
原 著

肝細胞癌の肝内浸潤および肝内転移様式：蛍光染色肝癌
細胞を用いた正常肝および硬変肝における検討

奈良県立医科大学第3内科学教室

山崎 正晴

INTRAHEPATIC INVASION AND METASTASIS OF
HEPATOCELLULAR CARCINOMA: ANALYSIS IN THE NORMAL
AND CIRRHOTIC LIVER USING FLUORESCENT DYE-LABELED
HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS

MASAHARU YAMAZAKI

Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received October 14, 1998

Abstract: Despite intensive efforts in the treatment of hepatocellular carcinoma (HCC), its prognosis still remains poor mainly because of intrahepatic metastasis. In the majority of cases, HCC is found in conjunction with liver cirrhosis. It is, therefore, of great importance to investigate the invasive and metastatic behavior of HCC not only in the normal liver but also in the cirrhotic liver. To examine this, a liver cirrhosis model was produced by injecting thioacetamide intraperitoneally into mice. Murine HCC cells were labeled with the fluorescent carbocyanine dye, DiI, and implanted directly under the capsule of the cirrhotic and normal liver of syngeneic mice. Optimal conditions are described for labeling HCC cells with DiI. DiI-labeled HCC cells in the liver were observed under fluorescent and confocal microscopy. Histological analysis of the cirrhotic and normal liver revealed that implanted HCC cells migrated to and invaded the adjacent periportal regions, but not the adjacent centrilobular areas. This characteristic behavior of HCC was more evident in the cirrhotic liver compared to the normal liver. Furthermore, intrahepatic metastasis to unimplanted hepatic lobes was observed in the cirrhotic liver as early as 7 days after the implantation, while it was not detected in the normal liver even 4 weeks later. Thus, an orthotopic animal model for HCC with cirrhosis described here may be suitable for investigating the invasive and metastatic behavior of HCC. Furthermore, it is also indicated that labeling tumor cells with a fluorescent dye followed by orthotopic implantation may be a convenient and useful method to investigate the invasive and metastatic behavior of various types of cancer. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 49, 421~436, 1998)

Key words: hepatocellular carcinoma, invasion, intrahepatic metastasis, liver cirrhosis, fluorescent dye

結 言

原発性肝腫瘍には種々の組織学的サブタイプが存在するが、肝細胞癌(肝癌)の占める割合が約90%と群を抜いている¹⁾。世界的にみれば毎年25万人から100万人が新たに肝癌に罹患しており、その男女比は約4:1とされている²⁾。本邦においても肝癌は増加の一途をたどっており、年間約2万7千人が肝癌により死亡し、悪性新生物による死因別順位では男性の第3位、女性の第4位を占めている³⁾。森定ら⁴⁾の報告によれば、2015年の時点における肝癌による粗死亡率は、このまま何ら対策を講じなかった場合には、1990年のそれに比し約70%増加すると予測されている。

肝癌の予後が不良である原因としては、「傷害肝を発生母地に異なるクローンが発生する「多中心性発癌」と、肝内の他の部位への転移である「肝内転移」が挙げられる。特に肝内転移は、他臓器への転移に比しより早期にかつ高率に発生することが報告されている⁵⁾。肝癌患者への肝移植例においても、肝再発(転移)が早期より高率に認められること⁶⁾から、肝癌においては肝臓そのものが転移の主な標的臓器であるという特異性が指摘される。本邦では肝癌患者の大多数は慢性肝疾患を合併しており、特に肝硬変の合併は肝癌切除例で約70%、肝癌剖検例で約85%と報告されている^{7,8)}。このことから慢性肝疾患、特に肝硬変は肝癌の発生母地と考えられている。

ところで、初期肝癌の肝内発育・進展様式に関しては、手術時の摘出標本を組織学的に検討した報告⁹⁾や、肝癌の浸潤過程における細胞接着分子、細胞外マトリックス、さらに転移抑制遺伝子の発現が検討されているが¹⁰⁻¹²⁾、肝癌の肝内浸潤様式および肝内転移様式に関しては未だ不明な点が多い。そこで著者は本研究において、マウス由来の肝癌細胞を蛍光色素である1, 1'-dioctadecyl-3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI)で標識し、肝癌の浸潤および肝内転移様式を検討した。DiIは細胞内の疎水性の構造物に結合し、*in vitro*のみならず*in vivo*においても安定で代謝を受けず、さらに細胞から拡散しないことが確認されている¹³⁻¹⁵⁾。本研究において著者はまず、マウス肝癌細胞をDiI染色する際の至適条件を検討した。次に、DiI染色したマウス肝癌細胞を同系マウスの肝被膜下に接種し、肝癌の肝内浸潤および転移様式を経時的に、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡下に観察した。さらに、肝硬変の存在が肝癌の浸潤・転移に及ぼす影響を検討するために、チオアセトアミド(TAA)の腹腔内投与により肝硬変マウスを作製し、DiI染色肝癌細胞の硬変肝における浸潤・転移様

式を同様の方法で観察した。

方 法

1) 肝癌細胞の培養と分離肝細胞浮遊液の調整

BALB/c マウス由来 BNL 1 ME A. 7 R. 1 肝癌細胞¹⁶⁾を10%胎児牛血清(FCS), 0.3 mg/mlのL-グルタミン, 100 unit/mlのアンピシリンおよび100 μg/mlのストレプトマイシンを含むRPMI 1640培養液中で、37°C, 5% CO₂の条件下で培養した。分離肝細胞浮遊液はコラゲナーゼ灌流法¹⁷⁾を改良して調整した。すなわち、6週齢のBALB/c雌性マウス(日本SLC, 浜松)の門脈より0.5 mM EGTA含有リン酸緩衝食塩水(PBS)(pH 7.4)で肝を灌流して完全に脱血した後に、5 mM CaCl₂, 0.05%コラゲナーゼ含有HANKS緩衝液(pH 7.5)で灌流し、直ちに肝を摘出した。摘出した肝をHANKS緩衝液中で細切・濾過した後に、10%FCS添加Williams E培養液に浮遊し、分離肝細胞浮遊液とした。上記操作により、マウス1匹あたり5×10⁶個から1×10⁷個の分離肝細胞を回収し得た。トリパンブルー色素排除法を用いて算出した分離肝細胞の生存率は、約90%であった。

2) 肝癌細胞の蛍光色素染色

蛍光色素であるDiI(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)を99.5%のエタノールで溶解し、2.0 mg/mlの溶液とした。このDiI溶液を0.22 μmのpore sizeを有するfilter(Millipore Corp., Bedford, MA)で濾過し、細胞に添加する直前に超音波処理した。培養肝癌細胞を0.025%のトリプシン溶液に分散した後に、HANKS緩衝液で5×10⁶個/mlの単一細胞浮遊液に調整した。この細胞浮遊液に種々の濃度でDiI(5~80 μg/ml)を添加し、10分間に1回の割合で静かに震盪し、37°C, 5% CO₂の条件下で種々の時間(15~120分)染色した。染色後、細胞に取り込まれていないDiIを取り除くためにHANKS緩衝液で3回洗浄した。DiI染色後の細胞生存率は、トリパンブルー色素排除法を用いて算出した。

3) 細胞の蛍光強度の測定

DiI染色後の肝癌細胞を4時間培養し培養皿に付着させ、G励起用ダイクロイックミラーユニットを持つ蛍光顕微鏡(IMT 2-RFC; オリンパス, 東京)で観察した。また、共焦点レーザー顕微鏡(InSIGHTplus-IQ; Meridian Instruments Inc., Okemos, MI)下に50個のDiI染色細胞を無作為に選択し、顕微鏡に付属した解析用ソフトウェアを用いて、細胞1個当たりの平均蛍光強度を定量的に測定した。

4) マウス肝への細胞移植

10 gのトリプルムエタノールと10 mlの抱水アミレ

ンを混合して、100%のAvertinを作成し、等張食塩水にて2.5%に希釈した。この2.5% Avertinをマウスの腹腔内に0.012 ml/g体重の用量で投与し麻酔した後に、正中切開により開腹し肝を露出させ、10 μ lに懸濁した4 \times 10⁶個のDiI染色細胞を26-gauge針付きの10 μ l Hamilton注射器を用いて、肝左外側葉の被膜下に2~3分間かけて接種した。

5) 組織学的検討

マウス6匹をそれぞれ1群として餓死させ、4%パラホルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒド含有PBSを門脈から灌流した後に、肝を摘出した。同じ固定液で摘出した肝を30分間後固定し、マイクロスライサー(DTK-3000; 堂阪イーエム, 京都)を用いて左外側葉と右外側葉から厚さ25 μ mの肝切片を作製した。この肝切片を光学顕微鏡、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡下に観察した。

