

B6C3F<sub>1</sub>マウスの自然発生性心臓血管内皮細胞増殖性病変

に関する研究

岩 田 聖

B6C3F<sub>1</sub>マウスの自然発生性心臓血管内皮細胞増殖性病変に関する研究

岩田 聖

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-12

静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2

## 【 論文目次 】

— 序論 —	1
— 第1章：心臓血管内皮腫瘍性病変 —	4
1) 材料と方法	4
検索動物	4
血液学検査	4
病理学検査	5
免疫組織化学的検討	5
2) 結果	6
病変の種類	6
血液学検査結果	6
病理学検査結果	6
免疫組織化学的検討結果	8
— 第2章：心臓血管内皮細胞増生 —	9
1) 材料と方法	9
検索動物	9
血液学検査	9
病理学検査	9
免疫組織化学的検討	9
電子顕微鏡学的検討	10
誘発性増殖性病変との比較	10
2) 結果	11
発生頻度	11
血液学検査結果	11
病理学検査結果	11
免疫組織化学的検討結果	13
電子顕微鏡学的所見	13
乳癌との相関性の検討	13
誘発性増生性病変との比較結果	14
— 考察 —	15
— 結語 —	19
— 謝辞 —	21
— 写真の説明 —	22
— 文献 —	25
— 付表および写真 —	30
— 英文要旨 —	

## ( 序 論 )

B6C3F<sub>1</sub> マウスはC57BL/6雌マウスとC3H/He雄マウスの近交系間交配により作成される交配第一代マウス (F<sub>1</sub> マウス) である。交配第一代マウスは、近交系マウス同様遺伝子が均一で、雑種強勢により活力および環境要因に対する自己調整が高くなり、一般に飼育管理が容易で体重の不均一も少ないとされ実験動物としてよく用いられている (41)。なかでもB6C3F<sub>1</sub> マウスは、米国NCI(National Cancer Institute)の齧歯類を用いた発癌性試験のガイドラインにもマウスとして推奨されていることから、現在日本をはじめ広く世界各国で長期毒性試験や発癌性試験に多く使用されている。

B6C3F<sub>1</sub> マウスに観察される自然発生性病変の集積ならびに解析は背景データとして有用であり、しばしば長期毒性試験や発癌性試験の結果の評価には貴重な考察を与える (11,36,44)。本論文では当センターの背景データから、B6C3F<sub>1</sub> マウスに見られた血管内皮腫瘍および血管内皮細胞増生などの自然発生性心臓血管内皮細胞増殖性病変について検討した。

B6C3F<sub>1</sub> マウスに自然発生する血管内皮腫瘍としては、脾臓、肝臓、骨髄、皮下などに単発性あるいは多発性に発生することがよく知られており (11,44,46)、我々も日常の鏡検業務においてしばしば遭遇する病変である。しかし、齧歯類においては、自然発生性の心臓原発の血管内皮腫瘍の報告はほとんどなく、1968年にSchardein らがラットで、1984年にHoch-Leigetel らがマウスでそれぞれ報告したのみである (1,12,13,30)。誘発性腫瘍としても1-3-Butadiene (26,37)、Captafol (18)、3-Methylcholanthrene (12)、Urethane (15) などの化学物質投与や放射線照射 (4,12,13) によりマウスの心臓に血管肉腫の発生が少数報告さ

れているにすぎない。なお、人間の心臓に発生する血管内皮腫瘍としては、良性の血管腫がまれな発生であるのに対し血管肉腫は比較的高い発生を示すとされ、右心房に多く、また、女性よりも男性に多く、ほとんどが遠隔転移をするとされている腫瘍である(24,25,29)。また、家畜の心臓に発生する血管内皮腫瘍としては、犬で血管肉腫が肝臓や脾臓とともに心臓に好発することが知られており、やはり人間同様に右心房に多く、遠隔転移する、あるいは心臓に転移した腫瘍とされている。その他の家畜や実験小動物については報告がないか、極めてまれな腫瘍とされている(20,38)。

