



Dimethylaminoazobenzene誘発障害肝の放射線耐容線量に関する検討 : Wistar系ラットを用いた組織学的検討

泉山, 一隆
児玉, 明久
河野, 道雄

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 58(1/2/3):47-55

(Issue Date)

1997-12

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00177381>



Dimethylaminoazobenzene誘発障害肝の

放射線耐容線量に関する検討

—Wistar系ラットを用いた組織学的検討—

神戸大学医学部放射線医学教室（主任：河野 通雄教授）

泉山一隆，児玉明久，河野通雄

（平成9年5月7日受付）

要 約

Wistar系ラット（4週齢，雄）をもちいて，障害肝の耐容線量について検討した。ラットに0.07% dimethylaminoazobenzene (DAB) を配合した低蛋白飼料を12週間投与して障害肝群を作成し，普通食で飼育した同週齢のラットを正常肝群とした。15 MeV電子線を使用して肝の右半分を照射し，非照射の左半分と比較した。まず正常肝群および障害肝群の2匹ずつにそれぞれ5 Gy, 10Gy, 15Gy, 20Gyを1回照射し，2週間後，4週間後に屠殺して照射肝部および非照射肝部の肝細胞壊死，変性の程度，炎症細胞浸潤の程度，グリソン鞘の炎症細胞浸潤及び線維化の程度を組織学的に観察し，比較検討した。その結果をふまえて次に正常肝群ではラット6匹に20Gyを照射し，障害肝群ではラット6匹ずつにそれぞれ10Gy, 12Gy, 15Gy, 20Gyを照射し，同様の検討を行った。1)正常肝群では20Gyでも照射肝部と非照射肝部との間に組織的な差を認めなかった。2)障害肝群では5 Gy, 10Gy照射群では照射肝部と非照射肝部との間に明らかな差を認めなかったが，12Gy照射群では照射2週間後と4週間後それぞれ3匹中1匹に照射肝部のほうに強い肝細胞変性壊死，炎症細胞浸潤を認めた。また15Gy照射群の6匹中1匹，20Gy照射群の6匹中4匹が照射後1週間目に死亡した。障害肝では12Gy以上で不可逆変化が残る例があるのに対し，正常肝では20Gyでも耐容であり，障害肝は正常肝よりも耐容線量が低いことが証明された。

【緒 言】

欧米人と異なり，日本人の肝癌は肝炎，肝硬変を母

地として発生する事が多い。したがって肝癌の放射線療法をより安全に行うためには障害肝の耐容線量を知る必要がある。これまで正常肝の耐容線量についての報告は見られる¹⁾²⁾³⁾⁴⁾が，障害肝の耐容線量についての報告は見られない。今回実験的にラットを用いて，障害肝の耐容線量について組織学的側面より検討した。

【対象と方法】

1. 実験動物

Wistar系の4週齢雄性ラットを用いた。0.07% dimethylaminoazobenzene (DAB) を配合した低蛋白飼料を作成し，12週間経口投与して肝炎，肝硬変を作成⁵⁾⁶⁾し，障害肝群とした。一方，同期間通常飼料（固形飼料CE-2，日本クレア社）で飼育した同週齢のラットを正常肝群とした。両群とも温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，湿度 $55 \pm 5\%$ ，12時間照明，1時間15回換気に制御された部屋で飼育した。

2. 実験手順

カルバミン酸エチル（ウレタン）20gを蒸留水100 mlに溶かした溶液0.04~0.05ml/kgをラットの下腹部皮下に注射して全身麻酔を行った。ラットを仰臥位に固定して肝の右半分だけが照射されるように右上腹部に照射野を設定した。照射方法は15MeVの電子線を使用してSSD100cm，線量率600cGy/minでピーク深にて1回照射を行った。照射2週間後，4週間後に屠殺して肝を摘出し，照射部分と非照射部分に分けて20%中性ホルマリン液で固定後，パラフィン包埋後切片を作成し，H.E.染色の上，顕微鏡にて観察した。グリソン鞘の変化が疑われる例はアザン染色を追加し検討した。検討項目は同一個体での照射肝部および非照射肝部の1. 肝細胞壊死，変性の程度，2. 炎

症細胞浸潤の程度, 3. グリソン鞘の炎症細胞浸潤の程度 4. グリソン鞘の線維化の程度とした。評価方法は 0 = 変化なし, 1 = 変化あり, 2 = 1 より強い変化とスコア化して 1. ~ 4. のうち 2 項目以上差を認めたものを差ありとした。

