

3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene によるラット肝 発癌過程における γ -Glutamyl Transpeptidase 活性の生化学的, 組織化学的研究

千坂禮靖 金子愛子 伝法公磨
札幌医科大学病理学第2講座 (主任 小野江為則 教授)

Biochemical and Histochemical Study of γ -Glutamyl Transpeptidase during Hepatocarcinogenesis of Rat Fed 3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene

Noriyasu CHISAKA, Aiko KANEKO and Kimimaro DEMPO
Department of Pathology (Section 2), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Onoé)

γ -Glutamyl transpeptidase (γ -GTP) activity in rat livers during 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) carcinogenesis was studied biochemically in comparison with normal adult, neonatal, and fetal livers.

Biochemically, the γ -GTP activity increased in livers after 3'-Me-DAB feeding, and a small peak of activity was observed around the 5th week. Intense reaction products for γ -GTP staining were observed on the apical surface of "oval cells" and in the bile canaliculi of renewed small hepatocytes. After 7 weeks the γ -GTP activity accelerated increasingly with the lapse of time. At the 16th week, the activity was about 30 times higher than that of normal adult livers. Histochemical localization for γ -GTP activity was mainly observed in the bile canaliculi of hepatocytes which constitute the hyperplastic foci and nodules. Intense γ -GTP activity was observed throughout the entire cell membrane of hepatocytes in late nodules and hepatomas with trabecular pattern and occasionally in the cytoplasm of hepatoma cells. The significance of the staining pattern for γ -GTP in the cells of hyperplastic nodules and hepatomas is discussed and is compared with that in developing livers.

(Received January 12, 1982 and accepted February 8, 1982)

1 緒 言

γ -glutamyl transpeptidase (以下 γ -GTP) は Hanes et al¹⁾によって, グルタチオン代謝に必要な酵素として初めて報告された. この酵素は glutamyl 基を γ -glutamylpeptide から他のペプチド, あるいはアミノ酸へ転移する酵素で, glutamyl cycle²⁾を構成し, 細胞膜でアミノ酸の転送に関与していると考えられている. 一方この酵素は生体内の各臓器に広く分布しており, 腎, 脾, 腸などに特に強い活性が認められている³⁾が, 実際の生理学的意義についてはまだ不明な点が多い.

一方, Szczeklik et al⁴⁾, Kokot et al⁵⁾, Rutenburg et al⁶⁾は種々の肝疾患, 特に閉塞性黄疸患者血清中の γ -GTP 活性が著明に上昇することを報告し, γ -GTP

と肝疾患との関係が注目された. また, Fiala et al⁷⁾, Fiala and Fiala⁸⁾は生化学的にラット実験肝癌組織とラット胎児肝組織がともに高い γ -GTP 活性を示すことを明らかにし, γ -GTP が carcinoembryonic な性格を持っていることを報告した. 更にアゾ色素, acetylaminofluorene (以下 AAF) による発癌過程を生化学的に検索し, その早期から γ -GTP 活性が上昇することを認めた. その後 Taniguchi et al⁹⁾, Taniguchi¹⁰⁾はラット肝癌とラット胎児肝の γ -GTP が生化学的にも免疫学的にも同一であり, アゾ色素肝癌発生過程に伴って上昇する γ -GTP も同一であることを確認している. 一方, Kalengayi et al¹¹⁾, Harada et al¹²⁾も aflatoxin B₁, AAF による肝癌発生過程において, 癌のみならず前癌病変と考えられる増生結節に組織化学的に

γ -GTP 活性がみられることを報告した。それ以来 γ -GTP は前癌病変と考えられている早期の enzyme altered foci³²⁾ 及び後期の増生結節に陽性にでてくることから、前癌病変の定量的追跡になくてはならない marker として広く用いられている。

われわれは 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (以下 3'-Me-DAB) によるラット肝癌ならびに前癌病変を α -fetoprotein,¹⁴⁾ cholinesterase,¹³⁾ alkaline phosphatase,¹⁵⁾ 非特異 esterase の isozyme,¹⁶⁾ のひとつ (L-1) 等を marker として生化学的、組織化学的に検索し、程度の差はあるが、いずれも carcinoembryonic な性格を示すこれらの marker が癌病変のみならず前癌病変にも認められることを明らかにしてきた。本研究では 3'-Me-DAB によるラット発癌過程において γ -GTP 活性が生化学的にどの様に変化し、また、組織化学的にみてどの様な意味を持つか検討した。特に Taniguchi et al.¹⁷⁾ はアゾ色素発癌過程初期の α -fetoprotein の一次反応期に γ -GTP 活性が上昇することを述べているが、この点についても明らかにしたい。