6) 肝における蛍光強度の測定

移植したDiI染色肝癌細胞の分布をRappaportのzone¹⁸⁾別に評価した。すなわち、DiI染色細胞を接種した左外側葉から作製した肝切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、DiI染色細胞を接種した部位の辺縁から1 mm以内の範囲にある任意の門脈および中心静脈から50 μ mの範囲を囲い込み、それぞれzone 1およびzone 3とした。これらのzone 1およびzone 3領域をそれぞれ20カ所ずつ無作為に選択し、単位面積当たりの平均蛍光強度を測定した。非接種葉である右外側葉から作製した肝切片より任意に20カ所ずつのzone 1およびzone 3領域を選択し、同様の解析を行った。

7) マウス肝硬変モデルの作成

8週齢の雌性BALB/cマウスを室温24 \pm 2 $^{\circ}$ C, 明暗周期12時間の条件下で飼育し、10週齢に達した時点から実験に供した。PBSで溶解した種々の濃度のTAA(0.2~0.6 mg/g体重)(ナカライテスク, 京都)を腹腔内に週2回投与し、マウスの生存率および肝の組織学的変化を経過を追って観察した。対照として、50 μ lのPBSを同様の方法で腹腔内投与した群を用いた。

8) 統計的解析

個々の結果はスチューデントのt-テストを用いて解析した。各群間のP値が0.05未満の場合、統計学的に有意差があると判定した。

結 果

1) 肝癌細胞染色のための至適DiI濃度

肝癌細胞をDiI染色する際の至適条件を決定するために、DiI濃度と染色時間の細胞生存率および蛍光強度に

及ぼす影響を検討した。まず、肝癌細胞を種々の濃度のDiI存在下で37 $^{\circ}$ C, 60分間培養し、細胞1個あたりの蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡下に測定したところ、細胞あたりの蛍光強度は20 μ g/mlのDiI濃度で最大に達し、それ以上にDiI濃度を上げて細胞あたりの蛍光強度は有意に増加しなかった(Fig. 1)。また、同条件下のDiI染色による肝癌細胞に対する傷害性を検討したところ、20 μ g/ml以下のDiI濃度では、細胞は有意な傷害を被らなかったが、40および80 μ g/mlのDiI濃度で染色すると、細胞生存率は有意に低下した(Fig. 2)。

2) 肝癌細胞染色のための至適染色時間

肝癌細胞を20 μ g/mlのDiI存在下に種々の時間培養

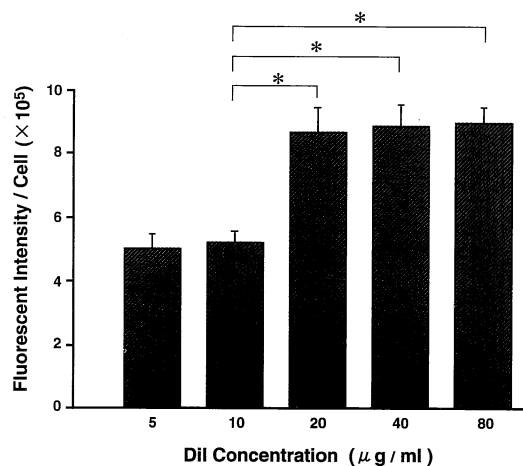


Fig. 1. Effect of DiI concentrations for labeling HCC cells. Murine HCC cells were suspended with the culture medium without serum at a concentration of 5×10^6 cells/ml, and stained by incubating with various concentrations (5-80 μ g/ml) of DiI for 60 minutes at 37 $^{\circ}$ C with gentle agitation at 10-minute intervals. After staining, the cells were washed three times by centrifugation to remove the dye not incorporated in the cells, and resuspended with the complete culture medium. Four hours after plating the cells, 50 cells were selected randomly and gross dye uptake of each cell was quantitated using a confocal microscope. Each bar represents the mean \pm SD of 3 separate experiments. The symbol "*" indicates that the fluorescent intensity of the cell is significantly different compared with that stained with 10 μ g/ml DiI at $P < 0.001$ by Student's *t*-test.

し、細胞当たりの蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡下に測定した。細胞の蛍光強度は60分間で染色時間の延長に伴い増加したが、120分間染色してもさらなる蛍光強度の増加を認めなかった(Fig. 3)。また、20 $\mu\text{g/ml}$ の DiI 存在下で肝癌細胞を120分間まで染色しても、細胞生存率に有意な影響を認めなかった。

3) *in vitro* における DiI 染色肝癌細胞の蛍光性の持続

種々の濃度(5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$)の DiI 存在下で肝癌細胞を60分間培養し、細胞あたりの蛍光強度を経時的に観察した。細胞の蛍光強度は、DiI 染色24時間後では有意な低下を示さなかったが、72時間後では染色時の DiI 濃度に関わらず、細胞あたりの蛍光強度は約30%に減少し(Fig. 4)、DiI 染色7日後には蛍光を発する細胞をほとんど認めなかった。以上の結果により、20 $\mu\text{g/ml}$ の DiI 存在下に60分間培養を行うことが、肝癌細胞に対する至適 DiI 染色条件と判断し、この染色条件を用いて以下の実験を行った。

4) 蛍光顕微鏡下での DiI 染色肝癌細胞の経時的観察

20 $\mu\text{g/ml}$ の DiI 存在下で60分間染色した肝癌細胞を培養し、肝癌細胞内の蛍光色素の局在を経時的に蛍光顕微鏡下に観察した。培養6時間後には核を除く部位にびまん性に蛍光がみられた(Fig. 5A)。培養2日後には細胞質内に蛍光を発する小顆粒が観察され(Fig. 5B)、培養4日後には細胞質内の蛍光を発する小顆粒はより明瞭になったが、細胞質全体の蛍光強度は著明に低下した(Fig. 5C)。この結果は、分離肝細胞を DiI 染色した場合、二次リソソームを含む細胞内小器官に色素が局在したとする Soriano ら¹⁴⁾の報告を支持するものである。さらに、培養7日後には細胞質内の蛍光を発する小顆粒は認められず、細胞の蛍光は消失した。

5) DiI 染色肝癌細胞と非染色肝癌細胞の共培養

DiI が *in vitro* において細胞間を拡散するかどうかを検討するために、DiI 染色した肝癌細胞と非染色肝癌細胞を1:1の割合で混合し、 5×10^4 cells/cm²の密度で60 mm 培養皿に撒き、24時間共培養した後に光学顕微鏡下に細胞を観察した。DiI 染色細胞(Fig. 6A 矢印)と非染色

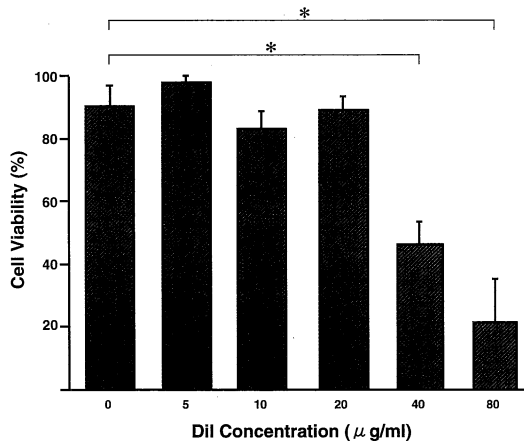


Fig. 2. Cytotoxic effects of DiI on HCC cells. Murine HCC cells were stained by incubating with various concentrations (5-80 $\mu\text{g/ml}$) of DiI for 60 minutes at 37°C with gentle agitation at 10-minute intervals. After staining, cell viability was assessed by trypan blue exclusion. Each bar represents the mean \pm SD of 3 separate experiments. The symbol “*” indicates that the viability of cells is significantly different compared with that incubated without DiI at $P < 0.001$ by Student's *t*-test, respectively.

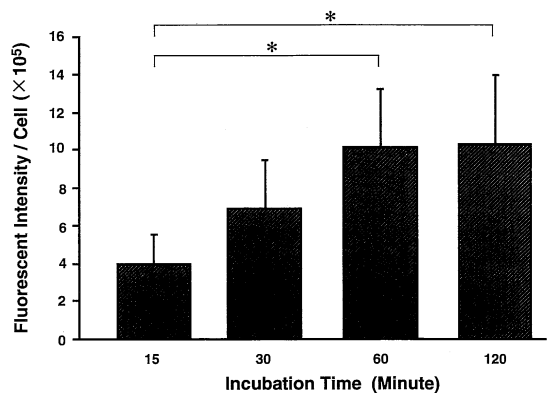


Fig. 3. Effects of incubation time for DiI labeling of HCC cells. Murine HCC cells were stained by incubating with 20 $\mu\text{g/ml}$ DiI for various time periods (15-120 minutes) at 37°C with gentle agitation at 10-minute intervals. Four hours after plating the cells, 50 cells were selected randomly and gross dye uptake of each cell was quantitated using a confocal microscope. Each bar represents the mean \pm SD of 3 separate experiments. The symbol “*” indicates that the fluorescent intensity of the cell is significantly different compared with that incubated for 15 minutes at $P < 0.001$ by Student's *t*-test.