一方、マウスの心臓に観察される血管内皮細胞増生としては、前述した誘発性血管肉腫の初期病変としての報告がいくつかある。しかし、心臓に自然発生した血管内皮細胞増生の報告は人間や家畜、実験動物を含め現在まで無く、本論文の12症例が最初の報告である。

腫瘍性病変以外で血管内皮細胞が増殖を見せる変化として、一般に炎症巣や肉芽組織における新生毛細血管の増殖、腫瘍の間質反応としての血管形成などがある。また、肺高血圧症の際に動脈の分岐部付近に血管内皮細胞の増殖をともなった血管内膜の叢状病変 *plexiform lesion* が認められることも知られている。

本論文ではさらに病変が前腫瘍性病変である可能性を考え、誘発性の血管肉腫における前腫瘍性病変との比較検討を行なった。また、血管内皮細胞はその置かれた環境によって形態を変化させる。つまり、血圧やずり応力(血管壁に平行な方向に加わる力: *shear stress*)の変化に対応して、丸く厚みを増したり、細長く扁平になったりするとされている(28,31,35,47)。そこで、このような血液動力学的な作用による変化とも考え、これらの点からもその発生機序についていくつかの考察を加えた。

本論文では前述したB6C3F<sub>1</sub>マウスに自然発生性に見られた心臓の血管内皮細胞の腫瘍性病変を第一章に、また後述の心臓の血管内皮細胞増生を第二章にそれぞれ分けて記載した。

## 【 第一章 : 心臓血管内皮腫瘍性病変 】

### － 材料と方法 －

#### 検索動物

当センターで過去7年間に行なわれたB6C3F<sub>1</sub>マウスを用いて実施された長期毒性試験（雄4,160例、雌3,910例）に観察された心臓の血管内皮腫瘍5例（雄3例、雌2例）。症例は95週齢から109週齢のいずれも老齢マウスで2例が対照群に、3例が投薬群に属した。なお、これら投薬群では被験物質の心臓に対する影響は観察されず、病変はいずれも自然発生病変とした。試験期間中動物は、温度22～24℃、湿度50～60%に保たれたバリアシステム内でステンレスケージに個別飼育し、飼料と水は自由摂取させた。飼料はオリエンタル酵母工業株式会社製の放射線滅菌NIH公開飼料を、水は水道水を使用した。

#### 血液学検査

剖検時エーテル麻酔下で開腹後、腹大動脈より採血し一般血液学検査を実施した。検査は総合血液学検査装置 THMS H 6000（テクニコン社、米国）を用い白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、血小板数(PTL)を測定した。同時に血液塗抹標本を作成しメイギムザ液にて染色し鏡検した。比較対照とした血液学検査背景データ値は、過去に当センターで行われた毒性試験の対照群の値を集積したもの（16）から、109週齢で計画屠殺された動物の値を引用した。

## 病理学検査

剖検に際しては、外景検査および内景検査を十分に行い、肉眼的異常を記録した。剖検後、臓器重量を自動天秤にて測定し材料は10%中性緩衝ホルマリ液で固定した。切り出しは、心房と心室の2個所で、心室では最大径を含む様 2~3mmの厚さで水平断にて行い、残った心尖部は矢状断にて切り出し標本作成した。その後材料は常法に従いパラフィン包埋しHE染色を施し顕微鏡観察した。なお、心臓直径として心室部横断面組織標本にて最大径を計測した。また、比較対照とした心臓重量および直径の背景データ値は、当センターで行われた毒性試験の対照群から無作為に抽出した109週齢の動物14例の心臓について計測、集計した値とした。