3. 実験 1

正常肝と障害肝の各群において, それぞれ 5Gy, 10Gy, 15Gy, 20Gy を各 2 匹ずつ合計 16 匹に照射し, 照射肝部および非照射肝部に組織学的な差が認められる線量を求めた。

4. 実験 2

実験 1 の結果をふまえて正常肝群は 20Gy で, 障害肝群は 10Gy, 12Gy, 15Gy, 20Gy 照射して検討した。各群は 6 匹で合計 30 匹を用いた。

【結 果】

1. 実験 1 の結果

それぞれの結果を Table 1 と Table 2 に示す。

正常肝群 (Table 1) : 5Gy, 10Gy, 15Gy, 20Gy 照射群いずれにおいても照射 2 週間後, 4 週間後ともに照射肝部と非照射肝部に 2 項目以上の差を認めなかつ

た。

障害肝群 (Table 2) : 5Gy, 10Gy 照射群は差がなかったが, 15Gy 照射群において照射肝部に非照射肝部よりも強い肝細胞の変性壊死, 炎症細胞浸潤を認めた。

2. 実験 2 の結果

正常肝群 : 20Gy 照射肝部と非照射肝部との間に照射 2 週間後, 4 週間後ともに明らかな差を認めなかった (Fig.1)。また 2 週間後と 4 週間後との間にも組織学的な差はなかった。

障害肝群 : 10Gy 照射群では照射肝部と非照射肝部との間に照射 2 週間後, 4 週間後ともに明らかな差を認めなかった。12Gy 照射群では照射 2 週間後 (Fig.2) と 4 週間後 (Fig.3) それぞれ 3 匹中 1 匹に照射肝部のほうにより強い肝細胞の変性壊死, 炎症細胞浸潤を認めた。15Gy 照射群では 6 匹中 1 匹が照射後 1 週間目に死亡した。生存 5 匹のうち照射 2 週間後では 3 匹とも照射肝部と非照射肝部との間に明らかな変化の差を認めなかったが, 照射 4 週間後では 2 匹中 1 匹に照射肝部のほうに強い肝細胞の変性壊死, 炎症細胞浸潤を認めた (Fig.4)。20Gy 照射群では 6 匹中 4 匹が照射後 1 週間以内に死亡した。生存 2 匹を照射

Table 1 正常肝群 : 照射 2 週後と 4 週後における照射肝部と非照射肝部の組織学的評価

0 : 変化なし

1 : 変化あり

2 : 1 より強い変化

ラット No.	照射線量	肝実質の変化		グリソン鞘の変化		
		肝細胞変性壊死の程度	炎症細胞浸潤の程度	線の程度	炎症細胞浸潤の程度	
2 週後	1	5 Gy 照射部	0	0	0	0
		非照射部	0	0	0	0
	2	10Gy 照射部	0	0	0	0
		非照射部	0	0	0	0
	3	15Gy 照射部	0	0	0	0
		非照射部	0	0	0	0
	4	20Gy 照射部	0	0	0	0
		非照射部	0	0	0	0
4 週後	5	5 Gy 照射部	0	0	0	0
		非照射部	0	0	0	0
	6	10Gy 照射部	0	0	0	0
		非照射部	0	0	0	0
	7	15Gy 照射部	0	0	0	0
		非照射部	0	0	0	0
	7	20Gy 照射部	0	0	0	1
		非照射部	0	0	0	0

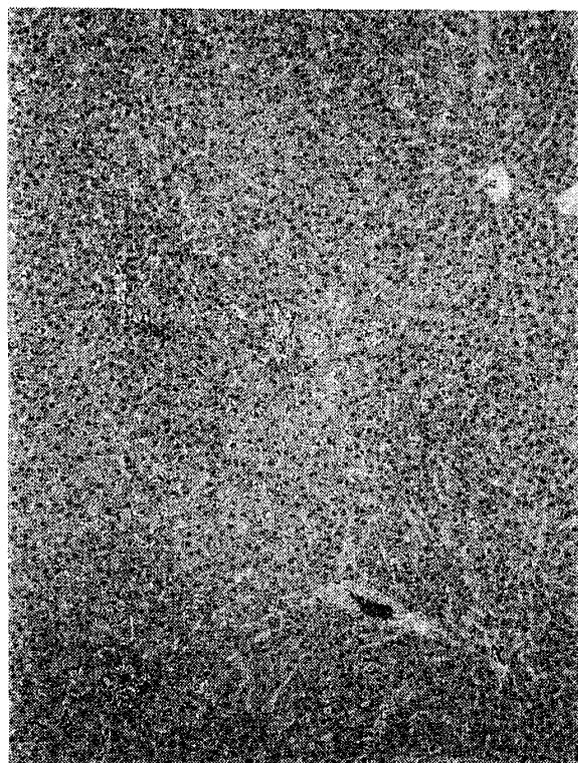
Table 2 障害肝群：照射2週後と4週後における照射肝部と非照射肝部の組織学的評価

