<sup>23)</sup>。次いで、蒸留水で洗浄し、コールド Schiff 試薬(WAK-O 純薬、大阪) 30ml+Sorensen のグリシン緩衝液(pH 2.28) 870ml+15%メタ重亜硫酸ナトリウム溶液100ml を混合した染色液中に、室温で4時間反応させた。その後、Sorensen のグリシン緩衝液(pH 2.28) と15%メタ重亜硫酸ナトリウム溶液を9:1で混合した洗浄液で、10分ずつ4回洗浄し、型の如く、水洗、脱水、封入した。その後、藤田<sup>24)</sup>の方法に従い、非特異蛍光を減弱あるいは消失させるため、晴天下の自然太陽光下に約3日間(冬期を除く)、または市販の水銀灯(HB-1048HB、東芝電材、東京)下で約1週間、曝光した。なお、フォイルゲン染色標本を、光学顕微鏡下で観察すると、核は選択的に赤紫色に染まったが、間質の膠原繊維も淡く染まった。

顕微蛍光測光は、落射式蛍光顕微鏡(Standard 18, ZEISS 社、西独)に、顕微測光装置(Nikon P1, 日本光学、東京)を取り付けて行なった。即ち、水銀ランプ光源から、励起フィルター-G(IF 500~550, Nikon, 東京)および吸光フィルターを通して、緑色励起光を選択し、ダイクロイックミラー(DM 575, Nikon, 東京)を経てフォイルゲン染色標本に照射した。蛍光顕微鏡下で見ると、核は明らかな赤色蛍光を発した(図2)。核から放出される赤色蛍光を、吸収フィルター(ピーク値 620nm, Nikon, 東京)を通して測光した。なお、顕微測光装置(Nikon P1, 日本光学、東京)では、1個の核の測光に際し自動的に10回の測光を繰り返し、その平均測光値が表示されるシステムになっている。測光に当たっては、プレパラートを手で走査し、マロリ体を有している肝癌細胞、マロリ体を持たない肝癌細胞および、非癌部の再生結節や正常肝の肝細胞を、それぞれ各例につき200個ずつ測光した。なお、変性、壊死に陥った細胞や、切片上に核の一部しか入っていないと考えられる細胞、それに多核の細胞は、測光の対象から除外した。また、癌細胞と、それ以外の内皮細胞や間葉系細胞等の細胞との区別は、

蛍光顕微鏡下で容易であった。ついで測光データを、独自に開発したプログラムで、パーソナルコンピュータ (PC-9801VX2, NEC, 東京) を用い、解析した。

フォイルゲン染色標本では、光顕および蛍光顕微鏡下でマロリ体を明確に識別できなかった。そこで、マロリ体を持つ癌細胞の DNA 測光を以下の如く行った。即ち、集簇型とび漫型として分類された肝癌22例を用い、マロリ体が密在して出現している部

位を HE 染色標本で確認し、連続するフォイルゲン染色標本上の対応する部にて、癌細胞の核の蛍光を測光した。また、マロリ体を持たない癌細胞の蛍光測光についても同様に、5  $\mu$  の HE 染色標本で、癌部にマロリ体がないことを確認し、連続するフォイルゲン染色標本上にて、マロリ体の陰性肝癌細胞の核 DNA を測光した。しかし、検索した22例中8例では、マロリ体陰性癌組織を特定できなかったため、マロリ体陰性の癌組織の蛍光測光は、残りの12例で

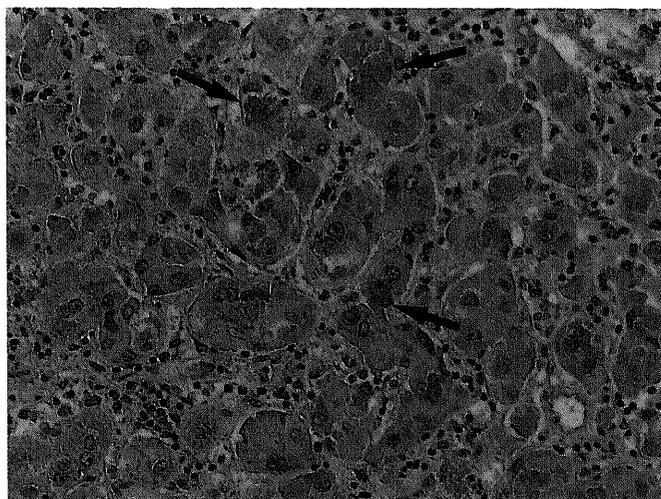


Fig.1. Mallory bodies (arrows) are found in almost all carcinoma cells. Hepatocellular carcinoma. (H & E,  $\times 200$ )



Fig.2. Nuclei shed red fluorescence. Feulgen stain of hepatocellular carcinoma. (Feulgen,  $\times 400$ )