細胞は、形態上に明らかな差異を認めなかったが、蛍光顕微鏡下の観察では両者を明確に区別し得た(Fig. 6B). このことから DiI は、*in vitro* において隣接する肝癌細胞間を移行しないことが示された。

6) 正常肝における肝癌細胞の浸潤様式

DiI 染色したマウス肝癌細胞を同系マウスの肝左外側葉の被膜下に接種し、肝癌の肝内浸潤様式を経時的に検討した。接種3日後では、接種部位に一致して強い蛍光を発する不整形の塊状染色域を認めたが、周囲への浸潤を示唆する所見は認めなかった(Fig. 7A, B). 接種1週間後には、DiI 染色肝癌細胞が接種部位近傍の zone 1 に浸潤する像が観察された。しかし、zone 3 近傍には染色細胞をほとんど認めず、zone 2 においても少数の蛍光細胞を認めるのみであった(Fig. 7C, D). 接種2週間後には多数の DiI 染色肝癌細胞を zone 1 に認めたが、zone 3 にはほとんど認めなかった(Fig. 7E, F). また、DiI 染色肝癌細胞は蛍光顕微鏡下で、つねに周囲の肝組織から明瞭に識別することができ、DiI は *in vivo* においても組織内

に拡散しないことが示唆された。接種4週間後では、接種部位に一致して染色細胞の集簇を認めるとともに、蛍光を発しない肝内転移巣の形成を認めた(Fig. 7G, H).

一方、同系マウスから分離した肝細胞を同様の方法で DiI 染色し、肝左外側葉に接種した場合には、接種4週間後

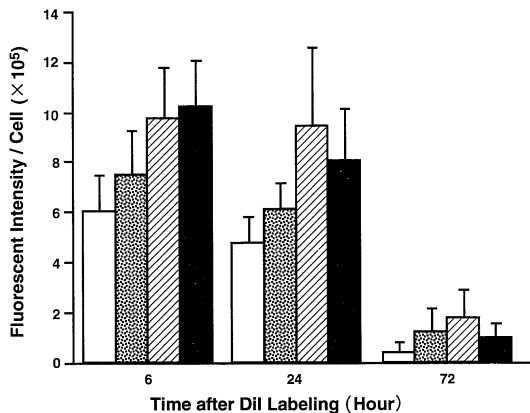


Fig. 4. Duration of fluorescence of DiI-labeled HCC cells *in vitro*. Murine HCC cells were stained by incubating with various concentrations (5–40 $\mu\text{g/ml}$) of DiI for 60 minutes at 37°C with gentle agitation at 10-minute intervals. Six, 24 and 72 hours after plating the cells, 50 cells were selected randomly and gross dye uptake of each cell was quantitated using a confocal microscope. The open bars, dotted bars, diagonally striped bars and closed bars represent the fluorescent intensity of the cell labeled with, 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ DiI, respectively. Values are means \pm SD of 3 separate experiments.

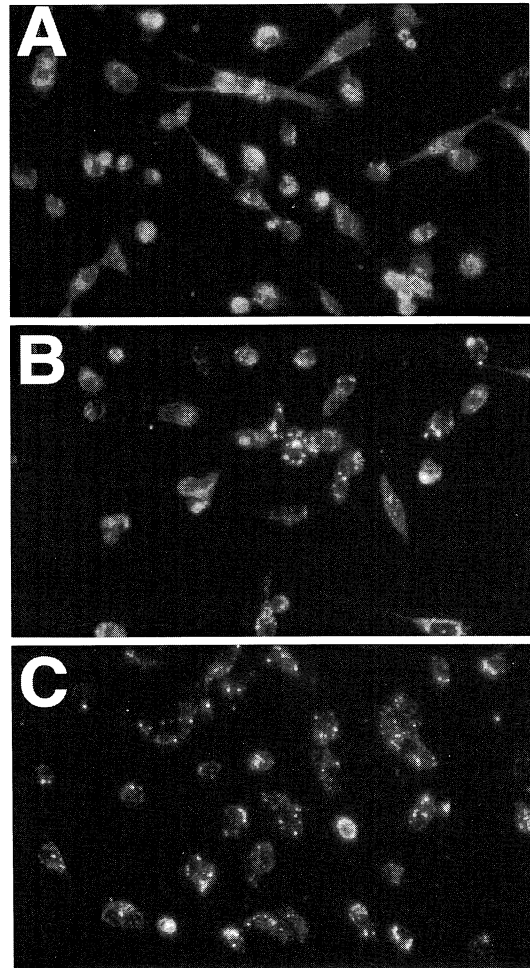


Fig. 5. Fluorescent microscopic appearances of DiI-labeled HCC cells. After staining murine HCC cells with 20 $\mu\text{g/ml}$ DiI for 60 minutes at 37°C, the cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 in air. Six hours (A), 2 days (B) and 4 days (C) after the culture, the cells were directly observed using an inverted fluorescent microscope (Original magnification $\times 200$).

でも DiI 染色肝細胞は周囲への浸潤や転移を示さなかった (Fig. 8A, B).

7) TAA の腹腔内投与によるマウスの生存率

ラットに TAA を経口もしくは腹腔内投与すると肝硬変モデルラットを作製できることはよく知られている^{19,20)}。さらに、0.03% の TAA を含む餌をマウスに経口投与すると、13 ヶ月後にはマウスにおいても肝硬変が発生することが報告されている²¹⁾。今回、著者は TAA の腹

腔内投与によって肝硬変モデルマウスを作製することを企図し、種々の濃度の TAA を腹腔内に投与し、マウスの生存率を経時的に観察した。マウスの体重 1 g 当たり 0.2, 0.4 および 0.6 mg の TAA を腹腔内に週 2 回投与したところ、各群 10 匹のうちそれぞれ 2, 5 および 7 匹のマウスが、TAA の初回投与から 3 日以内に死亡した。最終的に、TAA を 10 週間投与した際のマウスの生存率は、0.2, 0.4 および 0.6 mg/g 体重の TAA 投与群におい

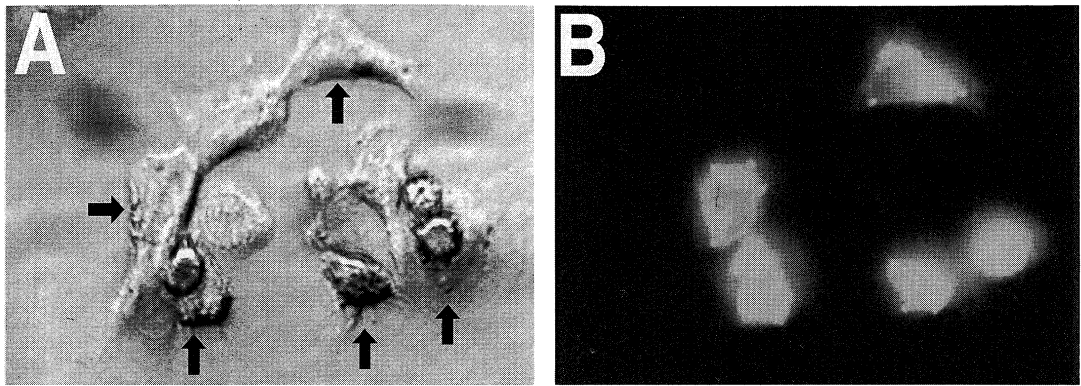


Fig. 6. Coculture of DiI-labeled and unlabeled HCC cells. DiI-labeled and unlabeled HCC cells were mixed at a 1 : 1 ratio and cocultured for 24 hours in a culture dish. Cells were observed under the bright field microscopy (A) and fluorescent microscopy (B). Cells marked by arrows under the bright field microscopy represent those with fluorescence under the fluorescent microscopy (Original magnification $\times 400$).

Fig. 7. Analysis of invasive behavior of DiI-labeled HCC cells in the normal liver. Murine HCC cells were stained by incubating with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DiI for 60 minutes at 37°C. After staining, the cells were resuspended with PBS at a concentration of 4×10^7 cells/ml. Ten-microliter inoculum volumes of the cell suspension were implanted directly into the left-lateral lobe of the liver of syngeneic mice. Each group consisted of 6 animals. Animals were sacrificed three days (A), 1 week (C), 2 weeks (E) and 4 weeks (G) after the implantation, and their livers were sliced into 25- μm -thick sections and observed using an inverted fluorescent microscope. (B), (D), (F) and (H) represent the same field as (A), (C), (E) and (G), respectively, observed under the bright field microscopy. A representative picture is shown in the figure. The letters "CV", "PV", "IS" and "MT" indicate the central vein, portal vein, implantation site and metastatic tumor, respectively (Original magnification [A, B, C, D, E and F] $\times 100$, [G and H] $\times 40$).