0：変化なし

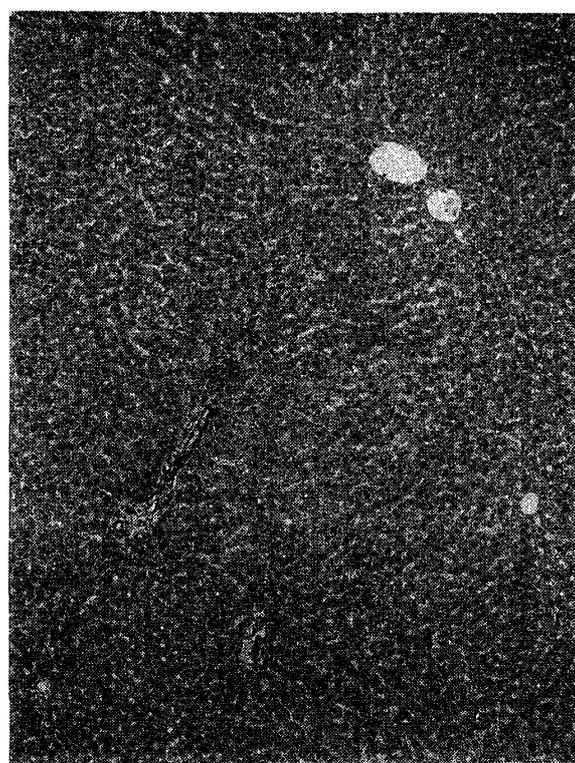
1：変化あり

2：1より強い変化

ラット No.	照射 線量	肝実質の変化		グリソン鞘の変化		
		肝細胞変性壊死 の程度	炎症細胞浸潤 の程度	線維化 の程度	炎症細胞浸潤 の程度	
2 週後	1	5 Gy 照射部	1	1	1	1
		非照射部	1	1	1	1
	2	10Gy 照射部	1	1	1	1
		非照射部	1	1	1	1
	3	15Gy 照射部	2	2	1	1
		非照射部	1	1	1	1
	4	20Gy 照射部	2	2	2	1
		非照射部	1	2	2	1
4 週後	5	5 Gy 照射部	1	1	1	1
		非照射部	1	1	1	1
	6	10Gy 照射部	1	1	1	1
		非照射部	1	1	1	1
	7	15Gy 照射部	2	2	1	1
		非照射部	1	1	1	1
	7	20Gy 照射部	2	2	2	1
		非照射部	2	2	2	1



a

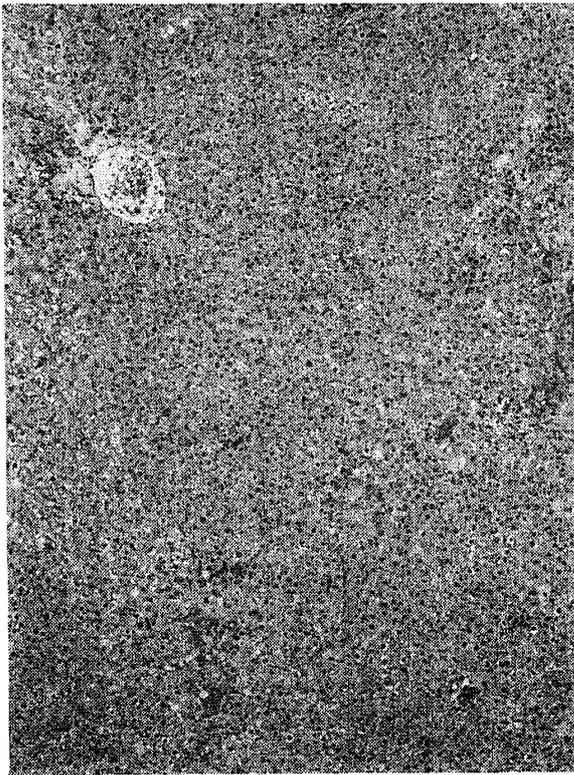


b

Fig.1 a) ラット正常肝20Gy照射4週後の組織像(H.E. 染色, 10倍)

b) 同一肝非照射部組織像(H.E. 染色, 10倍)