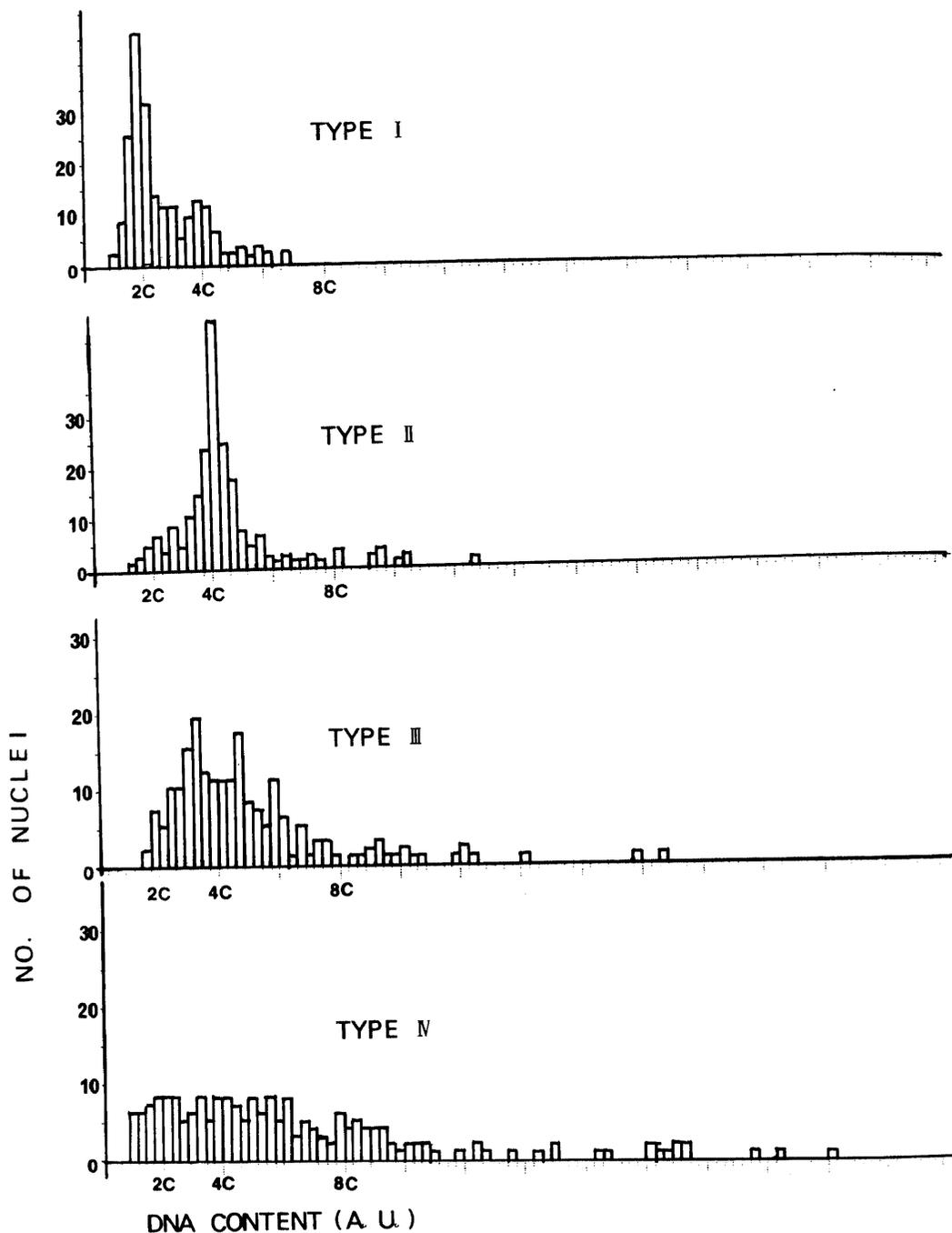


Fig. 3. Types of nuclear DNA histogram. Type I, diploid pattern (case 10, Mallory body negative area). Type II, hyperploid pattern (case 21, Mallory body negative area). Type III, narrow aneuploid pattern (case 4, Mallory body negative area). Type IV, wide aneuploid pattern (case 4, Mallory body positive area).  $p < 0.05$  vs. Mallory body-positive and -negative areas by  $\chi^2$  test.

行なった

なお、リンパ球、肝硬変部肝細胞、肝癌細胞の核の大きさにかんがひのばらつきがあるため、可変スポット (Nikon, 東京) を使用して、測光面積を調節し、非特異蛍光による背景ノイズの影響を最小限にした。しかし、マロリ体を持つ癌細胞の2例 (症例8と9) では、背景のノイズが強く、十分な精度のデータを得られなかったため、検討の対象から外し、蛍光測光の検索は20例で行なった。

蛍光測光のコントロールとして、各症例毎に組織中のリンパ球を30~50個を選び、その核を測光し、最頻値 (modal value) を diploid chromosomal complement (2C) として用いた。フォイルゲン染色の染色性や減光処置の程度によって、症例毎に核が発する蛍光に強弱があるため、核 DNA 量の測定データの数値は相対的なものとなる。そのため、核 DNA 量の測定値を、各標本のリンパ球より求めた2Cの値で除算し、各々を仮の共通単位系 (A. U. 単位=arbitrary unit) で表わし、症例間相互の比較を行なった。

まず、核 DNA の測定値の平均値と標準偏差を求めることにより、症例間の比較、およびマロリ体陽性肝癌部と同陰性肝癌部の核 DNA 量の比較を行なった。また、症例毎に、あるいは測定部位毎に、縦軸に核の個数、横軸に各々の核の DNA 量の測定値をとって、DNA ヒストグラムを作成した。この DNA ヒストグラムを、Sugimachi ら<sup>10)</sup>の分類を参考にして次の4型に分類した (図3)。I型 (ディプロイドパターン) は、2C付近に明瞭なピークを持ち、4Cを越える細胞が殆どないもの。II型 (ハイパープロイドパターン) は、2C以上の部分に明瞭なピークを持つもの。III型 (狭いアネupロイドパターン) は、2C以上に低いピークがあり、比較的広い分散幅を示し、かつプロイディパターンから外れた量のDNAを持つ細胞が増加するもの (アネupロイド化)。IV型 (広いアネupロイドパターン) は、ピークがはっきりせず、8Cを越えて広い分散幅を示すものとした。

### 3. 組織計測法

上述の肝癌22例と対照正常肝9例の5 $\mu$  HE染色切片を用い、細胞、胞体、核の面積 ( $\mu^2$  単位) の計測を行い、さらに核/胞体比を算出した。核/胞体比については、核の面積と胞体のみの面積 (核の面積を含まない) の比とした。計測に際し、画像解析装置 (NEXUS 6400, 柏木研究所, 東京) およびパーソナルコンピュータ (PC-9801VX2, NEC, 東京) を用い

た。画像解析装置の操作は独自に開発したプログラムを用いて行なった。即ち、顕微鏡にビデオカメラ (BK5001, 日立電子, 東京) を取り付け、画像解析装置に画像を取り込み、マロリ体を持つ癌細胞、マロリ体陰性癌細胞をそれぞれを識別した。そして、核および胞体の正中付近で切れていると推定される細胞の核および胞体の輪郭をディジタイザーにて手動でなぞり、それぞれの面積を測定した。なお、多核細胞は、今回の検索の対象とはせず、変性や壊死に陥った癌細胞も計測の対象からできるだけ除外した。対照の正常肝9例と肝癌の非癌部肝硬変部の肝細胞に関しても、同様に計測を行なった。

### 4. 肝癌の分化度

肝癌を、Edmondson ら<sup>11)</sup>に従い、癌細胞の核/胞体比を中心にI~IV型に分類した。

### 5. 推計学的検討

平均値の比較は、pooled t-test あるいは、Welch法により行い、また亜集団の分布の比較は $\chi^2$ で行い、いずれも危険率5%以下で有意差ありと判断した。