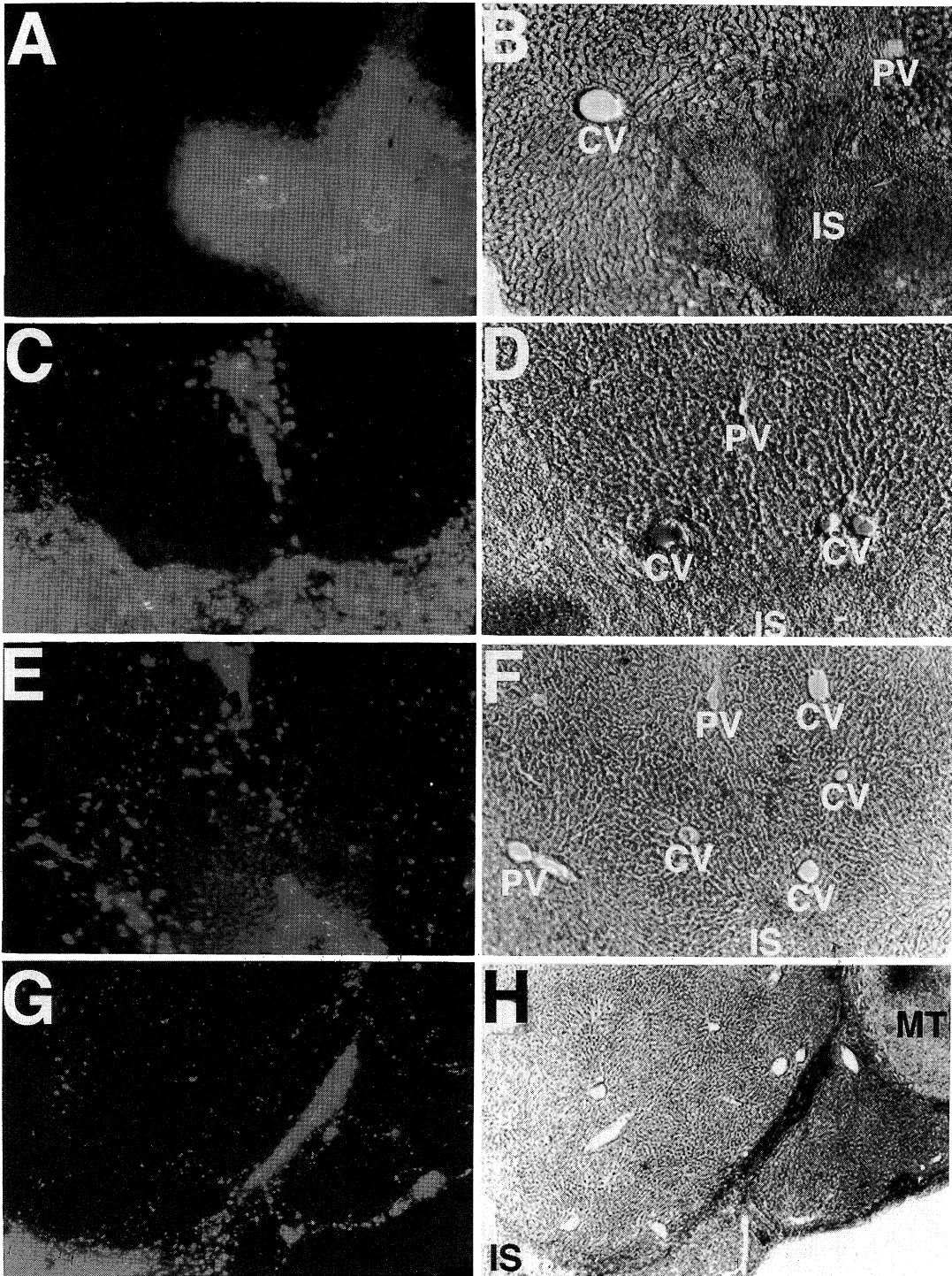


Fig. 7

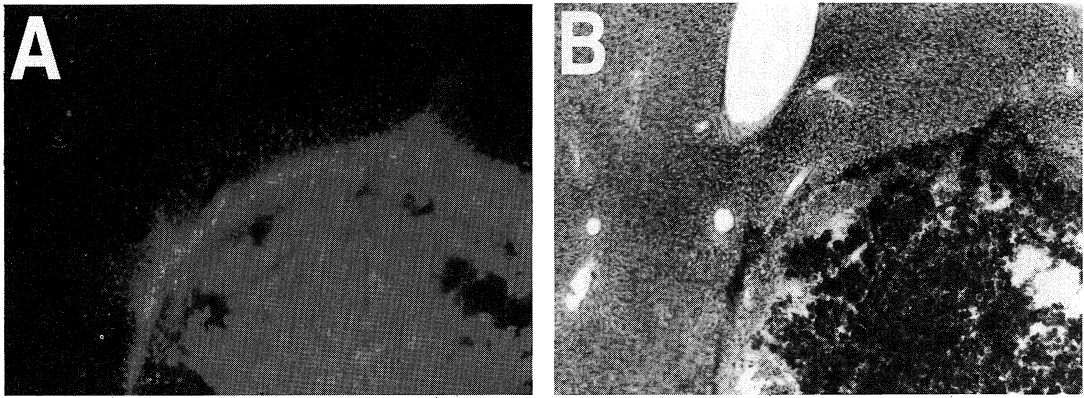


Fig. 8. Analysis of migration of DiI-labeled hepatocytes in the normal liver. Hepatocytes were isolated from syngeneic mice according to standard method and labeled with $20 \mu\text{g/ml}$ DiI for 60 minutes at 37°C as HCC cells were stained. DiI-labeled hepatocytes were then implanted into the left-lateral lobe of the liver of 6 syngeneic mice as HCC cells were implanted. Four weeks after the implantation, mice were sacrificed and their livers were removed. The liver was sliced into $25\text{-}\mu\text{m}$ -thick sections with a microslicer and observed both under the fluorescent microscopy (A) and under the bright field microscopy (B). A representative picture is shown in the figure (Original magnification $\times 40$).

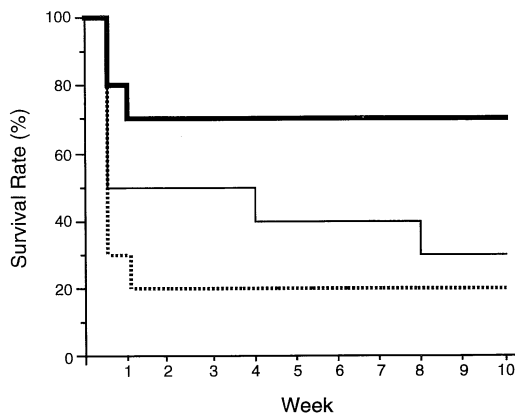


Fig. 9. Survival rate of mice intraperitoneally injected with TAA. Mice received intraperitoneal injections of TAA at doses of 0.2 (bold line, $n=10$), 0.4 (thin line, $n=10$) or 0.6 (dotted line, $n=10$) mg/g body weight twice weekly for 10 weeks.

て、それぞれ 70%、30% および 20% であった (Fig. 9)。なお、PBS 投与を行った対照群の生存率は 100% であった。以上の結果より、マウス体重 1g 当たり 0.2 mg の TAA を週 2 回の割合で腹腔内投与する方法を採択し、以下の実験に使用した。

8) TAA 投与に伴うマウス肝の組織学的変化

TAA 投与 10 週後のヘマトキシリン-エオジン染色による観察では、正常肝でみられる肝細胞の索状配列が消失し、肝細胞の多くが核の膨化を伴った過形成像を呈した。アザン染色では、比較的幅の狭い線維性隔壁が、主として zone 1 に限局して存在しているのが観察された (Fig. 10A)。TAA 投与 20 週後のアザン染色による観察では、線維性隔壁の幅が拡大し、偽小葉が形成され肝硬変の完成を認めた (Fig. 10B)。PBS を週 2 回腹腔内投与した対照群では、肝に炎症や線維化を認めなかった。以上の結果より、0.2 mg/g 体重の TAA を週 2 回の割合で 24 週間腹腔内投与したマウスを肝硬変マウスとして、以下の実験に使用した。