照射肝部, 非照射肝部とも異常所見を認めない。

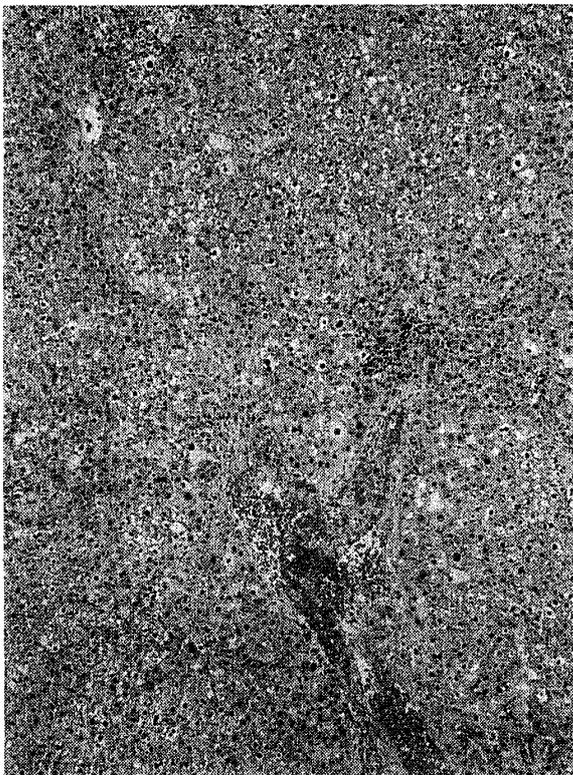


a



b

Fig.2 a) 障害肝12Gy照射 2 週後の組織像(H.E. 染色, 10倍)
 b) 同一肝非照射部組織像(H.E. 染色, 10倍)
 照射肝部に非照射肝部よりも強い肝細胞変性壊死, 炎症細胞浸潤を認める。



a



b

Fig.3 a) 障害肝12Gy照射 4 週後の組織像(H.E. 染色, 10倍)
 b) 同一肝非照射部組織像(H.E. 染色, 10倍)
 照射肝部に非照射肝部よりも強い肝細胞変性壊死, 炎症細胞浸潤を認める。

2週間後に検討したところ、照射肝部と非照射肝部との間に明らかな変化の差を認めなかったが、肝全体に15Gy照射群よりもグリソン鞘の炎症細胞浸潤及び線維化が強かった。(Fig.5)。障害肝群の照射線量と組織学的変化の差の分布をTable 3に示す。

死亡例5例を検討すると、15Gy照射の1例および20Gy照射の4例とも照射肝部と非照射肝部との間に明らかな変化の差を認めなかった。また肝組織の障害の程度も照射2週間後の屠殺例と明らかな差がなく、消化管にも穿孔はみられなかった。

照射後2週間後と4週間後の比較では明らかな差を認めなかったのは、5Gy、10Gy照射群で、4週間後のほうが強い変化がみられたのは12Gy、15Gy、20Gy照射群であった。

【考 察】

これまで正常肝の放射線耐容線量についての報告は見られる¹⁾²⁾³⁾⁴⁾が、障害肝の耐容線量についての報告は見られない。欧米人と異なり、日本人の肝癌は肝炎、肝硬変を母地として発生する事が多い。したがって肝癌の放射線療法をより安全に行うためには障害肝の耐容線量を知る必要がある。DABはアゾ系色素の化学肝癌原性物質のひとつで飼料に混じ、ラットに連日経

口投与すると、薬剤代謝酵素活性の高い肝細胞は早期に変性壊死をおこすが、薬剤代謝酵素活性の低いoval cellは障害をまぬがれて増殖しhyperplastic noduleを形成する⁷⁾。このhyperplastic noduleが人の肝硬変における再生結節と類似した性質を持つことや、これらの変化が肝癌が発生する以前に認められることから肝硬変モデルとして適しているとされる⁸⁾。そこでこのモデルを用いて障害肝の耐容線量について組織学的側面より検討した。