2 実験材料及び方法

発癌実験には 150~200 g の Wistar 系雄ラットを 60 匹使用し、うち 50 匹に 0.06% 3'-Me-DAB 含有固型食 (Oriental Co. 製) を投与し、10 匹は対象群として基礎食 (Oriental Co. 製) のみで飼育した。投与開始後 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 14, 16, 20 週にそれぞれ 3~5 匹ずつ、両側頸動脈切断瀉血後肝臓を採取し、各葉から 3 枚ずつの厚さ 2 mm の肝組織を取って形態学的検索に用い、残りを生化学的検索にあてた。

ラット胎児肝は交尾後 16 日、19 日目の妊娠 Wistar 系ラットより採取し、新生児ラット肝は生後 0, 3, 5 日目のものを採取した。

2.1 形態学的検索

2.1.1 ヘマトキシリン・エオジン (以下 HE) 及び periodic-acid-Schiff (以下 PAS) 染色標本作製：肝組織片をカルノア固定し、通常のパラフィン切片 (厚さ 4 μ m) を作製し HE, PAS 染色を行った。

2.1.2 γ -GTP 組織化学切片の作製：肝組織切片は次の 2 つの方法で作った。

a, 肝組織片をドライアイス-アセトンで凍結し、クライオスタートで厚さ 6 μ m の連続切片を作り、室温乾燥後冷アセトン (4°C) で 10 分間固定し、組織化学的染色、HE 染色を行った。

b, 肝組織片を冷アセトン (4°C) で 1 時間固定し、さらにアセトンで 1 時間ずつ 3 回の脱水操作を行った後、

ベンゼンで透徹を行い、パラフィン (融点 52°C-54°C) に包埋した。ミクロトームで厚さ 4 μ m の連続切片を作り、ベンゼンで脱パラフィン後、HE 染色及び次に述べる方法で γ -GTP 組織化学を行った。

2.1.3 γ -GTP 組織化学：Rutenburg et al.⁶⁾ の方法に準じた。反応液は下の通りである。

γ -(L glutamyl)-4-methoxy-2-naphthylamide
または γ -L-glutamyl- β -naphthylamide
(4 mg/ml) 0.5 ml
glycylglycin water solution (20 mg/ml) 0.5 ml
Fast Garnet GBC 15 mg/ml
Tris buffer 0.1 M pH 7.3 10 ml
dist. water 28 ml

※： γ -(L-glutamyl)-4-naphthylamide は水に難溶なので、4 mg の基質に 0.7 ml の dimethylsulphamide と 0.3 ml の 1-N NaOH を加えて γ -(L-glutamyl)-4-naphthylamide を溶かす。

組織切片を上記反応液で 10 分間、37°C にて incubate した後水洗し、グリセリンゼラチンで封入した。

2.2 γ -GTP 活性の定量

0.25 M の蔗糖液で通常 20% の肝ホモジェネートを作った。肝癌組織と結節は実体顕微鏡下で肝組織より分離し、5% ホモジェネートを作った。定量は Fiala et al.⁷⁾ の方法に準じた。基質には γ -glutamyl- ρ -nitroanilide を用い、Tris buffer (0.1 M pH 7.60) 中で 37°C、30 分間 incubate し遊離した ρ -nitroaniline を 410 m μ で比色定量した。1 unit = 1 μ mol ρ -nitroaniline/hr/g wet tissue とした。

3 結果

3.1 肉眼的ならびに光学的顕微鏡所見

3'-Me-DAB 含有固型食投与後の肝組織の変化は従来の報告^{19),20)} と同様であった。飼育後 3 週目では肉眼的にあまり変化は見られず、光顕的にごく軽度の oval cell の増生がグリソン鞘周囲に見られるのみだった。4 週目では oval cell が目立つようになり (Photo 2A), 5 週目では肝表面に浅い陥凹が見られ、その部分では oval cell の増生が顕著であった。oval cell の増生は 5 週でピークとなり、一方では小型肝細胞が oval cell と置き替えるようにグリソン鞘周囲に出現し (Photo 3), 6 週でピークとなったが、その後漸次小型肝細胞は大型化し、形態学的に成熟肝細胞と区別不能となった。6 週以後ではグリソン鞘周囲の oval cell 及び小型肝細胞の増生部に周囲への圧排像を示す小結節性増生巣が現われた (Photos 4A&B)。これらは不規則な配列をとる

好塩基性細胞により構成されていた。この小結節性増生巣は以後、数、大きさともに増加しつづけ、肉眼的に赤白色の結節を形成し、12週では肝組織の大半が結節で占められた (Photo 5)。3'-Me-DAB 投与開始後16週では多数の結節とともに5例中2例に小さな肝癌の形成をみ、20週では5例中5例に肝癌の形成をみた。肝癌の組織型は索状型、腺癌型、低分化型等、多彩であった。3'-Me-DAB 投与後、早い時では5週後、多くは10週を過ぎてから cholangiofibrosis の発生がみられたが、肉眼的には白く固い辺縁の不規則な腫瘤で、光顕的には豊富な結合組織を伴った胆管上皮細胞の増生であった (Photos 8A&B)。