9) 硬変肝における肝癌細胞の浸潤様式

DiI 染色した肝癌細胞を肝硬変マウスの肝左外側葉に接種し、同葉における肝癌細胞の浸潤様式を経時的に検討した。接種 1 週間後では、接種部位に強い蛍光を発する

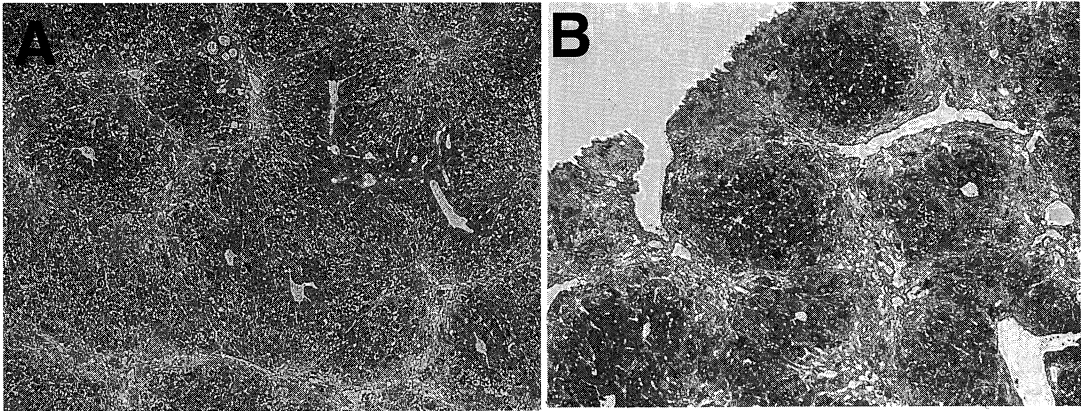


Fig. 10. Histological analysis of the liver of TAA-treated mice. Mice were given intraperitoneal injections of TAA at a dose of 0.2 mg/g body weight twice weekly. After 10- and 20-week administration, animals were sacrificed and their livers were removed for histological analysis. Azan staining of the liver of animals administered with TAA for 10 weeks revealed that the fibrotic septa were thin and predominantly restricted to zone 1 (A). Azan staining of liver sections of animals administered with TAA for 20 weeks revealed that cirrhosis was manifested by thick fibrotic septa transversing the lobular parenchyma and the formation of pseudolobuli (B). A representative picture is shown in the figure (Original magnification $\times 40$).

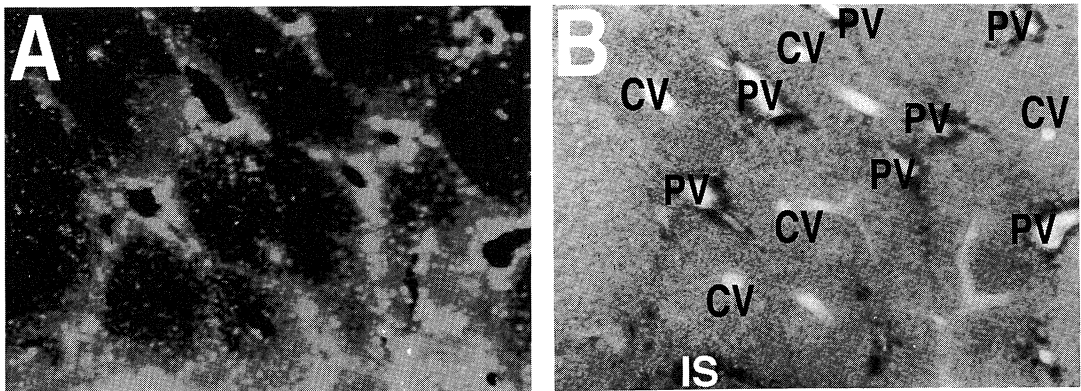


Fig. 11. Intrahepatic invasion of DiI-labeled HCC cells in the cirrhotic liver. DiI-labeled murine HCC cells were implanted directly under the capsule of the cirrhotic liver of syngeneic mice. Intrahepatic invasion of DiI-labeled HCC cells in the liver was observed under the fluorescent microscopy. One week after the implantation of DiI-labeled HCC cells into the cirrhotic liver, an irregular-shaped HCC tumor with intensive fluorescence and marked migration of HCC cells to adjacent zone 1 were observed (A). (B) represents the same field as (A) observed under the bright field microscopy. A representative picture is shown in the figure. The letters "CV", "PV" and "IS" indicate the central vein, portal vein and implantation site, respectively (Original magnification $\times 40$).

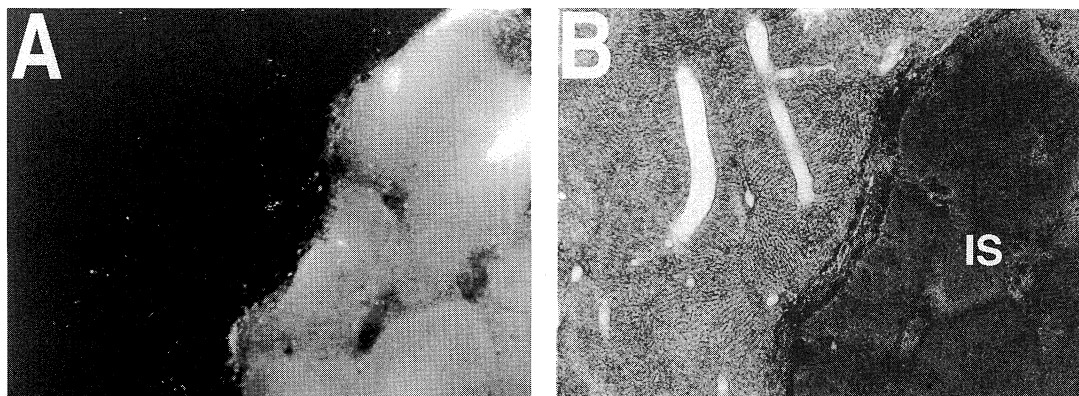


Fig. 12. Migration of DiI-labeled hepatocytes in the cirrhotic liver. DiI-labeled hepatocytes were implanted directly under the capsule of the cirrhotic liver of syngeneic mice. Intrahepatic migration of DiI-labeled hepatocytes was observed under the fluorescent microscopy (A) and bright field microscopy (B). When DiI-labeled hepatocytes were implanted into the cirrhotic liver, DiI-labeled hepatocytes did not show migration or invasion from the implantation site even 4 weeks later (A) (Original magnification $\times 40$).

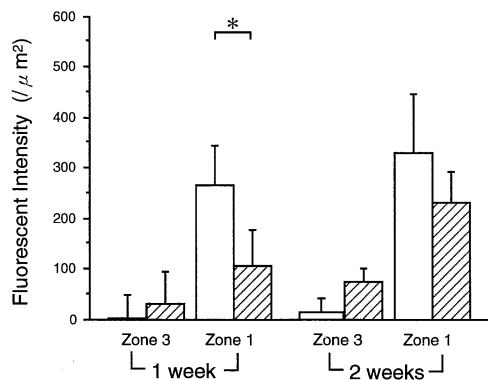


Fig. 13. Quantitative analysis of DiI-labeled HCC cells in the liver. DiI-labeled HCC cells were implanted under the capsule of the normal and cirrhotic liver. One and 2 weeks after the implantation, animals were sacrificed and their livers were sliced into 25- μm -thick sections. At least 20 different areas within 1 mm from the margin of the implantation site of DiI-stained HCC cells were randomly selected both from zone 1 and from zone 3 of each mouse. Each group consisted of 6 animals. Quantitation of DiI-labeled HCC cells in zone 1 or zone 3 was estimated by measuring the fluorescent intensity of each area under the confocal microscopy. The open bars and diagonally striped bars represent the results of cirrhotic and normal mice, respectively. Values are means \pm SD of 6 animals. The symbol “*” indicates that the values are significantly different between groups using Student's *t*-test.

不整形の染色域を認め、近傍の zone 1 に浸潤する多数の肝癌細胞を観察したが、zone 3 へ浸潤する肝癌細胞はほとんど認めなかった (Fig. 11A, B)。さらに、硬変肝における肝癌細胞の zone 1 への浸潤は、正常肝におけるそれと比較すると、より明瞭かつ広範囲に認められた (Fig. 7C, 11A)。同系マウスから得られた分離肝細胞を肝癌細胞と同様に DiI 染色し、硬変肝の左外側葉に接種した場合には、接種 4 週後においても zone 3 のみならず zone 1 に浸潤する肝細胞を認めなかった (Fig. 12A, B)。

10) 正常肝および硬変肝における肝癌細胞の浸潤様式の定量的解析

DiI 染色した肝癌細胞を正常肝および硬変肝の左外側葉の被膜下に接種し、接種部位近傍の zone 1 および zone 3 への肝癌細胞の浸潤を共焦点レーザー顕微鏡下に経時的に観察した。接種部位近傍の zone 1 の蛍光強度は、接種 1 週後および 2 週後において、硬変肝のみならず正常肝においても、zone 3 のそれより高値を示したが、zone 1 の蛍光強度は正常肝に比し硬変肝でより高値を示した。一方、zone 3 の蛍光強度は、正常肝に比し硬変肝でより低い傾向を示した (Fig. 13)。