臨床的には、正常肝においては全肝照射における肝の耐容線量は30~35Gyとされている¹⁾が、肝全体の1/3の照射であれば40Gyでも特に異常を認めなかったという報告⁹⁾や肝の放射線耐容は照射肝容積への依存が大きく部分照射に対する肝の耐容は低くないとの報告も見られる¹⁰⁾。しかしこれらは顕在化した臨床症状をもって評価しており組織的にはもう少し少ない線量で変化が表れると考えられる。Geraciら¹¹⁾は15Gyの全肝1回照射では正常肝のラットは組織学的に異常を認めないと報告している。我々の結果も正常肝群では20Gyでも組織学的に異常所見を認めていない。従って半肝1回照射における組織学的な耐容線量は20Gy以上の線量と考えられる。

一方、障害肝の耐容線量について組織学的側面から検討した報告は見られない。今回の検討では半肝1回

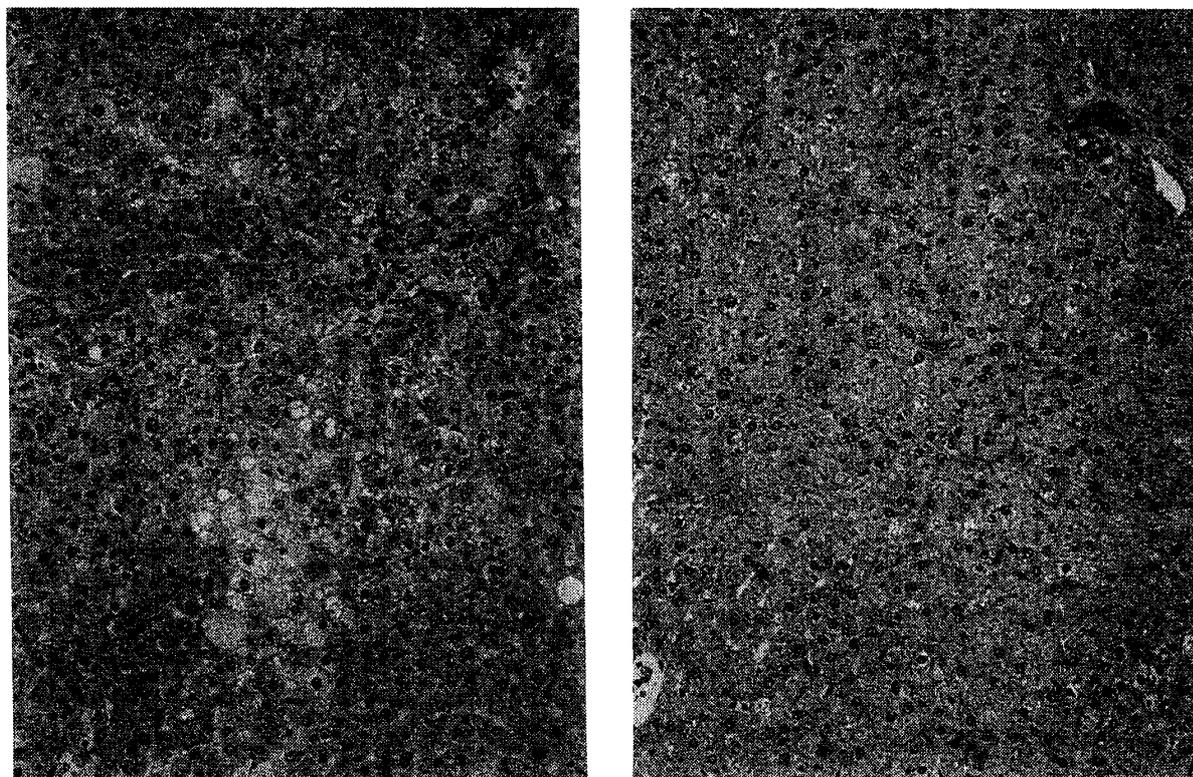


Fig.4 a) 障害肝15Gy照射4週後の組織像(H.E.染色, 20倍)
b) 同一肝非照射部組織像(H.E.染色, 20倍)
照射肝部に非照射肝部よりも強い肝細胞変性壊死, 炎症細胞浸潤を認める。