3.2 γ-GTP 活性の生化学的所見

Fig. 1 に見られるように正常肝ホモジェネートでは平均 2 unit であったが、3'-Me-DAB 投与後3、4週では肝組織のγ-GTP 活性は3.2 unit で正常に比べ約60%の活性の上昇がみられた。5週目になるとγ-GTP 活性は11 unit で正常と比べ5.5倍の値を示した。5-7週まではほぼ同様の値を示したが、7週以後γ-GTP 活性は再度上昇しはじめ、16週では60 unit で正常値の30倍という非常に高い値を示した。Fig. 2 に見られるように胎生16日目のラット肝組織でのγ-GTP 活性は28 unit、胎生19日目の活性は120 unit であり、胎生後期により高い活性がみられた。分離した増生結節

では平均 268 unit と正常の130倍もの高い活性を示した。一方、肝癌組織では20 unit と正常値の5倍の活性を持つものから180 unit と正常値の90倍の活性を持つものなど、かなりの幅がみられた。

3.3 γ-GTP 組織化学的所見

3.3.1 γ-GTP 組織化学的手法の検討について：γ-L-glutamyl-ρ-naphthylamide を基質として Rutenburg et al. の方法に準じてγ-GTP 組織化学を行うと、凍結切片、パラフィン切片ともに反応産物の拡散がかなり高度にみられ、毛細胆管、細胞内での局在が不明瞭だった。一方γ-(L-glutamyl)-4-methoxy-2-naphthylamide を基質とした場合、前者と比べ反応産物の拡散は殆どみられず、特にパラフィン切片では極めて明瞭な毛細胆管管腔面への反応産物の沈着がみられた。また、パラフィンブロックでの組織の保存が4°C でよく、組織化学的には少なくとも3年間γ-GTP 活性の低下はみられなかった。以上のようにγ-GTP の組織化学にはγ-(L-glutamyl)-4-methoxy-2-naphthylamide を基質として、パラフィン切片を用いるのが最も適している。

3.3.2 正常肝組織のγ-GTP 組織化学：γ-GTP 活性は主として胆管上皮細胞の内腔面にみられ、肝小葉

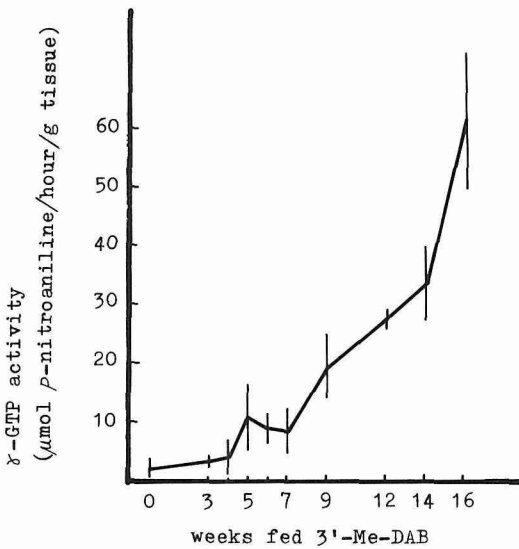


Fig. 1. γ-GTP activity in rat livers during 3'-Me-DAB feeding.

Each point represents average value of 3-4 rats and the vertical bar indicates standard deviation.

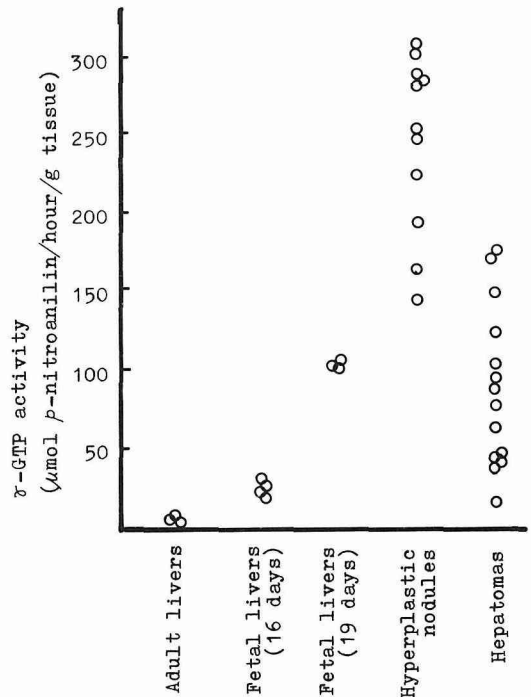


Fig. 2 γ-GTP activity in rat livers, hyperplastic nodules and hepatomas.

ではグリソン鞘周囲の極く一部の毛細胆管にのみ認められた (Photo 1).