11) 正常肝および硬変肝における肝癌細胞の肝内転移様式

DiI 染色した肝癌細胞を正常マウスおよび肝硬変マウスの肝左外側葉に接種し、肝右外側葉への転移様式を蛍光顕微鏡下に観察した。正常肝の右外側葉においては、

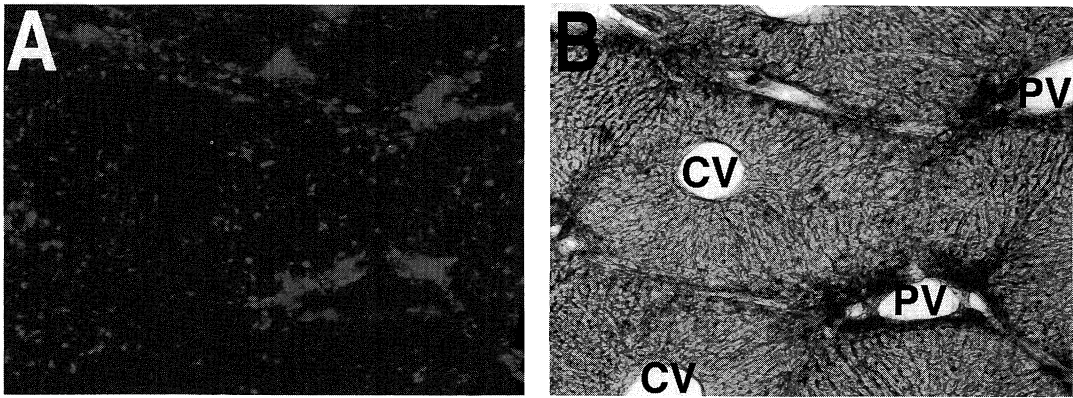


Fig. 14. Analysis of intrahepatic metastasis of HCC in the cirrhotic liver. DiI-labeled murine HCC cells were implanted under the capsule of the left-lateral hepatic lobe of cirrhotic mice. Metastasis of HCC cells to the right-lateral hepatic lobe was examined under the fluorescent microscopy. Clusters of DiI-labeled HCC cells were observed in zone 1 but not in zone 3 of the cirrhotic liver one week after the implantation (A). (B) represents the same field as (A), observed under the bright field microscopy. A representative picture is shown in the figure. The letters “CV” and “PV” indicate the central vein and portal vein, respectively (Original magnification $\times 100$).

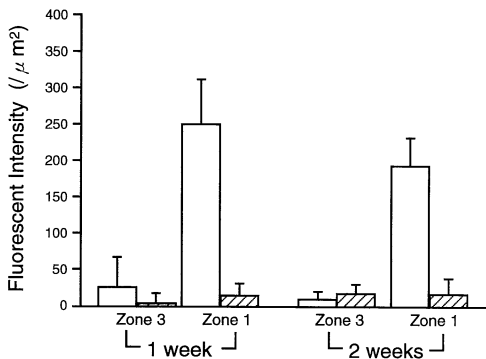


Fig. 15. Quantitative analysis of intrahepatic metastasis of HCC in the normal and cirrhotic liver. DiI-labeled HCC cells were implanted under the capsule of the left-lateral hepatic lobe of normal and cirrhotic mice. One and 2 weeks after the implantation, animals were sacrificed and their right-lateral hepatic lobes were sliced into 25- μm -thick sections. At least 20 different areas were randomly selected both from zone 1 and from zone 3 of each mouse. Each group consisted of 6 animals. Quantitation of DiI-labeled HCC cells in zone 1 or zone 3 was estimated by measuring the fluorescent intensity of each area under the confocal microscopy. The open bars and diagonally striped bars represent the results of cirrhotic and normal mice, respectively. Values are mean \pm SD of 6 animals.

接種 4 週後も DiI 染色細胞を認めなかったが、硬変肝の右外側葉においては、接種 1 週後にすでに zone 1 に転移した DiI 染色細胞の集簇を認めた(Fig. 14A, B).

12) 正常肝および硬変肝における肝癌細胞の転移様式の定量的解析

DiI 染色した肝癌細胞を正常肝および硬変肝の左外側葉に接種し、接種 1 週後と 2 週後に肝右外側葉の肝切片を共焦点レーザー顕微鏡下に観察し、zone 1 および zone 3 での平均蛍光強度を測定した。硬変肝での zone 1 の蛍光強度は接種 1 週後、2 週後とも高値を示したが、硬変肝における zone 3 の蛍光強度、正常肝における zone 1 および zone 3 の蛍光強度は、background の蛍光強度に比し有意差を認めなかった(Fig. 15).

考 察

癌を治療する上での最大の障害は、癌が浸潤し転移するという性質にある²³。肝癌に対する治療法としては、肝動脈塞栓療法、経皮的エタノール注入療法、凍結手術療法、放射線免疫療法や肝移植といった新しい治療法が開発されているにもかかわらず、肝癌の予後は未だ不良である^{23,24}。これらの治療法をもってしても肝癌に対する治療成績が十分でない主な原因としては、治療後に高頻度に発生する肝内転移の存在が挙げられる。近年、肝癌

に対する革新的な治療法として、遺伝子治療の可能性が検討されているが²⁵⁻²⁷⁾、臨床的な観察結果と合致した適切な動物モデルを用いて肝癌の浸潤・転移機構を解明することが、このような新しい治療法を進展させる上で非常に重要である。

種々の癌に対する動物モデルとして、皮下に癌細胞を接種して作製する異所性の腫瘍モデルが頻用されている。この腫瘍モデルは、確立されたヒト由来の癌細胞株や外科的に切除された腫瘍をヌードマウスの皮下に移植することにより、容易に作製することができる²⁸⁾。しかし、皮下腫瘍モデルは、本来の腫瘍と形態学的、生物学的かつ生化学的に近似しているものの、ほとんど転移をおこさないことが指摘されている²⁹⁾。さらに、ヒトの腫瘍細胞をヌードマウスに正所性に移植した場合には、皮下に接種した場合に比し転移率ははるかに増加することが報告されている³⁰⁾。したがって、正所性の腫瘍モデルは、さまざまなタイプの癌の浸潤・転移様式を検討するうえで、より適切なモデルであると考えられる。Sunら³¹⁾は、外科的に摘出されたヒト肝癌の細片をヌードマウスの肝に移植すると、肝癌が肝内を発育・進展し、肝内転移巣を形成することを報告している。しかし、ヌードマウスの肝内において、少数のヒト肝癌細胞を識別することは困難であり、移植後の早期の肝内浸潤や転移の様式については何ら検討されていない。そこで著者は、肝内における肝癌の早期浸潤・転移様式を追跡するために、肝癌細胞を蛍光色素である DiI で染色すれば、単一肝癌細胞をマウスの肝内において識別し得ると考え検討を行った。

DiI は組織内で代謝を受けず、細胞間を拡散しない性質を有することから、神経生物学の分野において、*in vivo*での神経細胞の接合や発育を追跡する目的で広く用いられている³²⁻³⁴⁾。今回の研究では、この蛍光色素を用いて肝癌細胞を細胞傷害性なしに染色できるか、さらに染色した肝癌細胞を肝に移植した際に、その分布を追跡できるかを検討した。その結果、DiI は肝癌細胞に添加後、直ちに細胞内に取り込まれ、20 $\mu\text{g/ml}$ 以下の DiI 濃度では細胞傷害性を示さなかった。また、DiI は肝癌細胞の細胞質内構造物に局在し、*in vitro*のみならず *in vivo*においても隣接する細胞や組織に拡散しないことが示された。

DiI 染色した肝癌細胞を正所性にマウス肝被膜下に接種すると、肝癌細胞接種部位近傍の門脈域(zone 1)に選択的に浸潤することが示された。肝細胞は門脈域で新生され、中心静脈に向かって徐々に移動した後に、中心静脈域でアポトーシスによって排除されるという細胞の流れが肝内には存在する³⁵⁾。本研究で観察された肝癌細胞