## 免疫組織化学的検討

血管内皮細胞のマーカーとされている Vimentin, von Willebrand factor (FactorVIII related antigen), Human endothelial cell(CD31)の各抗体を用いた免疫組織化学的検索と Ulex europaeus agglutinin I(以下 UEA-1 と略す), Wheat germ agglutinin (以下 WGA と略す), Concanavalin A (以下 Con-A と略す), の各レクチンを用いた染色を施し内皮細胞の証明を試みた。免疫染色はストレプトアビジン-ビオチン法 (DAKO社製、LSAB kit) を用いた (8,17)。抗体は市販 (DAKO, Japan) の抗ブタビメンチンマウスモノクローナル抗体、抗ヒト第八因子関連抗原ウサギポリクローナル抗体、抗ヒト内皮細胞マウスモノクローナル抗体 (32) を用い、それぞれ 1:10 1:200 1:40 の倍率で 0.05M トリス緩衝液で希釈して用いた。なお、von Willebrand factor(FactorVIII related antigen)およびHuman endothelial cell(CD31)の抗体を用いる時には 36°Cの0.1% トリプシン水溶液中に20分間前処理を施した。染色には同時に第一次抗体を除いた免疫染色を実施し陰性対照とした。またレクチンについては UEA-1, WGA, Con-A(DAKO, JAPAN) (2,9,34) の各レクチンを処理後、それぞれの抗レクチン抗体を用い上記



同様のストレプトアビジン-ビオチン法にて免疫染色した。なおレクチン結合の等異性はそれぞれ 0.5M L-Fucose, 0.2M N-Acetylgalactosamine, 0.5M D-Mannoseを用いて阻害試験を実施し確認した。

## - 結果 -

### 病変の種類

B6C3F<sub>1</sub> マウスに自然発生した心臓の血管内皮腫瘍は良性血管腫 benign hemangioma が2例（雄1例：雌1例）、血管肉腫 hemangiosarcoma が3例（雄2例：雌1例）であった。

### 血液学検査結果

一般血液学検査では血管肉腫の一例でヘマトクリット値が18.4%、ヘモグロビン量が 6.1 g/dl、赤血球数が  $3.91 \times 10^6/\text{mm}^3$ 、血小板数が  $120 \times 10^3/\text{mm}^3$  と低値を示した。また、同例で異型赤血球が観察された（写真1）。そのほかの症例に顕著な変動を示す値は認められなかった（付表1）。

### 病理学検査結果

心臓重量および心臓直径については、血管肉腫の2例で 6.3mm および 7mm と背景データ値 ( $5.4 \pm 0.36\text{mm}$ ) に比較しやや大きい値を示した（付表1）。

肉眼所見としては、血管肉腫の1例で心臓に3x5mm赤色の結節が観察された。その他の例ではいずれも心臓の異常は確認できなかった。心臓以外には胸腺の萎縮が多くの例で観察された以外には各症例共通の肉眼所見は認められなかった（付表2）。

組織学的に腫瘍は心室中隔に認められるものが、5例中3例（血管腫の1例、血管肉腫の2例）であった。他の2例では、左心室壁（血管腫の1例）および心尖部（血管肉腫の1例）にそれぞれ観察された。良性血管腫benign hemangiomaと診断された2例では、一層の内皮細胞で囲まれた血管が心筋線維間に腔の拡張を伴って限局性に増殖していた（写真2）。内皮細胞は扁平で、核は肥大したものが散見されるが、異型性は認められなかった。間質では線維性結合組織が増殖する部分も観察された。一方、血管肉腫hemangiosarcomaと診断された3例では、一層から多層の異型内皮細胞が心筋線維間に増殖し不規則に分岐した血管腔が多少とも形成されていた。多層化部分では細胞は充実性に増殖し大きな腫瘍塊を形成していた（写真3）。血管腔の拡張も散見され、拡張の強い例では血栓形成も観察された。核は一般に円形～楕円形を呈し、淡明で大きく核分裂像も観察された。核分裂像は、1例で散見されたが他の2例ではまれであった。胞体は一層性増殖部分では乏しかったが、多層性増殖部分では比較的豊富な細胞質を有し、紡錘形で弱好酸性を呈していた。腫瘍辺縁では正常組織との境界は不明瞭で、心筋線維間を異型内皮細胞が一層性に浸潤増殖していた。血管肉腫と診断された3例のうち雄の1例では心臓以外に肝臓と骨髄に、他の雌の1例についても脾臓と骨髄に血管内皮細胞腫hemangioendotheliomaが観察され多発性血管内皮腫瘍multiple hemangio-endothelial tumorsであった。