## 成 績

### I. 肝癌内でのマロリ体の分布

肝細胞癌剖検例32例の内訳を表1に示す。年齢は43才から85才に分布しており、その平均は64.1才であった。男性が23例、女性9例であり、32例中30例で非癌部に肝硬変を認めた (表1)。肝硬変の成因として、アルコール性が11例、B型肝炎ウイルスによるもの3例、アルコール+B型肝炎ウイルスによるもの1例、残りの15例は、非A非B型肝炎ウイルスが成因と考えられた。なお、肝癌内マロリ体出現と飲酒との間に、密接な関連性はなかった。

これら症例の癌組織内でのマロリ体陽性癌細胞の分布を検索したところ、び漫型が6例、集簇型 (図1) 16例、散在型10例であった (表1)。

### II. 肝癌細胞、肝細胞の核 DNA 量

び漫型および集簇型を合わせた22例中20例で、DNA 蛍光測光を行なった。非癌部肝硬変の肝細胞の核 DNA 量の平均測定値 $\pm$ 標準偏差は $1.33 \pm 0.57$  A. U. (1A. U.=2C) であり、正常肝の肝細胞では $1.38 \pm 0.94$  A. U. であった。一方、マロリ体陽性肝癌20例の核 DNA 量は、 $2.70 \pm 1.60$  A. U.、同陰性肝癌12例の核 DNA 量は、 $2.15 \pm 1.20$  A. U. であった。マロリ体陽性、陰性肝癌のいずれにおいても、その核 DNA 量は正常肝の肝細胞、非癌部肝硬変の肝細胞の核 DNA 量より多く ( $P < 0.01$ )、また、マロリ体陽性肝

癌は、陰性癌細胞に比べて有意に高値を示した ( $P < 0.01$ )。また、各症例毎に個別に見ると、表 2, 図 4 に示す如く、12例中 9例 (75%) において、マロリ体陽性肝癌が、同陰性肝癌よりも有意に高値の DNA 量を示した。

DNA ヒストグラムによる検討では、正常肝 9例では、すべて 2C に明瞭なピークを持つディプロイドパターンを示し、4C 以上の DNA 量を持つ核は殆どみられなかった (I 型) (図 5 上)。肝癌 20例の非癌部再生結節の肝細胞の DNA ヒストグラムでも、全例で

2C に明瞭なピークを持つディプロイドパターンを示し、4C を越える DNA 量を持つ細胞は、正常肝よりもむしろ少なかった (I 型) (図 5 下)。

一方、肝癌細胞の DNA ヒストグラムは多様であり、I 型~IV型の各型が見られた (図 3)。各々の出現頻度を求めると、マロリ体陽性肝癌部では、II型 20例中 7例 (35%)、III型 6例 (30%)、IV型が 7例 (35%) であり、I 型が 1例も認められなかった。マロリ体陰性肝癌部では、I 型が 12例中 3例 (25%)、II型 6例 (50%)、III型 2例 (16.7%) であり、IV型が

Table 1. Main features of 32 cases of Mallory body positive hepatocellular carcinoma.

Case No.	Age	Sex	HCC Macro	Grade of HCC (Edmonson <sup>25</sup> )	LC	Suspected Etiology of LC	Distribution of Mallory body <sup>9)</sup>
1	46	F	Nodular	III	+	B	Diffuse
2	68	M	Nodular	II	+	NANB	Diffuse
3	45	M	Nodular	II	+	NANB	Diffuse
4	57	M	Massive	II	+	NANB	Diffuse
5	53	M	Nodular	II	+	Alco	Diffuse
6	58	M	Nodular	III	+	Alco	Diffuse
7	68	F	Small*	II	+	NANB	Cluster
8	73	M	Nodular	II	+	NANB	Cluster
9	64	M	Nodular	II	+	Alco	Cluster
10	60	M	Nodular	III	+	Alco	Cluster
11	85	M	Nodular	II	+	NANB	Cluster
12	75	M	Nodular	II	+	Alco	Cluster
13	72	M	Nodular	II	+	Alco	Cluster
14	57	M	Small*	II	+	Alco	Cluster
15	68	M	Nodular	III	+	B	Cluster
16	70	F	Nodular	II	+	B+Alco	Cluster
17	60	F	Nodular	II	+	B	Cluster
18	74	M	Nodular	III	+	Alco	Cluster
19	59	M	Nodular	II	+	NANB	Cluster
20	43	M	Nodular	II	+	Alco	Cluster
21	60	F	Nodular	II	+	NANB	Cluster
22	60	M	Nodular	II	+	NANB	Cluster
23	66	M	Nodular	II	+	NANB	Sparse
24	65	M	Massive	III	+	Alco	Sparse
25	64	F	Massive	III	+	NANB	Sparse
26	65	M	Massive	III	+	NANB	Sparse
27	75	M	Massive	III	+	Alco	Sparse
28	71	F	Massive	III	+	NANB	Sparse
29	57	M	Nodular	III	-		Sparse
30	57	F	Nodular	II	+	NANB	Sparse
31	74	F	Nodular	II	+	NANB	Sparse
32	82	M	Nodular	II	-		Sparse

No., number; M, male; F, female; HCC, hepatocellular carcinoma; LC, liver cirrhosis; NANB, nonA nonB virus; B, hepatitis B virus; Alco, alcohol; \*, diameter of the tumor < 2cm.

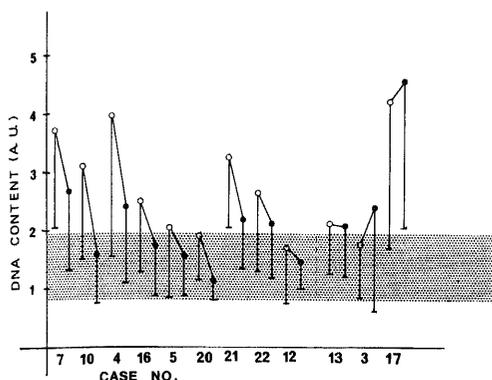


Fig. 4. Nuclear DNA content ( $M \pm S. D.$ ) of Mallory body-positive and -negative hepatocellular carcinoma. Half tone, DNA content of non-neoplastic hepatocytes from liver cirrhosis ( $M \pm S. D.$ ). ○, Mallory body positive areas. ●, Mallory body negative areas. DNA content in Mallory body-positive areas is greater than Mallory body-negative areas in case 4, 5, 7, 10, 12, 16, 20, 21, and 22.