3・3・3 3'-Me-DAB 投与ラット肝組織の γ -GTP 組織化学: 3 週目では胆管上皮細胞の内腔面に γ -GTP の活性をみた。他にはわずかにみられる oval cell の管腔面にも活性をみたが、肝細胞には正常肝と同様に γ -GTP 活性は殆ど認めなかった。4 週目では著明に増加した oval cell の管腔面に γ -GTP 活性がみられ、グリソン鞘を中心とした放射状の配列がみられた (Photos 2A&B)。5~7 週では oval cell から移行したと考えられる小型肝細胞の毛細胆管にも活性が認められた (Photo 3)。この時期でも活性のみられる毛細胆管は、グリソン鞘を中心として放射状に配列していたが、正常肝細胞へと成熟するに従い活性は低下し、8 週ではこのような活性を示す細胞は著明に減少した。前述の周囲への圧排像を示す小結節性増生巣を形成する好塩基性肝細胞の毛細胆管には非常に強い γ -GTP 活性がみられた (Photos 4A&B)。前出の小型肝細胞のグリソン鞘を中心とした放射状パターンとは異なり、増生巣では非常に不規則な拡張した腺管様パターンをとっており、このようなパターンは増生巣全体にみられた。また、この増生巣の類洞面にも時に弱い γ -GTP 活性が認められたが、細胞質には活性はみられなかった。8 週以後では肉眼的に結節の形成を見たが、 γ -GTP 活性は 6 週でみられた増生巣と同様の染色パターンを認め、加えて細胞膜全周にも γ -GTP 活性を認めたが、一方、結節のあるものでは活性のみられない部分が存在した (Photo 5)。

肝癌ではその大半のものは組織化学的に活性の強さならびに分布は様々だった。索状型肝癌では上記の増生結節と同様に毛細胆管類似構造に強い γ -GTP 活性を認めたが、同時に細胞膜全周にわたる活性を認め、時には細胞質にもびまん性に活性がみられた (Photo 6)。未分化肝癌では多くの場合、細胞膜全周、細胞質にびまん性に γ -GTP 活性を認めたが、時には殆ど活性のみられない未分化癌もあった (Photos 7A&B)。cholangiofibrosis でも組織化学的に腺管の内腔面に強い γ -GTP 活性を認めた (Photos 8A&B)。

3・3・4 ラット胎児肝及び新生児肝組織: 胎生 16 日目の胎児肝での γ -GTP 活性は、肝組織全体にみられ、切片で線状あるいは点状に毛細胆管に一致して活性を認めた (Photo 9)。増血巣内の巨核球の細胞質にもびまん性に γ -GTP 活性がみられた。胎生 19 日目の胎児肝での γ -GTP 組織化学は 16 日目と較べ染色性が明らかに高く、肝組織全体に均一にみられ、多数の小突起の

見られる複雑に拡張した毛細胆管に強い γ -GTP 活性がみられた (Photo 10)。この毛細胆管の拡張は出生時で最も著明となったが、このパターンと結節の染色パターン (Photo 4) との間には類似性が見られた。生後 3 日目の肝組織では出生時の肝組織と同様に毛細胆管に活性を認めたが、小葉中心部では γ -GTP 活性の消失がみられた (Photo 11)。生後 5 日目の新生児肝では、ほとんど肝細胞には γ -GTP 活性はみられなかった。

考 察

以上のようにわれわれはラットの 3'-Me-DAB による肝癌形成過程において既に前癌期から肝組織の γ -GTP 活性の上昇がみられ、これが oval cell を主体とする胆管系細胞の増生と、増生結節を形成する肝細胞に由来することを組織化学的に確めた。以下 2, 3 の点について考察する。

4・1 γ -GTP の組織内、細胞内局在について

成熟ラット肝組織では小葉間胆管の上皮細胞、特にその管腔面に強い γ -GTP 活性の局在を認め、その他には門脈周辺の少数の肝細胞の毛細胆管に活性を認めたのみであり、これは Ronchi and Desmet²¹⁾ Harada et al²²⁾ の所見と一致する。一方、19 日目の胎児肝では殆どすべての肝細胞の毛細胆管に活性を認めたが、その染色パターンが成熟肝細胞の ATPase 組織化学でみるような連続した樹枝状パターン¹⁵⁾ を取らず、複雑に拡張したパターンを呈することは毛細胆管そのものの未成熟²²⁾ の反映と考えられる。この活性は生後肝細胞が成熟型に移行するに従って小葉周辺帯に局限するようになり、生後 5 日目では毛細胆管の活性は殆どみられなくなるわけで、以上の所見は従来の研究²³⁾ と一致する所見である。但し、組織内局在には動物の種属差^{18),24)} があることは知られており、以上はラット肝についての所見である。