以上の5症例には心筋細胞自身の変化として、局所性の肥大、筋原線維の配列異常、空胞化、好酸性化、収縮帯出現などが軽度ながら少数例に観察されたが、腫瘍病変との関連性のある部位に特定した病変ではなく、心臓全体に散見される病変であった。その他の臓器に観察された組織所見は胸腺の萎縮、前胃の扁平上皮増生、肝臓の小肉芽巣、大脳の石灰沈着、延髄や脊髄の硝子体出現、副腎皮質紡錘形細胞の増生、甲状腺の嚢胞、腎臓の好塩基性尿細管上皮の出現、子宮の嚢胞状内膜増生、悪性リンパ腫などいずれも各症例に散発性に発生した自然発生的加

齡性病変であった。

#### 免疫組織化学的検索結果

これら症例の血管内皮細胞は免疫組織化学的には、血管腫症例、血管肉腫症例ともに von Willebrand factor( FactorVIII related antigen ), Human endothelial cell(CD31)の抗体や WGA, Con-A などのレクチンに局所的な陽性を含め全例が陽性を示した(写真4、5)。また、Vimentin抗体では血管腫の1例と血管肉腫の1例が局所的な陽性を示し、UEA-1 レクチンでは血管腫の1例と血管肉腫全例が陽性を示した(付表2)。

## 【 第二章 : 心臓血管内皮細胞増生 】

### － 材料と方法 －

#### 検索動物

当センターで過去7年間に行なわれたB6C3F<sub>1</sub>マウスを用いて実施された長期毒性試験（雌3,910例）に観察された心臓の血管内皮細胞増生12例。症例は86週齢から109週齢のいずれも担乳癌雌マウスで6例が対照群に、6例が投薬群に属した。なお、これら投薬群では被験物質の心臓および乳腺に対する影響は観察されず、いずれも自然発生病変とした。飼育条件については第一章に前述したと同様である。

#### 血液学検査

一般血液学検査は12例中の6例、血液塗抹は12例中の10例について実施した。方法については第一章に前述したと同様である。

#### 病理学検査

方法については第一章に前述したと同様である。その他、用いた病理学的背景データは全て当センターで実施された長期毒性試験のデータを、ワークステーションを用いた病理情報処理システム（19）を用いて集積、検索した。

#### 免疫組織化学的検討

第一章に前述したと同様の血管内皮細胞のマーカーとされている Vimentin, von Willebrand factor(FactorVIII related antigen), Human endothelial cell

(CD31)の各抗体を用いた免疫組織化学的検索と UEA-1, WGA, ConA の各レクチンを用いた染色を施し内皮細胞を証明した。方法については第一章に前述したと同様である。なお、マウス正常血管内皮についても正常な心臓を用いて比較した。さらに、細胞分裂のG1後期からS期の核内蛋白(分子量 36KD)とされている増殖細胞性核抗原 Proliferating cell nuclear antigen (以下 PCNA と略す)に対する抗体(10)を用いた免疫組織化学的検索を実施し自然発生性病変と誘発性病変とを比較した。抗体は市販(DAKO, Japan)の抗 PCNA マウスモノクローナル抗体を用い、1:20倍の倍率で 0.05M トリス緩衝液で希釈して用いた。なお、切片は脱パラフィン後蒸留水にて5分間家庭用電子レンジで加熱し、抗原を復活させた(7)。

#### 電子顕微鏡学的検索

一部の例で10%中性緩衝ホルマリ固定材料から電子顕微鏡学的検索を試みた(14)。材料は1%グルタルアルデヒド液で再固定後、1%オスミウム酸水溶液で後染色した。通常のごとく脱水、エポン樹脂包埋、重合を行い、厚切り、トリミング、超薄切には Reichert-Nissei社製 Ultracut N ウルトラマイクロトームを用いた。その後、酢酸ウラン-クエン酸鉛二重染色を施し、電子顕微鏡(H-7000型、日立製作所株式会社製)で観察した。