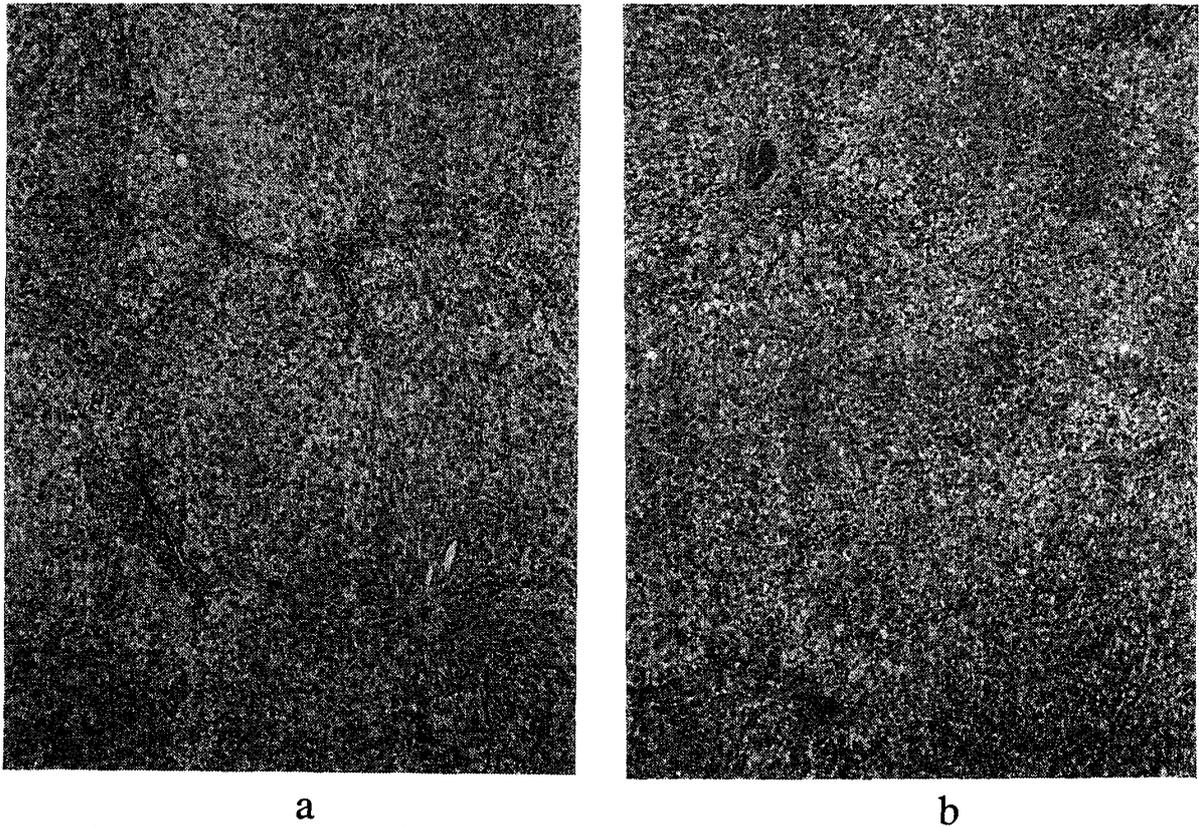


Fig.5 a) 障害肝20Gy照射2週後の組織像(H.E.染色, 10倍)

b) 同一肝非照射部組織像(H.E.染色, 10倍)

照射肝部と非照射肝部に明らかな差は認めないが, 全体にグリソン鞘の線維化, 炎症細胞浸潤が強い。肝細胞変性壊死, 炎症細胞浸潤も強く認める。

Table3. 障害肝群: 照射線量と組織学的変化の差

照射線量	照射2週後		照射4週後		死亡 (1週間以内)
	あり	なし	あり	なし	
10Gy群 (n=6)		3		3	
12Gy群 (n=6)	1	2	1	2	
15Gy群 (n=6)		3	1	1	1
20Gy群 (n=6)		2			4

照射では10Gyまでは照射肝部と非照射肝部との間に明らかな差を認めなかった。12Gy照射群では照射2週間後と4週間後それぞれ3例中1例に照射肝部のほうにより強い肝細胞の変性壊死, 炎症細胞浸潤を認め, 障害肝においては10Gyまでは耐容と考えられた。それ以上の線量である15Gy, 20Gyを照射した障害肝群では致死例を認めた。しかし死亡例の肝の組織学的検討では明らかな死亡原因は証明されなかった。

Geraciら¹²⁾はラット30Gy全肝照射後の死亡原因は腸内細菌による敗血症とendotoxemiaであると報告している。しかし同線量を照射した正常肝群には死亡例がなかったことより照射前からの肝障害の存在が悪影