問題は細胞内局在で、本酵素が Orłowski and Meister²⁾ Bodnaryk²⁵⁾ の研究に見るように膜酵素であり、アミノ酸の転送に関与しているとすれば本研究は Ronchi and Desmet²¹⁾ の組織化学の研究とともに、本酵素が膜酵素であることを裏付けるものであろう。しかし、生化学的研究で γ -GTP 活性が細胞のどの分画に存在するかについては、Harada et al²²⁾、藤沢ら²⁶⁾ は肝細胞のミクロソーム分画に活性の大半を認めており、また、Glennier and Folk²⁷⁾ の腎組織についての研究でも細胞膜分画と同様にマイクロソーム分画に強い活性をみているが、このことは胆管上皮細胞膜、毛細胆管と尿管上皮細胞の微絨毛がいずれもマイクロソーム分画に

混入するためと考えられる。また, Harada et al.¹²⁾は増生結節及び肝癌においてその構成細胞の細胞質にも活性をみているが, これは次に述べるように反応産物の拡散の問題も考えなければならない。即ち今回の組織化学的研究では, 特に凍結切片を用いる場合, 基質の種類により反応産物の著明な拡散をみる場合があり, これを避けるために本実験ではアセトン固定パラフィン切片を用いた。但し, 肝癌細胞についてはわれわれも細胞質にびまん性に活性を認めており, これについては別に論じたい。

4.2 肝癌と γ -GTP

γ -GTP が種々の肝疾患に関して血清中, 肝組織中に上昇することはよく知られているが⁴⁻⁶⁾ 肝癌との関係については Fiala and Fiala⁹⁾は肝癌組織にみられる γ -GTP 活性の上昇は ontogenic reversion の表現であるとしている。即ち胎生期に高かった活性は成熟すると同時に殆ど失なわれるが, 癌化とともにこれが再び発現するわけで γ -GTP は oncodevelopmental gene expression の一例として考えられるわけである。しかし, ここで注意を要するのは, 成熟肝細胞においても胆管上皮細胞は高い活性を維持していることであって, この点で本酵素は肝組織については Onoé et al.¹⁵⁾, Potter¹⁶⁾の主張するように, 胆管系細胞の marker 酵素ともみなし得るわけである。この観点から胎生期肝細胞の示す活性は, これが肝細胞の未熟性の一環として胆管系細胞の分化形質を払拭しきれないことの表現とも理解しうる。更に発生学的見地から考えれば, 小腸の上皮細胞が強い γ -GTP の活性を持っていることを考慮しなければならない。即ち肝癌組織における γ -GTP 活性は carcinofetal の表現であること以外に, 癌細胞の胆管系への, 更に進んで腸粘膜上皮への異分化の表現として理解されるべき側面のあることに注意する必要がある。この後者については Onoé et al.¹⁵⁾, Fuse et al.²⁰⁾, Yoshida et al.²⁹⁾らによるアゾ色素肝癌組織内での腸上皮型癌細胞の出現の報告がある。

4.3 肝癌細胞と γ -GTP 活性の局在について

肝癌細胞では多くの場合に毛細胆管類似構造に強い活性を認める他に, 細胞膜全周にわたり, 更にしばしば細胞質にもびまん性に γ -GTP 活性を認めた。このようなパターンは alkaline phosphatase¹⁵⁾にも認められる所見であって, この plasmalemmal pattern は癌細胞の polarity の喪失の表現と解される。更に細胞質内のびまん性活性は本酵素の生合成局所で, 即ち顆粒小胞体ないし遊離ポリゾームでの活性の発現とみなして良いであろう。これは本酵素蛋白の盛んな合成の表現

とも, また, その細胞質内転送の障害とも受けとれ得るが, おそらく後者の可能性が大きいものと思われる。更に癌細胞内の局在については分化方向の偏倚に伴って変り得ることは当然で, 腸上皮型への分化を示す場合には腺腔面に強い活性を示すわけである。

しかし, もう一つ考えなければならない可能性は反応産物の拡散という問題である。腎に γ -GTP 組織化学を行うと, しばしば細胞質にも活性を認めることがある。しかし γ -GTP の特異抗体を用いての免疫組織化学, 免疫電顕法を行って活性をみると, その局在は細胞質には無く微絨毛の細胞膜面にしかみられないことが佐藤らによって第 61 回北海道医学会腫瘍分科会で報告されている。従って肝癌における細胞質内の局在についても, この可能性はあるわけで, 今後再検討する必要がある。