#### 誘発性病変との比較

B6C3F<sub>1</sub>マウスを用いて当センターで実施されたある種のアルキル化剤の発癌試験で心臓に血管肉腫が誘発され、その薬量群雄50例雌50例中に観察された心臓の血管内皮細胞増生13例(雄5例/雌8例)を今回見いだされた自然発生性血管内皮細胞増生と比較検討した。誘発性病変についても、前述した自然発生性病変と同様な病理学検査、免疫組織化学的検討、電子顕微鏡学的検索を試みた。

## - 結果 -

### 発生頻度

自然発生した心血管内皮細胞増生の発生は雌 3,910例中の12例(0.31%)と比較的まれであったが、担乳癌マウス中では36例中12例(33.3%)と高率に観察された。

血液学検査結果 : ( ) 内は平均値±標準偏差を示した。

一般血液学検査でこれらの症例はヘマトクリット値( $19.4 \pm 8.9$  %)、ヘモグロビン量( $6.3 \pm 3.0$  g/dl)、赤血球数( $4.0 \pm 1.8 \times 10^6/\text{mm}^3$ )および血小板数( $465 \pm 190 \times 10^3/\text{mm}^3$ )がそれぞれ背景データに比べ低値を示した。逆に白血球数( $5.2 \pm 4.6 \times 10^3/\text{mm}^3$ )は高値を示した。集計した結果は付表3に示した。血液塗抹では異型赤血球が10例中の3例に観察された。

### 病理学検査結果

心臓重量は平均  $0.32 \pm 0.05$  g、心臓直径は平均  $6.6 \pm 0.5$  mmと背景データ値(心臓重量:  $0.18 \pm 0.02$  g、心臓直径:  $5.4 \pm 0.36$  mm)に比べ明らかな増加を示した(付表3)。共通の肉眼所見として心臓の肥大、腹部皮下の塊(15mm以上)、胸腺の萎縮が12例全例に観察されたほか、胸水貯留が12例中の7例、脾臓肥大が12例中の7例に観察された(付表4)。

組織学的に病変は心臓のび漫性的変化として心内膜から心外膜、心房、心室、心尖部にも観察された。病変部では、心筋細胞を取り囲むように内皮細胞が一層性の増生を示し、核は丸みを帯びやや大きく、一部に血管腔の拡張が見られた(写真6)。血管腔の拡張が観察される部分では心筋線維が離開している。拡張のない部分でも血管内皮細胞が心筋線維間に密に増殖している(写真7)。筋間結

合織内の小血管の内皮細胞の核も丸みを帯びやや大きい。しかし、これらの血管内皮細胞には明らかな細胞異型や多層化も認められなかった。また間質には線維化などの反応は観察されなかった。心筋細胞自身の病変は前述した腫瘍性病変の心筋細胞の変化と同様心筋細胞の局所性の肥大、筋原線維の配列異常、空胞化、好酸性化、収縮帯出現などが軽度ながら散在性に観察された。心臓以外の臓器にも血管内皮細胞の増数や核の肥大、血管腔の拡張が脾臓、腎臓、肝臓にも観察された。脾臓では脾洞血管内皮細胞の核の肥大や血管腔の拡張が12症例中9例に、いずれも局所性あるいは多局所性に認められた。腎臓ではび漫性に輸出入動脈付近の血管内皮細胞に核の肥大と血管腔の拡張が12症例中の8例に認められた。また、肝臓では、び漫性に類洞血管内皮細胞の増数、核の肥大、血管腔の拡張が12症例中の4例に認められた（写真8）。