1例 (8.3%)であった (表2)。マロリ体陽性肝癌部と同陰性肝癌部における DNA ヒストグラムの各型の分布には有意差がみられた ( $P < 0.05$ )。また、同一症例内での比較をしてみると、表3に示す如く、マロリ体陽性肝癌部の DNA ヒストグラムのタイプは、12例中8例 (66.7%)で、同一症例のマロリ体陰性癌細胞の DNA タイプよりも高いグレード、つまり、ハイパープロイド化、アニュプロイド化が進んでいた。残りの4例では同一の型の DNA ヒストグラムのタイプを示した。なお、マロリ体陰性癌細胞が陽性癌細胞よりも高いグレードの DNA ヒストグラムのタイプを示すものはなかった。

次に、癌部にマロリ体を認めた2例 (症例4および14)を用い、お互いに離れたマロリ体陽性のニカ所の癌部で、核 DNA 量を測光し、その DNA ヒストグラムのタイプを検討した。その結果、症例4ではともにIV型、症例14ではともにIII型であり、互いに離れた癌結節においても核 DNA ヒストグラムのタイプは同一であった。

Table 2. Means ( $M$ ) and standard deviations ( $S.D.$ ) of arbitrary units (DNA content) and types of DNA histogram of Mallory body-positive and -negative carcinoma.

Case No.	MB positive cells		MB negative cells	
	$M \pm S.D.(A.U.)$	Type of DNA pattern	$M \pm S.D.(A.U.)$	Type of DNA pattern
1	$2.73 \pm 2.00$	III	—	
2	$3.08 \pm 2.12$	IV	—	
3	$1.77 \pm 0.94$	II	$2.40 \pm 1.80$	II
4	$3.97 \pm 2.43$	IV	$2.41 \pm 1.32^*$	III
5	$2.05 \pm 1.20$	II	$1.57 \pm 0.73^*$	I
6	$1.81 \pm 0.90$	II	—	
7	$3.72 \pm 1.65$	II	$2.66 \pm 1.31^*$	II
10	$3.11 \pm 1.62$	IV	$1.33 \pm 0.59^*$	I
11	$3.18 \pm 2.48$	III	—	
12	$1.70 \pm 0.96$	III	$1.51 \pm 0.49^{**}$	II
13	$2.12 \pm 0.88$	II	$2.11 \pm 0.91$	II
14	$2.48 \pm 1.60$	III	—	
15	$2.91 \pm 1.93$	IV	—	
16	$2.51 \pm 1.22$	IV	$1.76 \pm 0.87^*$	III
17	$4.22 \pm 2.53$	IV	$4.56 \pm 2.52$	IV
18	$3.19 \pm 1.48$	III	—	
19	$1.77 \pm 0.64$	II	—	
20	$1.89 \pm 0.76$	II	$1.15 \pm 0.36^*$	I
21	$3.28 \pm 1.20$	III	$2.20 \pm 0.84^*$	II
22	$2.64 \pm 1.37$	IV	$2.11 \pm 0.93^*$	II

1 A.U., 2C; \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ , vs. transverse by pooled t-test or Welch's t-test.

なお、マロリ体陽性肝癌の DNA ヒストグラムの各型と肝癌の分化度との間に有意の関連性は見られなかった。

Table 3. Comparison of types of DNA histogram between Mallory body-positive and -negative carcinoma areas in the same case.

Mallory Body (+) areas	Mallory Body (-) areas			
	Type I	Type II	Type III	Type IV
Type I	—	—	—	—
Type II	●●	●●●	—	—
Type III	●	●	—	—
Type IV	●	●	●●	●

●, case; —, absent.

### III. 肝細胞、肝細胞癌の組織計測

正常肝 9 例の核の平均は、 $44.56 \pm 14.96 \mu^2$  (平均値  $\pm$  標準偏差) であり、胞体の面積は  $323.44 \pm 120.51 \mu^2$ 、核胞体比は  $0.17 \pm 0.05$  であった。核の面積については、マロリ体陽性肝癌で  $95.37 \pm 44.74 \mu^2$  で、同陰性癌細胞の核面積は  $66.17 \pm 20.95 \mu^2$  であり、いずれも正常肝細胞よりも有意に高値を示し (表 4-A,  $P < 0.01$ )。また、マロリ体陽性肝癌の方が、同陰性肝癌より高値を示した ( $P < 0.01$ )。胞体の面積は、マロリ体陽性肝癌では  $587.77 \pm 257.99 \mu^2$ 、マロリ体陰性肝癌では  $268.75 \pm 97.91 \mu^2$  で、マロリ体陽性肝癌の胞体の方が、同陰性肝癌よりも有意に大きかった (表 4-B,  $P < 0.01$ )。核/胞体比は、マロリ体陽性癌細胞が  $0.19 \pm 0.10$ 、マロリ体陰性癌細胞