響したものと考えられる。

20Gy照射の生存例では照射肝部と非照射肝部との間に明らかな変化の差を認めなかったが, 全体に15Gy照射群よりもグリソン鞘の炎症細胞浸潤及び線維化が強くみられた。

この理由として照射部障害の非照射領域への影響が考えられる。野村²⁾は正常家兎を使用した実験で半肝一回照射において5000R以上の照射では非照射肝葉にも二次的变化を認めたと報告している。放射線肝炎は病理学的にはvenc-occlusive diseaseで説明づけられ^{13) 14)}, 照射部で強い変化が起これば起こるほど血管閉塞による影響が照射野外に広がる可能性を推測している。

照射の影響の評価時期について野村²⁾は可逆的变化は4週間には修復され認めなかったと報告している。したがって, 急性期の変化終了の評価時期として照射後2週間後, 恒久的変化開始の評価時期として照射後4週間後とした。同線量照射後2週間後と4週間後の比較では正常肝群は明らかな差を認めなかったが, 障害肝群では4週間後のほうが変化が強い例がみられた。2週間後が4週間後より変化が強い例は認めなかった。このことは放射線による不可逆的な組織学的変化は経時的に進行することを示唆すると考える。一方障害肝

群の12Gy以上照射群で照射肝部と非照射肝部との間に明らかな差を認めなかった例もみられた。この理由として評価時期が早すぎた可能性が考えられる。照射後100日まで観察することにより経時的な肝重量の減少が見られたことが報告されており¹¹⁾、もっと長期に観察を行えば組織学的な変化の差が認められたかもしれない。

今回の検討では障害肝の作成をラットの自然摂取にまかせたため、飼料の摂取量の差によって肝障害の程度に個体差がでると考えられた。そのため同一個体間の比較つまり同一肝の照射部と非照射部とを比較することとした。そのため線量によっては照射部と非照射部の明瞭な境界が認められるかどうかとも検討したが一例も認められなかった。その理由として1, 電子線の側方への広がりのため照射境界が不明瞭となった。2, 照射野の変化自身が均一に起こるのではなく散在性に変化が見られたこと 3, veno-occlusive diseaseによる照射野外への影響の波及等が考えられた。

今回は一回照射について検討したが今後は多分割照射の検討が必要である。また照射容積と耐容線量の関係、障害の評価の時期や、その方法として血液データ等による検討が必要と考えられる。

【結 論】

- 1) Dimethylaminoazobenzene配合飼料でラットに肝硬変を作成し、障害肝における放射線耐容線量について組織学的に検討した。
- 2) 半肝1回照射では正常肝では20Gyでも耐容であるが、障害肝の耐容線量は10Gyまでと考えられた。したがって障害肝は正常肝よりも耐容線量が低いと考えられる。
- 3) 障害肝群の12Gy以上照射例では照射肝部に非照射肝部より強い組織学的変化が残る例があり、15Gy以上では致死例を認めた。正常肝群には死亡例が無いことより死因は照射前の肝の耐容低下の関与が考えられた。
- 4) 障害肝20Gy照射群では照射部と非照射部に明らかな差が見られなかったが、12Gy, 15Gy群と比べて全肝にグリソン鞘の組織学的変化が強かったことより、照射野外に照射による影響が及んでいる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導いただきました今中一文先生、玉岡康志先生、並びに御協力をいただきました

た神戸大学放射線医学教室の諸先生方、高エネルギー診療棟の放射線技師さんに深く感謝いたします。尚、本研究は、文部省科学研究費（奨励研究A課題番号07770740）の補助をうけた。本論文の要旨は日本放射線腫瘍学会第9回学術大会（京都）で発表した。