血管内皮細胞の変化以外に共通する組織所見としては、乳腺の腺癌が全例に観察された。乳癌はいずれも基本的に多数の分岐をもつ、一層から数層の上皮からなる腺管状構造を有する充実性の腫瘍で、15mm以上の大きな腫瘤を形成し出血巣や壊死巣を含んでいた（写真9）。細胞は好塩基性立方形で円形～卵円形の核を有し、大小の腺腔を形成し、腔内にはエオジン好性の分泌物が見られた。症例によっては、腺腔周囲に筋上皮細胞と思われる紡錘形細胞が観察された。その他、胸腺の萎縮、脾臓の髄外造血亢進が12例全例、骨髄の造血亢進が12例中5例、卵巣の嚢胞が12例中6例と比較的多くの症例に観察された。その他の組織所見は、脾臓や骨髄の色素沈着、顎下腺のリンパ球浸潤、前胃の扁平上皮増生・糜爛形成、肝臓の小肉芽巣・巣状壊死、大脳の石灰沈着、延髄の硝子体出現、副腎皮質紡錘形細胞の増生、腎臓の好塩基性尿細管出現、子宮の嚢胞状内膜増生、肝細胞腺腫など各例に散発性に発生した自然発生的加齢性病変であった。

## 免疫組織化学的検討結果

増生した細胞は、免疫組織化学的には Vimentin抗体や WGA, Con-A などのレクチンに全例が陽性（写真10）を示したほか抗 von Willebrand factor (Factor VIII related antigen)、抗 Human endothelial cell(CD31)でも5例中3例が局所的、特に小血管や比較的太い毛細血管の一部に陽性を示した（写真11）。しかし、PCNA 抗体や UEA-1 レクチンにはいずれの症例も陰性を示した。なお、マウス正常血管内皮についても全く同様の結果であった（付表5）。

## 電子顕微鏡学的所見

電子顕微鏡学的にこれらの増生細胞は、核は大型で細胞質は乏しく扁平な細胞で長さは約7~25 $\mu\text{m}$ 、高さが約2~6 $\mu\text{m}$ であった。電子顕微鏡学的にも広い血管腔と思われる腔の形成が認められた。これらの細胞の核は5~8 $\mu\text{m}$ 円形ないし楕円で、輪郭の不整は少なく、クロマチン分布も正常であった。自由縁の細胞表面は通常平滑であったが、約200nm~600nmの微絨毛様突起が数多く観察された。細胞質では細胞小器官に乏しく、一部に索状の中間径フィラメントが観察された。細胞間には少数のデスモソームや Tight junction が観察され、約100nm~250nmの辺縁ヒダも散見された（写真12）（45,47）。しかし、基底板は明瞭ではなく人や他動物の血管内皮に見られるWeibel-Palade bodyは観察されなかった（5）。

## 乳癌との相関性の検討

自然発生した心血管内皮細胞増生はいずれも担乳癌マウスに発生した。前述のごとく、雌3,910例中に発生した担乳癌マウス36例中の12例であった。そこで、乳癌と本病変との相関を確認するために、逆に担乳癌マウス以外の雌動物で、15mm以上の皮下腫瘍（貧血を伴う症例を含む）の観察された症例50例についての心臓を検索した（付表6）。また、本症例の多くの例で胸水貯留が観察されたので、



担乳癌マウス以外の雌の胸水貯留の観察された症例48例の心臓を同様に検索した（付表7）。これらの症例は当センター背景データから検索、集積し組織学的に再検討した。いずれの場合でも心臓の血管内皮細胞増生は観察されなかった。なお、胸水貯留の観察される例では心室拡張や悪性リンパ腫の心臓転移が比較的多い傾向であった。