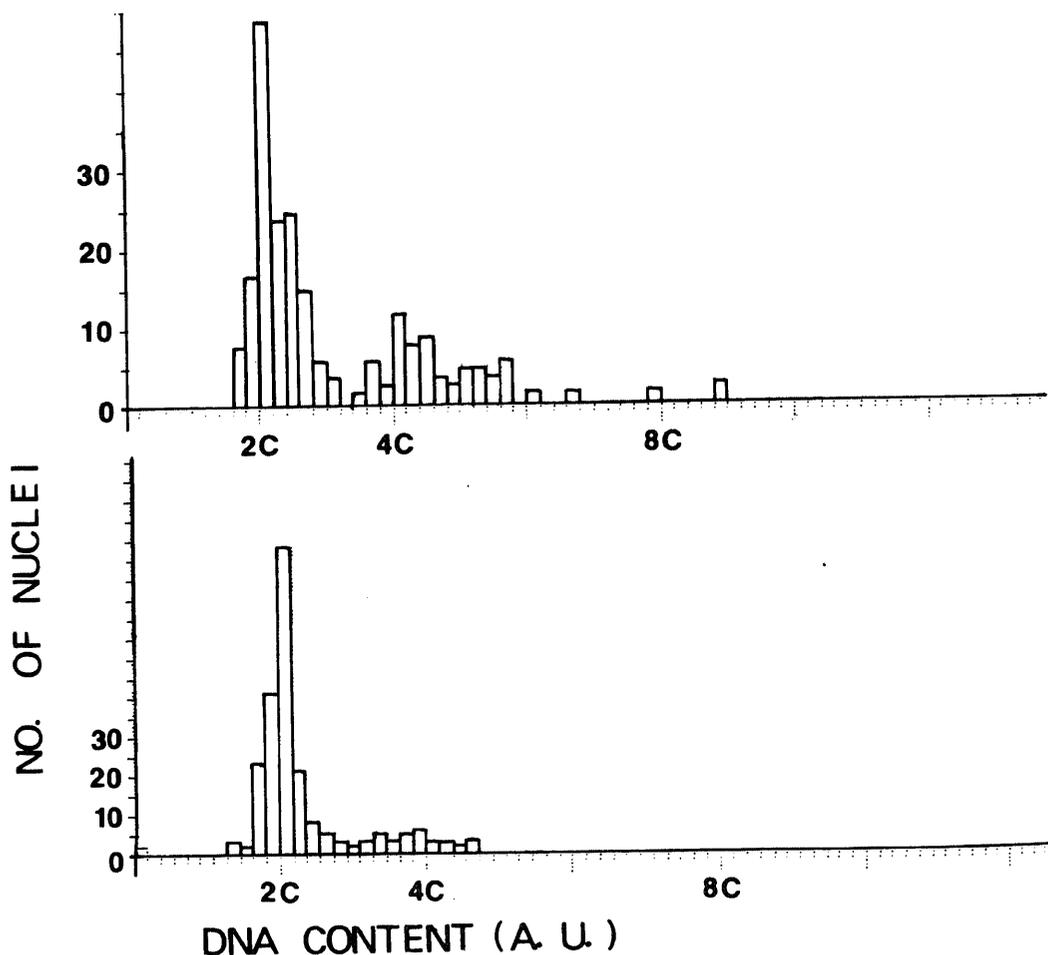


Fig. 5. Nuclear DNA histogram of normal case (upper part, 58y) and a part of cirrhotic liver (lower part, case 21). Both show type I (diploid pattern).

で $0.31 \pm 0.16$ であり、マロリ体陽性癌細胞の核胞体比は有意に低値を示した(表4-C,  $P < 0.01$ )。また、マロリ体陰性癌細胞の核/胞体比は、正常肝細胞( $0.17 \pm 0.05$ )に対して有意に大きいのに対し( $P < 0.01$ )、マロリ体陽性癌細胞では、正常肝細胞との間に差が認められなかった。

同一症例内でマロリ体陽性癌部と陰性癌部を比較すると、核面積では22例中16例が(表4-A, 15例が $P < 0.01$ , 1例が $P < 0.05$ )、胞体面積では22例中22例(表4-B, 21例で $P < 0.01$ , 1例で $P < 0.05$ )でマロリ体陽性肝癌の方が大きく、核胞体比は、22例中18例(表4-C, 全例 $P < 0.01$ )で、マロリ体陽性肝癌で小さかった。

なお、マロリ体陽性肝癌のDNAヒストグラムの

タイプと肝癌細胞の組織計測所見との間に、有意の関連性は見られなかった。

考 察

遺伝情報の担い手であるDNAは細胞核にあり、正常細胞ではその量は一定の範囲内に局限している。いくつかの核DNA量の測定方法が従来より知られている<sup>24)26)27)</sup>が、DNAがホルマリンの中でも安定であることから、病理学の領域では、ホルマリン固定後パラフィン包埋された組織切片そのものを用いたDNA量の測定が行なわれている。つまり、脱パラフィンした組織切片を一定時間加水分解し、フォイルゲン染色を施した後、顕微蛍光測光により、細胞単位でDNA量を測定する方法である。そして、

Table 4-A. Means (M) and standard deviations (S.D.) of areas of nuclei of Mallory body (MB)-positive and -negative parts of hepatocellular carcinoma.

Case No.	MB positive M±S.D.( $\mu^2$ )	MB negative M±S.D.( $\mu^2$ )
1	140.83±119.56*	82.27±32.29
2	96.88±26.08*	60.31±9.99
3	50.08±14.45	62.22±15.50
4	65.89±22.71	71.57±24.10
5	82.96±41.42*	61.02±17.38
6	78.35±29.70*	53.51±19.11
7	84.58±22.14*	67.94±36.01
8	79.82±26.58	71.37±27.94
9	69.94±28.95	66.40±12.61
10	77.72±24.05*	37.65±9.66
11	124.10±48.90*	73.80±21.04
12	118.27±45.25*	43.58±8.18
13	57.75±14.43*	45.90±6.83
14	85.72±26.07*	51.30±10.79
15	134.59±91.99*	72.57±21.84
16	98.06±44.57	90.84±29.56
17	98.47±59.33**	78.64±30.43
18	79.30±39.13	70.94±19.74
19	108.9±33.59*	73.59±22.74
20	84.20±38.68*	54.35±14.31
21	177.13±51.60*	87.46±18.45
22	101.74±33.59*	78.08±17.09
M±S.D. of total cases	95.37±44.74*	66.17±20.95

\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ , vs. transverse by pooled t-test or Welch's t-test.

Table 4-B. Means (M) and standard deviations (S.D.) of areas of cytoplasm of Mallory body (MB)-positive and -negative parts of hepatocellular carcinoma.

Case No.	MB positive M±S.D.( $\mu^2$ )	MB negative M±S.D.( $\mu^2$ )
1	749.72±368.54*	388.20±167.85
2	844.74±272.07*	298.04±71.08
3	365.6±142.43*	196.92±82.29
4	345.28±156.27*	240.23±106.75
5	524.41±188.49*	187.54±61.47
6	480.93±163.07*	151.21±52.09
7	742.16±224.05*	253.64±125.17
8	731.08±222.50*	440.98±172.39
9	702.60±346.31*	287.83±78.40
10	411.60±138.70*	98.21±26.73
11	674.30±286.98*	351.98±107.39
12	414.10±141.35*	288.96±76.83
13	484.20±209.89*	237.25±65.42
14	723.02±359.13*	269.54±83.58
15	508.43±170.49*	173.50±84.18
16	691.63±349.34*	445.98±160.94
17	704.43±278.03*	267.00±94.55
18	302.64±146.70*	190.36±57.76
19	967.20±508.60*	256.51±65.79
20	479.58±213.56*	208.94±63.34
21	1048.04±351.13*	472.92±124.00
22	267.92±74.70**	229.57±58.97
M±S.D. of total cases	587.77±257.99*	268.75±97.91

\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ , vs. transverse by pooled t-test or Welch's t-test.