の浸潤様式は、正常肝細胞の流れに逆行するものであり、門脈域に向かって浸潤する肝癌細胞の特徴的な動態が、肝内転移巣形成の主要な機序であると考えられる。さらに、この結果は、肝癌は門脈系を介して肝内に転移するという臨床的観察から得られたコンセンサス³⁶⁻³⁸⁾と合致する。肝癌細胞を脾臓や門脈内に移植すると、肝内転移が門脈を介して起こることが報告されている^{36,39)}。しかし、これらの方法では肝癌細胞を末梢の門脈域に播種しており、肝癌の肝内転移が門脈系への浸潤によって発生することを証明する適切なモデルにはなり得ていない。そこで著者は、蛍光染色した肝癌細胞を微量の培養液に懸濁し、肝被膜下に直接接種することによって、肝癌細胞が門脈に向かって浸潤し転移することを明らかにした。この肝癌細胞の特徴的な浸潤様式の詳細な機序については不明であるが、推測される可能性として、肝内の栄養環境の相違が挙げられる。zone 1 は他の zone に比べ栄養価の高い血液の供給を受けており、肝細胞の再生が最初に起こり、肝細胞壊死が最後に起こる領域とされている⁴⁰⁾。細胞の発育に適したこの領域に、肝癌細胞が指向性を持つことは十分に考えられる。もうひとつの可能性としては、肝における組織学的構造の相違が挙げられる。zone 1 は終末傍肝動脈、門脈小静脈および細胆管から成り、結合織の密なネットワークを欠如している⁴⁰⁾。結合織が疎であることが、肝癌細胞の zone 1 への浸潤を容易にする要因のひとつかも知れない。また、肝癌細胞が門脈に浸潤するためには、癌細胞が門脈域の細胞外マトリックスを分解し、門脈内皮細胞と接着し、その基底膜を破壊する過程が必要である。したがって、門脈域におけるマトリックス分解酵素や細胞接着分子などの発現が、肝癌細胞の門脈域への浸潤により適した環境を供している可能性も考えられる。

ところで、肝癌患者の大多数は基礎疾患として肝硬変を有しており、肝硬変の存在が肝癌を治療する際の重大な障害となっている。したがって、硬変肝における肝癌の動態を解析することが、肝癌の浸潤・転移様式を知るうえでも、肝癌に対する新しい治療法の基礎的検討を行ううえでも重要であると考えられる。本研究において著者は、TAA をマウスに腹腔内投与することにより肝硬変マウスを作製し、この硬変肝に蛍光染色した肝癌細胞を接種した。TAA はミトコンドリアを障害することによって肝細胞の呼吸を障害し、核内の酵素活性と DNA 合成を増加させ mitosis を引き起こし、肝硬変を発生させるとされている^{19,20)}。今回の検討では 0.2 mg/g 体重量の TAA をマウスに週 2 回の割合で 20 週間腹腔内投与を行うと、比較的低い死亡率で肝硬変マウスを作製で

きることが明らかになった。この肝硬変マウスの肝被膜下に DiI 染色肝癌細胞を接種すると、正常肝に比しより速やかに肝癌細胞が zone 1 に浸潤することが観察された。一方、正常肝の場合と同様に硬変肝においても、肝癌細胞は zone 3 への浸潤を示さなかった。硬変肝と正常肝において、肝癌細胞の zone 1 への浸潤速度に差異を生じた原因は明らかではないが、両者における肝の構造上の相違がこの現象に関与している可能性がある。すなわち、硬変肝においては肝細胞の正常な索状配列が破壊され、線維性隔壁が偽小葉を取り囲んでいる。この環境の変化によって、肝癌細胞が zone 1 へ浸潤しやすくなった可能性が考えられる。

さらに著者は、正常肝および硬変肝の左外側葉の被膜下に DiI 染色肝癌細胞を接種し、肝右外側葉への転移様式を検討した。この結果、硬変肝においては肝癌細胞を接種していない右外側葉に早期より転移巣が形成されるのに対し、正常肝では形成されないことが示された。肝硬変患者の門脈血流速度と門脈血流量は正常者のそれに比し有意に低下していることが報告されている⁴¹⁾。また、門脈内に腫瘍血栓や血栓が存在する症例では、門脈血流が求肝性・遠肝性の両方の方向性を示したり、持続的な遠肝性を示す例が存在することが報告されている⁴²⁾。さらに、肝癌周囲の門脈は腫瘍からの流出血管として働いており、硬変肝においてはその傾向がより顕著であることが報告されている⁴³⁾。これらの報告は、肝硬変合併肝癌症例においては、門脈内に浸潤した肝癌細胞が一旦遠肝性に移動した後に再び求肝性に肝へ向い、同一もしくは他の肝葉の末梢門脈へ播種される可能性を示している。今回の研究結果は、この臨床観察より得られた推測を支持するものであり、肝硬変に伴う門脈の血行動態の変化が、肝癌細胞の肝内転移巣の形成を促進させる可能性を示している。したがって、肝硬変の存在が肝癌発生の最たる危険因子であるのみならず、肝内転移巣形成の促進因子であるならば、肝硬変の発生・進展を抑制する試みが、肝癌を克服するためにより重要な意義を持つことになると思われる。

DiI 染色した癌細胞を用いて、癌の浸潤・転移様式を検討するうえでの問題点は、染色した細胞が分裂を繰り返すうちに蛍光強度が減弱することである。事実、*in vitro*での培養細胞を用いた検討では、染色後 7 日目にはほとんど蛍光を発する細胞を認めなかった。しかし、*in vivo*では *in vitro* より細胞の倍加時間が長いことから、DiI 染色した肝癌細胞を肝に接種した場合には 4 週後においても蛍光が認められ、この間の癌の浸潤・転移の観察が可能であった。DiI 染色細胞の持つもうひとつの問題点は、

この色素が多く一般的な固定法や染色液に対して可溶性であることである。また、外来性の癌細胞の発育形態がそのまま内因性の癌の浸潤・転移を反映するかどうかという問題点も残る。しかし、これらの問題点を差し引いても、DiI 染色した癌細胞を正所性に移植し、その分布と動態を観察することは、さまざまな癌の浸潤・転移様式を克明に検討するうえで簡便かつ有用な方法であると考えられる。

結 語

肝癌の肝内浸潤および肝内転移の機序を解明するための基礎的研究として、マウス由来の肝癌細胞を蛍光色素である DiI で染色した後に、同系の正常および肝硬変マウスの肝被膜下に接種し、経時的にその分布と動態を解析することにより、以下のごとき結果を得た。

1. マウス肝癌細胞を 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DiI 存在下で 37°C、60 分間培養すると、細胞を傷害することなく蛍光染色し得た。DiI は *in vitro* において、染色肝癌細胞から非染色細胞へ拡散することなく、細胞内小器官に局在したが、染色細胞の増殖に伴い蛍光強度が減弱し、7 日後には染色細胞の蛍光性はほぼ消失した。

2. DiI 染色肝癌細胞を同系の正常マウスの肝左外側葉被膜下に接種し、経時的にその浸潤様式を検討したところ、染色肝癌細胞は周囲肝組織から明瞭に識別可能であり、DiI は *in vivo* においても拡散しないことが示された。さらに、肝癌細胞は接種部近傍の zone 1 に選択的に浸潤することが観察され、接種 4 週後においても染色肝癌細胞の同定が可能であった。

3. DiI 染色肝癌細胞を TAA 投与により作製した同系の肝硬変マウスの肝左外側葉に接種し、浸潤様式を経時的に検討したところ、肝癌細胞は正常肝に比しより速やかに硬変肝の zone 1 へ選択的に浸潤した。さらに、硬変肝においては非接種葉の zone 1 への肝内転移巣の形成を早期より認めたが、正常肝では転移巣を認めなかった。以上より、肝硬変の存在は、肝癌発生の危険因子であるのみならず、肝癌の肝内浸潤および肝内転移の促進因子である可能性が示された。

4. DiI 染色した癌細胞を正所性に移植し、その分布と動態を観察することは、種々の癌の浸潤・転移様式を検討するうえで、簡便かつ有用な方法になり得ることが示唆された。

(本論文の要旨は、第 34 回日本肝臓学会総会、第 57 回日本癌学会総会において発表した。稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜った恩師福井 博教授に深甚の謝意を捧げるとともに、御助言、御校閲を賜

た腫瘍病理学教室小西陽一教授ならびに第一外科学教室中野博重教授に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行にあたって常に、御指導、御助力をいただいた栗山茂樹博士ならびに御助力いただいた教室の諸兄に感謝の意を表します。）