#### 誘発性増生性病変との比較結果

当センターのあるアルキル化剤の発癌性試験で心臓に誘発された血管肉腫は雄では50例中5例(10%)、雌では50例中3例(6%)であった。発生は高頻度ではないが、心臓の血管肉腫は前述のごとく自然発生的には極めてまれな腫瘍であることから被験物質による明らかな誘発性腫瘍とした。この血管肉腫の前腫瘍性病変としての血管内皮細胞増生の発生は雄では50例中5例(10%)、雌では50例中7例(14%)であった。同試験では、心臓の血管肉腫が誘発されたほか悪性リンパ腫、肺胞／細気管支腺腫（腺癌）、ハーダー腺腫（腺癌）、卵巣腺腫などの腫瘍も同時に誘発された。誘発された血管内皮細胞増生は組織学的には、局所性あるいは多局所性に内皮細胞が一層性の増生を示した（写真13）。自然発生性の血管内皮増生に比べ、核は明らかに淡明で不正形を呈するものが多い。胞体はやや大きく細胞質内に空胞をもつ細胞も観察された。なお、心臓以外の臓器に血管内皮細胞の変化は認められなかった。免疫組織化学的には、自然発生病変同様 Vimentin（5例全例）、Human endothelial cell(CD31)（5例中3例）の抗体に陽性、レクチンでは WGA（5例全例）や Con-A（5例中3例）に陽性を示した。しかし、抗 PCNAで陽性（5例中4例）を示す点（写真14）、抗 von Willebrand factor( FactorVIII related antigen)が全例陰性であった点が自然発生例の血管内皮細胞増生例との相違点であった（付表5）。電子顕微鏡学的には自然発生例に比べ長さは6～20  $\mu$ m とほぼ同様であったが、高さが4～11  $\mu$ m とやや高く、扁平な細胞もあるが不整楕

円形や不整立方形を呈する細胞が多い傾向を示した。核の大きさは5~12 $\mu\text{m}$ で、整った円形や楕円形のは少なく切れ込みの見られるものや、輪郭の不整なものが多い。また、クロマチンは自然発生性病変に比べ明らかに少なく、核小体も目立つ細胞が多い。細胞表面は平滑で、約300nm~500nmの微絨毛様突起も認められるが極くわずかであった。細胞質では、自然発生性病変に比べ粗面小胞体やミトコンドリアなどの細胞小器官が多く、3~8 $\mu\text{m}$ の大型の空胞も観察された(写真15)。自然発生性病変同様の中間径フィラメントも一部に観察されたほか、細胞間ではTight junction やデスモソームなどの接着装置も観察された。しかし、細胞間の辺縁ヒダは不明瞭で隣接する細胞同志が重層性増殖する傾向も多く観察された。

#### (考察)

マウスの心臓に観察される血管内皮細胞の増殖性変化としては、1,3-Butadien (26,37)、Captafol (18)、3-Methylcholanthrene (12)、Urethane (15) などの多臓器発癌性の化学物質や放射線(4,12,13)で誘発される血管肉腫や初期病変としての血管内皮細胞増生の報告がある。しかし、自然発生性の心臓原発の血管内皮腫瘍の報告はほとんどなく(12,13)、また心臓に自然発生した血管内皮細胞増生としても今回の研究が最初の報告である。このことは、B6C3F<sub>1</sub>マウスを用いた長期毒性試験や発癌性試験が広く行われているものの、背景データとしての自然発生性病変の集積や解析がまだ十分に行われていない事に由縁すると考えられる。しかし、本症例のような人や家畜でもまれとされている病変でも、膨大な数を取り扱う実験動物領域において今後その報告が増えてくるものと期待される。また、発生頻度の高い自然発生性病変の解析が有用であることはもちろん、本報告

のように比較的まれとされている病変についても背景データとして集積、その発生頻度や病理学的意義について充分検討、考察しておく必要がある。特にB6C3F<sub>1</sub>マウス12例に自然発生した心臓の血管内皮細胞増生は、比較的まれな症例であるが、いずれも担乳癌マウスに発生し乳癌との関連が示唆され今後とも注目すべき病変と考えられた。