癌細胞の DNA ヒストグラムの決定や増殖動態、癌細胞の生物学的性状の解明に広く応用されている (12)~(18)。

さて、マロリ体は肝癌細胞にしばしば見られるが、その生物学的意義や出現機序に関し、不明な点が多く残されている。この点を明らかにするため、今回、マロリ体陽性肝癌と同陰性肝癌の核 DNA 量をフォイルゲン染色-顕微蛍光測光法で測定し、以下の結果を得た。まず第一に、測光した全ての標本の核 DNA 量の平均値と標準偏差を求め、相互比較を行なった。その結果、核 DNA 量は肝癌例で非癌部肝硬変より明らかに多く、またマロリ体陽性肝癌と同陰性肝癌で比較すると、マロリ体陽性肝癌部で DNA 量が多かった。次に、核 DNA のヒストグラムによる分析を行なった。肝癌の DNA ヒストグラム

Table 4-C. Means (M) and standard deviations (S.D.) of N/C ratio of Mallory body (MB) -positive and -negative parts of hepatocellular carcinoma.

Case	MB positive M±S.D.( $\mu^2$ )	MB negative M±S.D.( $\mu^2$ )
1	0.19±0.12	0.23±0.08
2	0.13±0.05*	0.21±0.06
3	0.15±0.07*	0.41±0.41
4	0.22±0.10*	0.33±0.12
5	0.17±0.09*	0.36±0.15
6	0.18±0.09*	0.38±0.17
7	0.12±0.05*	0.29±0.12
8	0.12±0.04*	0.17±0.06
9	0.11±0.04*	0.24±0.07
10	0.21±0.08*	0.69±0.28
11	0.20±0.08	0.22±0.06
12	0.30±0.11*	0.16±0.07
13	0.14±0.05*	0.21±0.06
14	0.14±0.06*	0.20±0.06
15	0.30±0.26*	0.47±0.20
16	0.16±0.07*	0.22±0.09
17	0.15±0.07*	0.32±0.14
18	0.29±0.13*	0.40±0.15
19	0.14±0.30*	0.30±0.09
20	0.20±0.10*	0.28±0.10
21	0.19±0.08	0.20±0.06
22	0.40±0.16	0.37±0.15
M±S.D. of total cases	0.19±0.10*	0.31±0.16

\*p < 0.01, vs. transverse by pooled t-test or Welch's t-test.

は、従来、ディプロイドパターンからアニュープロイドパターンまで、多彩であり、高分化の肝癌やサイズの小さい肝癌では、ディプロイドパターンを示すものが多いと報告されている<sup>12)14)28)</sup>。今回の研究でも、正常肝や再生結節の肝細胞がディプロイドパターンを示したのに比べ、肝癌の DNA ヒストグラムは多彩であった。マロリ体陽性肝癌と同陰性肝癌の DNA ヒストグラムを比較すると、マロリ体陽性肝癌でハイパープロイド化やアニュープロイド化の傾向が強く認められた。また、同一症例内でマロリ体陽性部と同陰性部を比較し得た12例全例で、マロリ体陽性肝癌部は、同陰性肝癌部に比べ、よりハイパープロイド化やアニュープロイド化の進んだタイプを示す傾向があった。

従来、核 DNA 量の増加、ハイパープロイド化、アニュープロイド化は分化度の低い癌細胞の特徴であるとする報告や、癌の進展に従って多く認められるようになるとする報告が、肝癌<sup>29)</sup>、唾液腺癌<sup>30)</sup>、乳癌<sup>19)</sup>、子宮頸部癌<sup>19)</sup>、膀胱癌<sup>19)</sup>、食道癌<sup>19)</sup>等でなされている。これらのことより、マロリ体陽性肝癌で、細胞核の旺盛な代謝や DNA の合成が、マロリ体陰性癌細胞よりも有意に強く生じており、また癌組織中のマロリ体陽性部分は、周囲の陰性部分に比べて、より低分化である可能性を示唆している。光顕的観察でも、マロリ体陽性の肝癌細胞の集簇が、周囲を圧排するようにして結節を形成する像が見られることがあり、小型肝癌結節では、増殖性が強いと考えられる結節辺縁部に、しばしばマロリ体が多く出現しており(未発表データ)、マロリ体陽性癌細胞が、強い増殖能を持つ可能性を支持する所見と思われる。従って、少なくとも、びまん性あるいは集簇性の形で出現するマロリ体陽性癌細胞群は、かなり活動的に増殖していると考えられる。

また、マロリ体陽性癌細胞群は、遺伝的に規定された細胞群、即ち1つのクローン集団としての側面を持っている可能性がある。今回の研究で、2例のマロリ体陽性肝癌で、マロリ体が密在する2カ所を選び顕微蛍光測光すると、同一の DNA ヒストグラムを示した。クローナルに発育する腫瘍は同一の DNA ヒストグラムを示すとされており<sup>31)~33)</sup>、この所見は、マロリ体陽性肝癌がクローナルに増殖していることを示唆するものと思われる。そのような意味では、マロリ体は、クローナルに発育した肝癌の示す1つの遺伝形質と捉えることが可能である。なお、マロリ体陽性部と陰性部を同時に検索した12例では、その8例において、DNA ヒストグラムのタイプが異

なっていた。このことは、マロリ体陽性肝癌と同陰性肝癌が別々のクローンとして肝内に多発性に出現したか、あるいはマロリ体陰性あるいは同陽性癌として出発した癌内に、マロリ体陽性あるいは同陰性癌が、新たに別のクローンとして発生、増殖したことを意味するのかもしれない。

しかし、マロリ体陽性肝癌細胞には、壊死像や周囲への好中球の浸潤像が稀れならず認められる。これらの所見は、マロリ体陽性細胞自体がやがて死滅する細胞の様に考えられ、事実、Edmondson<sup>29)</sup>はマロリ体陽性細胞に対して、hyaline necrosis という病理所見名を使い、肝細胞の示す1つの壊死像として捉えている。もし、これが正しいとするとマロリ体陽性細胞は強い増殖力を持たないことになる。マロリ体の主成分は中間径フィラメントであり、マロリ体が形成されるに際し、サイトスケルトンの障害が発生していると考えられる。細胞分裂あるいは核分裂に際し、サイトスケルトンが重要な働きをなすことが知られており、マロリ体陽性肝癌で、ハイパープロイド化、アニユプロイド化が進んでいるのは、核DNA量は増加するが細胞分裂が円滑に行なわれず、結果的に核DNA量が病的に増加した像を反映しているのかもしれない。この推論と上述の推論との間には大きな矛盾があり、この矛盾点がマロリ体の研究に際し、常につきまとい続けている。この問題の解決が今後の大きな研究課題である。