4.4 前癌病変と γ -GTP

アゾ色素肝癌形成過程で, 早期の特徴的病変の一つである oval cell 増生期に γ -GTP 活性の上昇をみることは, この細胞が胆管系細胞の性格を持っていること^{28),29)}を考えれば当然のことと言えよう。Taniguchi et al.¹⁷⁾がみたアゾ色素飼育ラット 3~5 週頃の生化学的 γ -GTP 活性の上昇は, この oval cell の増生に一致するものである。この細胞は当教室の Inaoka,¹⁹⁾ Iwasaki et al.²⁰⁾, Ogawa et al.³¹⁾の研究が示すように, 急速に肝細胞へと分化するが, 小型肝細胞から成熟肝細胞へと進むにつれて毛細胆管の γ -GTP 活性を次第に失うことは所見に明らかである。

γ -GTP が肝癌形成の marker として有効なことは前述した通りである。即ち前癌細胞の集団は現在は酵素偏倚巢 enzyme altered foci³²⁾として同定できるが, G-6-Pase や ATPase³³⁾が foci で低下する, 言わば negative marker であって, このことを利用して前癌細胞群から肝癌形成への進展の定量的解析がなされている。しかし, こうした研究の多くは γ -GTP 活性を用いてはいるものの, その染色パターンの意味については殆ど触れられていない。増生細胞集団は foci ないし area から nodules へと進展するにつれて ALPase や esterase の isozyme pattern の偏倚の度合^{15),16)}が癌のそれに近づくことは知られているが, この進展は今回の研究でみるように γ -GTP 活性について言えば canalicular pattern から plasmalemmal pattern を伴うものが多くなることによって示されるようである。この際考慮すべきことは canalicular pattern, plasmalemmal pattern の活性を示す γ -GTP が同じ分子種であるかどうかということで, この両者が isozyme²⁶⁾であ

る可能性もある。この点について Taniguchi et al.⁹⁾はラットの腎の γ -GTP に対する特異抗体を作製し、肝癌の γ -GTP が抗原的にみて腎のそれと同一のものであることを報告している。また、Tsuchida et al.³⁴⁾はラットの腹水肝癌及び増生結節から γ -GTP を抽出し、抗原的にこれら3種に差異のないことを報告している。このことは今後検討すべき問題と考える。

5 結 論

ラットの 3'-Me-DAB 投与による肝癌形成過程における肝組織の γ -GTP 活性を生化学的、組織化学的に検索し、この過程で γ -GTP がどのような意味を持つか検討した。3'-Me-DAB 投与後 4~5 週でみられる生化学的な γ -GTP 活性の上昇は oval cell とそれにより生ずる小型肝細胞によることが明らかに示された。このことは γ -GTP が胎児性々格を持っていることの現れと考えられた。7 週以後の生化学的 γ -GTP 活性の上昇は主として増生結節と肝癌に由来するが、増生結節においても γ -GTP 活性がみられることは、癌と同様に増生結節が胎児性性格を持ったためと考えられる。組織化学的にみて結節では毛細胆管の他、細胞膜にも γ -GTP 活性がみられ、肝癌では毛細胆管類似構造、細胞膜全周、更に細胞質にも活性を認めたが、時には活性を殆んど示さないものなど、癌の分化に応じた γ -GTP 活性の局在に違いがみられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、御指導いただきました札幌医科大学病理学第2講座小野江為則教授、ならびに森道夫助教授に深い感謝の意を表します。また、御協力いただきました病理学第2講座の諸氏に厚く御礼申し上げます。尚、本研究の内容は、第35回日本癌学会で発表した。