文 献

- 1) Ingold, J.A., Read, G.B., Reed, G.B., Kaplan, H.s. and Bagshaw, M.A.: Radiation Hepatitis. *Am. J. Rentgenol.* 93 : 200 - 208, 1965.
- 2) 野村節夫: 肝部分的照射に関する研究. *広大医誌*, 16 : 993-1043, 1968.
- 3) 有井滋樹, 高三秀成, 高橋修一, 金清一, 魚住隆雄, 戸部隆吉: 肝癌に対する術中照射療法の基礎的研究. *日外会誌*, 82 : 739-747, 1981.
- 4) Geraci, J.P. and Mariano, M.S.: Radiation Hepatology of the Rat: The Effects of the Proliferation Stimulus Induced by Subtotal Hepatectomy. *radiat. Res.* 140 : 249 - 256, 1994.
- 5) 槇島敏治, 斉藤英昭, 森岡恭彦: 肝硬変症における創傷治癒障害-DAB肝硬変モデルにおける創部に浸潤するリンパ球の役割について-. *日外会誌*, 92(2) : 144-149, 1991.
- 6) 中谷正史, 今中洋子, 石田常之, 兼古茂夫, 藤原順: 実験ラット肝硬変モデル. *JJPEN*, 7(4) : 683-687, 1986.
- 7) 小野江為則, 森道夫: 実験肝癌の教えるもの. *肝胆膵*, 5(6) : 1207-1212, 1982.
- 8) 小野江為則, 森道夫: 肝癌その癌前駆病変の実験的研究から臨床への示唆. *日消誌*, 76(5) : 1152-1154, 1979.
- 9) Lawrence, T.S., Robertson, J.M., Anscher, M.S., Jirtle, R.L., Ensminger, W.D. and Fajardo, L.F.: Hepatic Toxicity Resulting from Cancer Treatment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31 : 1237-1248, 1995.
- 10) 大原 潔, 菅原信二, 吉田次男, 松枝清, 倉本憲明, 秋貞雅祥: 肝癌集学治療における肝部分照射の放射線耐容. *日本医放会誌*, 50(2) : 146-154, 1990.
- 11) Geraci, J.P., Mariano, M.S. and Jackson, K.L.: Radiation Hepatology of the Rat: Microvascular Fibrosis and Enhancement of Liver Dysfunction by Diet and Drugs.

- Radiat. Res. 129 : 322–332, 1992.
- 12) Geraci, J.P., Jackson, K.L., Mariano, M.S. and Leitch, J.M.: Hepatic Injury after Whole-Liver Irradiation in the Rat. Radiat. Res. 101 : 508–518, 1985.
 - 13) Reed, G.B. and Cox, A.J.: The Human Liver after Radiation Injury A Form of Venous-occlusive Disease. Am. J. Path. 48 : 597–607, 1966.
 - 14) Fajard, L.F. and Colby, T.V.: Pathogenesis of Venous-occlusive Liver Disease after Radiation. Arch. Pathol. Lab. Med. 104 : 584–588, 1980.

Study in Radiation Tolerance of Damaged Liver Induced by
Dimethylaminoazobenzene
—Histological study using Wistar rats—

Kazutaka Izumiyama

Akihisa Kodama

Michio Kono

Department of Radiology, Kobe University School of Medicine

ABSTRACT

We studied to determine the tolerable dose of radiation in damaged liver using Wistar male rats aged 4 weeks. A damaged liver group fed on low-protein animal chow containing 0.07% dimethylaminoazobenzene (DAB) ad libitum. Rats feeding on the chow without DAB served as the normal liver group. In both groups, two rats each underwent irradiation of the right half of the liver with doses of 5Gy, 10Gy, 15Gy, or 20Gy using a 15MeV electron beam. The animals were sacrificed 2 or 4 weeks after irradiation, and the irradiated and non-irradiated parts of the liver were compared histologically with respect to hepatocellular necrosis, the extent of degeneration, and the degree of inflammatory cell infiltration, as well as the degree of inflammatory cell infiltration and fibrosis in Glisson's capsule.

Secondly, in the normal liver group, 6 rats were irradiated with dose of 20Gy, and in the damaged liver group, 6 rats each were irradiated with doses of 10Gy, 12Gy, 15Gy or 20Gy, and the same study was performed. 1) In the normal liver group, no histological differences were seen between the irradiated and non-irradiated parts of the liver even when irradiated with 20Gy dose. 2) In the damaged liver group, there were no differences between the irradiated and non-irradiated parts of the liver in animals given 5Gy or 10Gy. In the 12Gy group, however, one out of three rats each showed more severe changes in the irradiated part at 2 and 4 weeks after irradiation. One out of six rats in the 15Gy group and four out of six rats in the 20Gy group died in the first week after irradiation. In the damaged liver group, a single irradiation of up to 10Gy delivered to one half of the liver was tolerable. At doses of 12Gy or higher, however, irreversible changes occurred in some animals, and deaths occurred at 15Gy or 20Gy. Since even 20Gy was tolerated in the normal liver group, damaged liver showed a lower tolerance than normal liver.