肝癌細胞の組織計測に関する従来の報告<sup>20)</sup>では、核の大きさ、核/胞体比とともに、正常肝細胞に比べて大きくなり、さらにその分散幅は広がるとされている。今回の研究では、ディジタイザーによる手動で組織計測を行なったが、マロリ体陰性癌細胞については、従来の報告と同様の結果が得られた。一方、マロリ体陽性肝癌細胞は、正常肝細胞、マロリ体陰性肝癌細胞に比べて、核、胞体ともに有意に大きく、特に胞体の大型化が目立ち、22例全例において、有意差が得られた。上述の如くマロリ体陽性肝癌では、核DNA量が増加するが、これが核の大型化に関係しているのかもしれない。また、マロリ体陽性肝癌内ではサイトスケルトンの変化に伴い、細胞骨格の維持ができなくなり、胞体が大型化するのかも知れない。マロリ体陽性細胞の胞体の大型化と、マロリ体陽性細胞に時々見られる水腫様変性<sup>30)</sup>とは一連の変化と考えられる。また、核、胞体ともに大型化しているにもかかわらず、核/胞体比は、22例中18例でマロリ体陽性癌細胞が陰性癌細胞より小さく、マロリ体陽性癌細胞では、同陰性細胞に比べ、胞体の大型化が際

だっていることが示された。なお、今回の検索では、マロリ体陽性肝癌部のDNAヒストグラムのタイプと、核や胞体の大きさ、核/胞体比や肝癌の分化度との間に、有意の関連性は得られなかった。このことは、マロリ体陽性肝癌においては、DNAヒストグラムのタイプは肝癌の一般的組織像には反映されないことを意味していると思われる。

本研究において、フォイルゲン染色の染色性は、ホルマリン固定が比較的短期間で、その後すぐにパラフィン包埋されていた材料では、良好であり、蛍光顕微測光が可能であった。しかし、ホルマリン固定が長期に及んだり、ホルマリン中に保存してある標本より再切り出した症例では、染色方法、即ち塩酸による加水分解の時間、染色液の組成や濃度、染色時間等を様々に変えてみても、DNAの染色性は悪いまま改善されなかった。従って、フォイルゲン染色に供するためには、対象組織を短期間のホルマリン固定後、速やかにパラフィン包埋した状態で保存する必要があると考えられた。

## 結 論

マロリ体陽性肝癌細胞、および同陰性肝癌細胞について、フォイルゲン顕微蛍光測光、および組織計測を行なったところ、

1. マロリ体陽性肝癌は、陰性肝癌に比べ、核DNA量が有意に増加しており、DNAヒストグラムの分散幅も大きく、ハイパープロイド化、アニユプロイド化が顕著であった。

2. 同一症例でマロリ体が密在する2個の癌結節のプロイディパターンは同一であり、マロリ体陽性肝癌がクローナリに発育することが示唆された。

3. マロリ体陽性肝癌細胞は、同陰性肝癌細胞に比べて、核、胞体ともに有意に大型化しており、特に胞体の大型化が著明で、核胞体比は、マロリ体陰性癌細胞では正常肝細胞よりも有意に大きいものに対して、マロリ体陽性癌細胞では、むしろ減少していて正常肝細胞と差がなかった。

4. 以上の所見は、肝癌内のマロリ体形成能が遺伝子的に規定された1つの表現型である可能性を示していると考えられた。

## 謝 辞

本研究に際し、御指導頂きました本学名誉教授太田五六先生、本学第二病理中沼安二教授に心より感謝します。また、貴重な御意見を頂きました、本学第二病理寺田忠史博士ならびに、本研究に御協力頂きました本学第二病理学教室の諸先