References

- Hanes, C. S., Hird, F. J. R. and Isherwood, F. A.: Synthesis of Peptides in Enzymic Reactions Involving Glutathione. *Nature* **166**, 288-292 (1950).
- Orlowski, M. and Meister, A.: The γ -glutamyl cycle: A possible transport system for amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 1248-1255 (1970).
- Goldberg, J. A., Friedman, O. M., Pineda, E. P., Smith, E. P., Chatteji, R., Stein, E. H. and Rutenburg, A. M. The colorimetric determination of γ -glutamyl transpeptidase with a synthetic substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* **91**, 61-70 (1960).
- Szczeklik, E., Orlowski, M. and Szezuk, A.: Serum γ -glutamyl transpeptidase in liver disease. *Gastroenterology* **41**, 353-359 (1961).
- Kokot, F., Kuska, J., and Maraszek, J.: Die Bedeutung der γ -Glutamyltranspeptidase in der klinische Diagnostik. *Z. Gesamte Inn. Med.* **18**, 851-852 (1963).
- Rutenburg, A. M., Pineda, E. P., Fischbein, J. and Goldberg, J. A.: A study of serum peptidases in anicteric patients with cancer. *Cancer* **17**, 781-784 (1964).
- Fiala, S., Fiala, A. E. and Dixon, B.: γ -Glutamyl transpeptidase in transplantable, chemically induced rat hepatomas and spontaneous mouse hepatomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **48**, 1393-1401 (1972).
- Fiala, S. and Fiala, A. E.: Acquisition of embryonal biochemical feature in rat hepatomas. *Experientia* **26**, 889-890 (1970).
- Taniguchi, N., Saito, K. and Takakuwa, E.: γ -Glutamyl transpeptidase from azo dye induced hepatoma and fetal rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **391**, 256-270 (1975).
- Taniguchi, N.: Purification and properties of γ -glutamyl transpeptidase from azo dye induced hepatoma. *J. Biochem.* **75**, 473-480 (1974).
- Kalengayi, M. M. R., Ronchi, G. and Desmet, V. J.: Histochemistry of gamma-glutamyl transpeptidase in rat liver during aflatoxin B₁ induced carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 579-588 (1975).
- Harada, M., Okabe, K., Shibata, K., Masuda, K. and Enomoto, M.: Histochemical demonstration of increased activity of γ -glutamyl transpeptidase in rat liver during hepatocarcinogenesis. *Acta Histochem.* **9**, 168-179 (1976).
- Dempo, K., Chisaka, N., Yoshida, Y., Kaneko, A. and Onoé, T.: Immunofluorescent study on α -fetoprotein-producing cells in the early stage of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene carcinogenesis. *Cancer Res.* **35**, 1282-1287 (1975).
- 横山繁昭, 金子愛子, 伝法公磨, 千坂礼靖, 森道夫: 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene によって誘発したラット肝癌の Butyrylcholinesterase 活性についての組織化学的及び細胞化学的研究。札幌医誌 **47**, 309-320 (1978).
- Onoé, T., Kaneko, A., Yoshida, Y., Dempo, K., Chisaka, N., Yokoyama, S. and Ogawa, K.: Histochemical and biochemical studies on carci-

- nofetal proteins during 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene hepatocarcinogenesis. In: Fishman, W. H. and Sell, S.: Onco-developmental gene expression. pp.227-236, Academic Press, New York, (1976).
16. 賀来享, 金子愛子, 伝法公麿, 森道夫: 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene 肝癌形成過程の増生結節の性格. 札幌医誌 **48**, 336-347 (1979).
 17. Taniguchi, N., Tsukada, Y., Mukuo, K. and Hirai, H.: Effect of hepatocarcinogenic azo-dyes on glutathione and related enzymes in rat liver. *Gann* **65**, 381-387 (1974).
 18. Rutenburg, A. M., Kim, H., Fischbein, J. W., Hanker, J. S., Wasserkrug, H. L. and Seligman, A. M.: Histochemical and ultrastructural demonstration of γ -glutamyl transpeptidase activity. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 517-526 (1969).
 19. Inaoka, Y.: Significance of so-called oval cell proliferation during azo-dye hepatocarcinogenesis. *Gann* **58**, 355-366 (1967).
 20. Fuse, Y., Motoya, M., Iwasaki, T., Dempo, K. and Onoé, T.: Liver tumors induced in rats by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Tumor Res.* **3**, 111-134 (1968).
 21. Ronchi, G. and Desmet, V. J.: Histochemical study of so-called "marker enzymes of cholestasis" during extrahepatic bile duct obstruction in the rat. *Beitr. Path.* **150**, 213-226 (1973).
 22. Wolf-Peeters, C. De., Vos, R. De., Desmet, V., Bianchi, L. and Rohr, H. P.: Electron microscopy and morphometry of canalicular differentiation in fetal and neonatal rat liver. *Exp. Mol. Pathol.* **21**, 339-359 (1974).
 23. Muller, E., Colombo, J. P., Peheim, E. and Bircher, J. B.: Histochemical demonstration of γ -glutamyl transpeptidase in rat liver after portocaval anastomosis. *Experientia* **30**, 1128-1129 (1974).
 24. Albert, Z., Rzucidlo, Z. and Starzyk, H.: Comparative biochemical and histochemical studies on the activity of gamma-glutamyl transpeptidase in the organs of fetus, newborns and adult rats. *Acta Histochem.* **37**, 34-39 (1970).
 25. Bodnaryk, R. P.: Membrane-bound γ -glutamyl transpeptidase. Evidence that it is a component of "amino acid site" of certain neutral amino acid transport systems. *Can. J. Biochem.* **50**, 524-528 (1972).
 26. 藤沢冽, 栗原宜夫, 田中建一, 木村篤人, 小倉和雄, 富家孝, 田中貢: γ -グルタミルトランスペプチダーゼ. 最新医学 **29**, 1736-1744 (1974).
 27. Glenner, G. G. and Folk, J. E.: Glutamyl peptidases in rat and guinea pig kidney slices. *Nature* **192**, 338-340 (1961).
 28. Potter, V. R.: Phenotypic diversity in experimental hepatomas: Concepts of partially blocked ontogeny. *Brit. J. Cancer* **38**, 1-23 (1978).
 29. Yoshida, Y., Kaneko, A., Chisaka, N. and Onoé, T.: Appearance of intestinal type of tumor cells in hepatoma tissue induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **38**, 2753-2758 (1978).
 30. Iwasaki, T., Dempo, K., Kaneko, A. and Onoé, T.: Function of various cell populations and their characteristics during azo-dye carcinogenesis. *Gann* **63**, 21-30 (1972).
 31. Ogawa, K., Minase, T. and Onoé, T.: Demonstration of glucose 6-phosphatase activity in the oval cells of rat liver and the significance of the oval cells in azo dye carcinogenesis. *Cancer Res.* **34**, 3379-3386 (1974).
 32. Pitot, H. C., Barsness, L. and Kitagawa, T.: Stages in the process of hepatocarcinogenesis in rat liver. In: Sloga, T. J., Sivac, A. and Boutwell, R. K.: *Carcinogenesis* **2**, pp.433-442, Raven Press, New York, (1978).
 33. Scherer, E. and Emmelot, P.: Kinetics of induction and growth of precancerous liver-cell foci and liver tumor formation by diethylnitrosamine in the rat. *Eur. J. Cancer* **11**, 689-701 (1975).
 34. Tsuchida, S., Hoshino, A., Sato, T., Ito, N. and Sato, K.: Purification of γ -glutamyl transpeptidases from rat hepatomas and hyperplastic hepatic nodules, and comparison with enzyme from rat kidney. *Cancer Res.* **39**, 4200-4205 (1979).
-
- 別刷請求先:
 (〒 060) 札幌市中央区南 1 条西 17 丁目
 札幌医科大学病理学第 2 講座 伝法公麿