なお、本研究は文部省科学研究費基盤研究(B)(課題番号 07457141)の援助をうけた。

文 献

- 1) Al-Sarraf, M., Go, T. S., Kithier, K. and Vaitkevicius, V. K. : Primary liver cancer: a review of the clinical features, blood group, serum enzymes, therapy and survival of 65 cases. *Cancer* **33**: 574-582, 1974.
- 2) Simonetti, R. G., Cammà, C., Fiorello, F., Politi, F., D'Amico, G. and Pagliaro, L. : Hepatocellular carcinoma: a worldwide problem and the major risk factors. *Dig. Dis. Sci.* **36**: 962-972, 1991.
- 3) Hatori, N. : Epidemiology of liver cancer in Japan. *J. Clin. Exp. Med.* **171**: 1097-1104, 1994.
- 4) 森定一稔・津熊秀明・田中英夫 : 特定疾患研究効果報告書。肝炎・肝硬変研究会, 大阪, p45-51, 1995.
- 5) Yuki, K., Hirohashi, S., Sakamoto, M., Kanai, T. and Shimosato, Y. : Growth and spread of hepatocellular carcinoma: a review of 240 consecutive autopsy cases. *Cancer* **66**: 2174-2179, 1990.
- 6) Iwatsuki, S., Starzl, T. E., Sheahan, D. G., Yokoyama, I., Demetris, A. J., Todo, S., Tzakis, A. G., Van Thiel, D. H., Carr, B., Selby, R. and Madariaga, J. : Hepatic resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg.* **214**: 221-228, 1991.
- 7) The Liver Cancer Study Group of Japan : Primary Liver Cancer in Japan. *Ann. Surg.* **211**: 277-287, 1990.
- 8) 日本肝癌研究会 : 原発性肝癌に関する追跡調査—第10報—。 *肝臓* **34**: 805-813, 1993.
- 9) 中野雅行・斉藤明子・高橋 健・小幡 裕・小林誠一郎 : 初期肝細胞癌の発育・進展の病理・ *肝臓* **31**: 754-762, 1990.
- 10) Terada, T., Ohta, T., Minato, H. and Nakanuma, Y. : Expression of pancreatic trypsinogen/trypsin and cathepsin B in human cholangiocarcinomas and hepatocellular carcinomas. *Hum. Pathol* **26**: 746-752, 1995.
- 11) Ihara, A., Koizumi, H., Hashizume, R. and Uchikoshi, T. : Expression of epithelial cadherin and α - and β -catenins in nontumoral livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* **23**: 1441-1447, 1996.
- 12) Yamaguchi, A., Urano, T., Goi, T., Takeuchi, K., Niimoto, S., Nakagawara, G., Furukawa, K. and Shiku, H. : Expression of human nm23-H1 and nm23-H2 proteins in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **73**: 2280-2284, 1994.
- 13) Ledley, F. D., Soriano, H. E., O'Malley, Jr. B. W., Lewis, D., Darlington, G. J. and Finegold, M. : DiI as a marker for cellular transplantation into solid organs. *Biotechniques* **13**: 581-587, 1992.
- 14) Soriano, H. E., Lewis, D., Legner, M., Brandt, M., Baley, P., Darlington, G., Finegold, M. and Ledley, F. D. : The use of DiI-marked hepatocytes to demonstrate orthotopic, intrahepatic engraftment following hepatocellular transplantation. *Transplantation* **54**: 717-723, 1992.
- 15) Hiscox, S. and Jiang, W. G. : Quantification of tumour cell-endothelial cell attachment by 1, 1'-diiododecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI). *Cancer Lett.* **112**: 209-217, 1997.
- 16) Patek, P. Q., Collins, J. L. and Cohn, M. : Transformed cell lines susceptible or resistant to *in vivo* surveillance against tumorigenesis. *Nature* **276**: 510-511, 1978.
- 17) Tanaka, K., Sato, M., Tomita, Y. and Ichihara, A. : Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. *J. Biochem.* **84**: 937-946, 1978.
- 18) Rappaport, A. M. : The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat. Rec.* **130**: 673-689, 1958.
- 19) Zimmermann, T., Muller, A., Machnik, G., Franke, H., Schubert, H. and Dargel, R. : Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in Uje WIST rats. *Z. Versuchstierkt.* **30**: 165-180, 1987.
- 20) Dashti, H., Jeppsson, B., Hagerstrand, I., Hult-

- berg, B., Srinivas, U., Abdulla, M. and Bengmark, S. : Thioacetamide-and carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Eur. Surg. Res.* **21** : 83-91, 1989.
- 21) Gothoskar, S. V., Talwalkar, G. V. and Bhide, S. V. : Tumorigenic effect of thioacetamide in Swiss strain mice. *Br. J. Cancer* **24** : 498-503, 1970.
- 22) Aznavoorian, S., Murphy, A. N., Stetler-Stevenson, W. G. and Liotta, L. A. : Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* **71** : 1368-1383, 1993.
- 23) Venook, A. P. : Treatment of hepatocellular carcinoma : Too many options? *J. Clin. Oncol.* **12** : 1323-1334, 1994.
- 24) Colleoni, M., Gaion, F., Liessi, G., Mastropasqua, G., Nelli, P. and Manente, P. : Medical treatment of hepatocellular carcinoma : Any progress? *Tumori.* **80** : 315-326, 1994.
- 25) Kuriyama, S., Nakatani, T., Masui, K., Sakamoto, T., Tominaga, K., Yoshikawa, M., Fukui, H., Ikenaka, K. and Tsujii, T. : Bystander effect caused by suicide gene expression indicates the feasibility of gene therapy for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **22** : 1838-1846, 1995.
- 26) Kuriyama, S., Sakamoto, T., Masui, K., Nakatani, T., Tominaga, K., Kikukawa, M., Yoshikawa, M., Ikenaka, K., Fukui, H. and Tsujii, T. : Tissue-specific expression of HSV-*th* gene can induce efficient antitumor effect and protective immunity to wild-type hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **71** : 470-475, 1997.
- 27) Cao, G., Kuriyama, S., Du, P., Sakamoto, T., Kong, X., Masui, K. and Qi, Z. : Complete regression of established murine hepatocellular carcinoma by *in vivo* tumor necrosis factor a gene transfer. *Gastroenterology* **112** : 501-510, 1997.
- 28) Sun, F. X., Tang, Z. Y., Liu, K. D., Ye, S. L., Xue, Q., Gao, D. M. and Ma, Z. C. : Establishment of a metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice *via* orthotopic implantation of histologically intact tissues. *Int. J. Cancer* **66** : 239-243, 1996.
- 29) Sharkey, F. E. and Fogh, J. : Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis. Rev.* **3** : 341-360, 1984.
- 30) Manzotti, C., Audisio, R. A. and Pratesi, G. : Importance of orthotopic implantation for human tumors as model system : relevance to metastasis and invasion. *Clin. Exp. Metastasis* **11** : 5-14, 1993.
- 31) Sun, F. X., Tang, Z. Y., Liu, K. D., Xue, Q., Gao, D. M., Yu, Y. Q., Zhou, X. D. and Ma, Z. C. : Metastatic models of human liver cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **122** : 397-402, 1996.
- 32) Godement P, Vanselow J, Thanos S and Bonhoeffer F : A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development* **101** : 697-713, 1987.
- 33) Vidal-Sanz, M., Villegas-Peres, M. P., Bray, G. M. and Aguayo, A. J. : Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye DiI. *Exp. Neurol.* **102** : 82-101, 1988.
- 34) Von Bartheld, C. S., Cunningham, D. E. and Rubel, E. W. : Neural tracing with DiI : Decalcification, cryosectioning, and photoconversion for light and electron microscopic analysis. *J. Histochem. Cytochem.* **38** : 725-733, 1990.
- 35) Zajicek, G., Oreun, R. and Weinreb, Jr. M. : The streaming liver. *Liver* **5** : 293-300, 1985.
- 36) Nakashima, T. : Vascular changes and hemodynamics in hepatocellular carcinoma in Hepatocellular Carcinoma (Okuda, K. and Peter, R. L., eds.). Wiley, New York, pp.169-203, 1976.
- 37) Kondo, Y. and Wada, K. : Intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma : a histopathologic study. *Hum. Pathol.* **22** : 125-130, 1991.
- 38) Nakashima, O., Sugihara, S., Kage, M. and Kojiro, M. : Pathomorphological characteristics of small hepatocellular carcinoma : a special reference to small hepatocellular carcinoma with indistinct margins. *Hepatology* **22** : 101-105, 1995.
- 39) Osada, T., Sakamoto, M., Ino, Y., Iwamatsu, A., Matsuno, Y., Muto, T. and Hirohashi, S. : E

- cadherin is involved in the intráhepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **24** : 1460-1467, 1996.
- 40) **Jones, A. L.** : Anatomy of the normal liver in *Hepatology. A textbook of liver disease* (Zakin, D. and Boyer, T. D., eds.). Saunders, Philadelphia, pp3-31, 1982.
- 41) **Chawla, Y., Santa, N., Dhiman, R. K. and Dilawari, J. B.** : Portal hemodynamics by duplex Doppler sonography in different grades of cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* **43** : 354-357, 1998.
- 42) **Furuse, J., Matsutani, S., Yoshikawa, M., Ebara, M., Saisho, H., Tsuchiya, Y. and Ohto, M.** : Diagnosis of portal vein tumor thrombus by pulsed Doppler ultrasonography. *J. Clin. Ultrasnund.* **20** : 439-446, 1992.
- 43) **Toyosaka, A., Okamoto, E., Mitsunobu, M., Oriyama, T., Nakao, N. and Miura, K.** : Intrahepatic metastases in hepatocellular carcinoma: Evidence for spread via the portal vein as an efferent vessel. *Am. J. Gastroenterol.* **91** : 1610-1615, 1996.