生、技師の諸氏に深く感謝します。また、測光値および計測値処理のプログラム作製に御協力頂きました金沢大学工学部畑野栄君、池田聡史君に感謝します。

### 文 献

- 1) **Mallory, F. B.**: Cirrhosis of the Liver. Five different types of lesions from which it may arise. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **22**, 69-74 (1911).
- 2) **Norkin, S. A. & Campagna-Pinto, D.**: Cytoplasmic hyaline inclusions in hepatoma. *Arch. Path.*, **86**, 25-32 (1968).
- 3) **French, S. W.**: The Mallory body: structure, composition, and pathogenesis. *Hepatology*, **1**, 76-83 (1981).
- 4) **Irie, T., Benson, N. C. & French, S. W.**: Relationship of Mallory bodies to the cytoskeleton of hepatocytes in griseofulvin-treated mice. *Laboratory Investigation*, **47**, 336-345 (1982).
- 5) **Gerber, M. A., Orr, W., Denk, H., Schaffner, F. & Popper, H.**: Hepatocellular hyaline in cholestasis and cirrhosis: Diagnostic significance. *Gastroenterology*, **64**, 89-98 (1973).
- 6) **French, S. W.**: The biological implications of the "alcoholic hyaline" phenomenon. *肝臓*, **21**, 1431-1436 (1980).
- 7) **Borenfreund, E., deHarven, E., & Garra, L.**: Mallory body-like abnormalities in carcinomas induced by cultured transformed rat liver cells. *Hepatology*, **1**, 408-415 (1981).
- 8) **Nakanuma, Y., Ohta, G., Sugiura, H., Watanabe, K., & Doishita, K.**: Incidental solitary hepatocellular carcinoma smaller than 1 cm in size found at autopsy: A morphologic study. *Hepatology*, **6**, 631-635 (1986).
- 9) **Nakanuma, Y. & Ohta, G.**: Expression of Mallory bodies in hepatocellular carcinoma in man and its significance. *Cancer*, **57**, 81-86 (1986).
- 10) **Nakanuma, Y. & Ohta, G.**: Small hepatocellular carcinoma containing many Mallory bodies. *Liver*, **4**, 128-133 (1984).
- 11) **Nakanuma, Y. & Ohta, G.**: Is Mallory body formation a preneoplastic change? A study of 181 cases of liver bearing hepatocellular carcinoma and 82 cases of cirrhosis. *Cancer*, **55**, 2400-2404 (1985).
- 12) **Koike, Y., Suzuki, Y., Nagata, A., Furuta, S. & Nagata, T.**: Studies on DNA content of hepatocytes in cirrhosis and hepatoma by means of microspectrophotometry and radioautography. *Histochemistry*, **73**, 549-562 (1982).
- 13) **小中千守**: 乳腺腫瘍細胞の核 DNA 定量による診断学的研究. *日臨細胞誌*, **18**, 127-139 (1979).
- 14) **香川恵造**: 顕微蛍光 DNA 定量法による Liver cell dysplasia および肝癌の解析. *京府医大誌*, **90**, 13-31 (1981).
- 15) **Fu, Y. S., Reagan, J. W., Fu, A. S. & Janiga, K. E.**: Adenocarcinoma and mixed carcinoma of the uterine cervix. II. Prognostic value of nuclear DNA analysis. *Cancer*, **49**, 2571-2577 (1982).
- 16) **Levi, P. E., Cooper, E. H., Phil, D., Anderson, C. K., & Williams, R. E.**: Analysis of DNA content, nuclear size, and cell proliferation of transitional cell carcinoma in man. *Cancer*, **23**, 1074-1085 (1969).
- 17) **Foosa, S. D., Kaalhus, O. & Scott-Knudsen, O.**: The clinical and histopathological significance of Feulgen DNA-values in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Europ. J. Cancer*, **13**, 1155-1162 (1977).
- 18) **Sugimachi, K., Ide, H., Okamura, T., Matsuura, H., Endo, M. & Inokuchi, K.**: DNA analysis of mucosal and submucosal carcinoma of the esophagus. *Cancer*, **53**, 2683-2687 (1984).
- 19) **Watanabe, T. & Tanaka, Y.**: Age-related alterations in the size of human hepatocytes. *Virchow Archiv B*, **39**, 9-20 (1982).
- 20) **Jagoe, R., Sowter, C., Dandy, S. & Slavin, G.**: Morphometric study of liver cell nuclei in hepatomas using an interactive computer technique: (i) nuclear size and shape. *J. Clin. Pathol.*, **35**, 1057-1062 (1982).
- 21) **Helander, K., Kirkhus, B., Iverson, O. H., Johansson, S. L., Nilson, S., Vaage, S. & Fjorrdvang, H.**: Studies on urinary bladder carcinoma by morphometry, flow cytometry, and light microscopic malignancy grading with special reference to grade II tumours. *Virchow Archiv A*, **408**, 117-126 (1985).
- 22) **Lee, T. K., Marshall, R. B. & Kardon, B.**: The significance of nuclear diameter in the

biologic behavior of thyroid carcinomas. *Hum. Pathol.*, **18**, 1252-1256 (1987).

23) 月刊 **Medical Technology** 編：染色法のすべて。第2版，21-22頁，医歯薬出版，東京，1984。

24) 藤田哲也：定量的蛍光組織化学の現在と未来。最新医学，**35**，782-780 (1980)。

25) Edmondson, H. A. & Steiner, P. E.: Primary carcinoma of the liver. A study of 100 cases among 48,700 necropsies. *Cancer*, **7**, 462-503 (1954).

26) Colvin, R. B. & Preffer, F. I.: New technologies in cell analysis by flow cytometry. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **111**, 628-632 (1987).

27) Boehm, N. & Sprenger, E.: Fluorescence cytophotometry: A valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen-DNA. *Histochemie*, **16**, 100-118 (1968).

28) Kuo, S. H., Sheu, J. C., Chen, D. S., Sung, J. L., Lin, C. C. & Hsu, H. C.: Cytophotometric measurements of nuclear DNA content in hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, **7**, 330-332 (1987).

29) 那須健治：肝癌，肝硬変，正常肝における核内デオキシリボ核酸量について—病理組織学的所見との比較検討—，大阪医誌，**12**，1123-1132 (1960)。

30) Kino, I., Richart, R. M. & Lattes, R.: Nuclear DNA in salivary gland tumors. *Arch. Pathol.*, **95**, 245-251 (1973).

31) Atkin, N. B. & Richards, B. M.: Deoxyribonucleic acid in human tumours as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain: A comparison of tumours arising at different sites. *Brit. J. Cancer*, **10**, 769-786 (1956).

32) Boehm, N., & Sandritter, W.: DNA in human tumors: A cytophotometric study. *Curr. Top. Pathol.*, **60**, 151-219 (1975).

33) Kuo, S. W., Sheu, J. C., Sung, J. L., Lin, C. C. & Hsu, H. C.: DNA clonal heterogeneity of hepatocellular carcinoma demonstrated by Feulgen-DNA analysis. *Liver*, **7**, 359-363 (1987).

34) Edmondson, H. A. & Peters, R. L.: Liver. In Kissane, J. M., (ed.), *Anderson's pathology*, 8th ed., p1096-1212 Mosby, St. Louis, 1985.

**Pathological Significance of Mallory Body Formation in Hepatocellular Carcinoma: Feulgen-DNA Cytophotometric and Morphometric Analysis** Masahiro Hoso, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Juzen Med. Soc.*, 97,825—838 (1988)

**Key words:** hepatocellular carcinoma, Mallory body, Feulgen cytophotometry, morphometry

#### Abstract

Mallory bodies (MBs) are peculiar hyalin in hepatocytes and hepatocellular carcinoma (HCC) cells. In order to clarify the relationship of MB formation to hepatocarcinogenesis, microspectrophotometrical measurement of cell nuclear deoxyribonucleic acid (DNA) content and morphometrical analysis of HCC cells were carried out in autopsied cases of HCC bearing many MBs. Non-neoplastic hepatocytes of normal livers and of cirrhotic areas from cases with HCC showed generally diploid pattern. In contrast, MB positive HCC cells showed more hyperploid pattern or aneuploid pattern of DNA content than MB-negative HCC cells as well as non-neoplastic hepatocytes did. Separate carcinoma nodules containing many MB-positive cells in the same liver showed the same type of DNA pattern suggesting clonal proliferation of MB-positive HCC cells. Morphometrical analysis disclosed an increase of nuclear as well as cytoplasmic volumes of MB-positive cells compared to MB-negative ones, though the nuclear/cytoplasmic ratio of MB-positive cells was not different from that of non-neoplastic hepatocytes. The findings that MB-positive HCC cells shared several characteristic features and DNA monoclonarity in MB-positive HCC cells, suggest that MB phenomenon is possibly related to a structural phenotypic cellular change of HCC.