Explanation of Photographs

- Photo 1** Normal rat liver stained for γ -GTP. $\times 160$: The activity is seen in the apical border of the bile ducts and in the bile canaliculi of periportal hepatocytes (arrow). B : Bile duct.
- Photo 2** The liver of rat fed azo-dye for 4 weeks.
- A. A section stained for HE. $\times 160$: Proliferation of so-called oval cells is seen around the periportal area (arrow). C : Central vein.
- B. The γ -GTP activity in the same specimen. $\times 160$: The activity is located in the apical border of the oval cells, but none in the hepatocytes.
- Photo 3** The liver of rat fed azo-dye for 6 weeks. A section stained for γ -GTP. $\times 120$: The intense activity is seen in the bile canaliculi of the small hepatocytes. No activity is recognizable in the cytoplasm and in the sinusoidal wall of plasma membrane. C : Central vein. G : Glisson's sheath.
- Photo 4** The liver of rat fed azo-dye for 9 weeks.
- A. A section stained for HE. $\times 160$: A small focus of basophilic hepatocytes is seen in the center of this photograph.
- B. γ -GTP activity in the same specimen.: The intense activity is located in the bile canaliculi of the focus. Note the weak activity in the plasma membrane of some hepatocytes (arrow).
- Photo 5** Hyperplastic nodules from a rat liver fed azo-dye for 12 weeks. A section stained for γ -GTP. $\times 80$: The left nodule show the intense activity in bile canaliculi and the whole plasma membrane of hepatocytes, while the right nodule shows the weak activity with an irregular patchy distribution.
- Photo 6** Hepatoma with a trabecular pattern induced azo-dye feeding for 16 weeks.
- A. A section stained for HE.
- B. The γ -GTP activity in the same specimen. In addition to bile canaliculus pattern the intense activity is seen in the whole plasma membrane and the cytoplasm (arrow) of the hepatoma cells.
- Photo 7** Hepatomas with anaplastic patterns induced by azo-dye for 20 weeks. Sections stained for γ -GTP $\times 160$
- A. The activity is seen in the cytoplasm and the whole plasma membrane of hepatoma cells.
- B. There is no recognizable activity in hepatoma cells.
- Photo 8** Cholangiofibrosis induced by azo-dye feeding for 12 weeks.
- A. A section stained for HE. $\times 120$: Proliferation of ductal cells is seen in the abundant fibrous tissue.
- B. The γ -GTP activity in the same specimen. $\times 120$: The activity is located in the apical border and the lateral membrane of the ductal cells.
- Photo 9** The fetal liver on the 16th day of gestation. A section stained for γ -GTP. $\times 240$: The γ -GTP activity is located in the bile canaliculi of some hepatocytes.
- Photo 10** The fetal liver on the 19th day of gestation. A section stained for γ -GTP. $\times 160$: The activity is located in the irregularly dilated bile canaliculi of hepatocytes. This staining pattern is similar to that of the hyperplastic nodules. (Photos 4 & 5).
- Photo 11** The neonatal liver 3 days after birth. A section stained for γ -GTP. $\times 120$: The intense activity is seen in the bile canaliculi of hepatocytes in the periportal area. Note the weak activity in hepatocytes in the central area. C; Central vein. P : Portal vein.