今回の研究で、腫瘍性病変については免疫組織化学的検索、レクチン染色で、増生性病変についてはさらに電子顕微鏡学的に血管内皮細胞であることが確認できた。人では血管内皮細胞は Vimentin, von Willebrand factor( FactorVIII related antigen), Human endothelial cell(CD31)などの抗体に陽性を示すとともに、UEA-1レクチンが陽性に反応することがよく知られており(27,32)、血管内皮のよいマーカーとされている。本研究においても Vimentin, von Willebrand factor( FactorVIII related antigen), Human endothelial cell(CD31)などの抗体に陽性を示した。しかし、抗 Vimentinについては腫瘍性病変では一部にしか陽性を示さなかった。また、抗 von Willebrand factor( FactorVIII related antigen)や抗 Human endothelial cell(CD31)ではマウス正常組織でも比較的太い血管や小血管の内皮細胞では陽性を示したが、毛細血管の内皮細胞には陰性であった。F.Gumkowskiらは、レクチンによるマウス正常血管内皮の表現型として、Con-A, WGA, RCA-1などが反応することを報告している(9)。本研究の心臓の増殖細胞も同様に全例がCon-AやWGAに強く反応した。その他、UEA-1では正常血管内皮は反応を示さなかったが、腫瘍性病変では5例中4例の一部に陽性であった。以上のことから、マウスの血管内皮細胞のマーカーとしてはCon-AやWGAなどのレクチンが有用であることが確認された。

自然発生した心臓の血管内皮に由来する腫瘍としては、良性血管腫が2例に、血

管肉腫が3例に認められた。発生は心室中隔に観察されるものが多く、5例中3例であった。人あるいは犬の心臓に原発する血管肉腫の大部分は右心側特に右心房に発生するとされており(48)、マウスではその発生母地に違いが認められた。

観察された良性血管腫は、いわゆる海綿状血管腫cavernous hemangiomaに見られるような、一層の内皮細胞で囲まれた拡張した血管からなる腫瘍で、過誤腫的な腫瘍と考えた。静脈瘤や血液嚢胞とは、多数の血管腔と周囲の線維性間質の増殖も伴うことから区別された。

一方、血管肉腫と診断された3例の内2例が骨髄、肝臓や脾臓にも血管内皮細胞腫hemangioendotheliomaが観察され、多発性ないしびまん性に発生する血管内皮由来腫瘍の総称である全身性血管腫あるいは多発性血管内皮腫瘍とも診断されるものであった。血管内皮細胞の腫瘍が多中心性に発生することは、人をはじめマウスや他の家畜でも報告されている(33,40,46)。しかし、本報告の様に心臓に同時に血管内皮腫瘍が発生したという報告はない。これらの報告の中に赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板の減少や異型赤血球の出現が報告されており(33,46)、血管腫瘍に由来する溶血性貧血の結果と考えられている。本症例の内の1例にも同様な血液学的な変化が認められた。

なお、症例の多くに心筋細胞の局所性の肥大、筋原線維の配列異常、空胞化、好酸性化、収縮帯出現などが観察された。これらの変化はB6C3F<sub>1</sub>マウスの加齢性変化として観察されるものであり、血管内皮細胞腫瘍や血管内皮細胞増生に基因する変化ではないと考えた(21,22)。

自然発生した心臓の血管内皮細胞増生は0.31%と比較的まれな発生と考えられたが、担乳癌マウス中では33.3%と高率に発生しており、乳癌の発生と何らかの相関が疑われた。なお、どの症例にも心臓に炎症や肉芽巣あるいは腫瘍などの変化は認められず、これら病変の二次的な変化とは考えられなかった。

自然発生の血管内皮細胞増生の症例では一般血液学検査でヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数および血小板数は低値を示し、異型赤血球が3例に観察された。組織学的にも脾臓や骨髄に随外造血が多数例に認められたことから、これらの変化はいずれも巨大化した乳癌に由来する貧血に基因するものと考えられた。なお、同様の変化が前述した多発性血管内皮腫瘍でも認められる事は興味深い。

Solleveld ら(1988) (37) は心臓に誘発される血管肉腫の前腫瘍性病変としての血管内皮細胞増生を” Widened vascular spaces lined by a single layer of plump endothelial cell resting upon muscle fiber” と提唱した。診断名としては、今回報告した本病変もこの範疇にはいるものと考えた。しかし、心臓に誘発される血管肉腫の前腫瘍性病変としての血管内皮細胞増生と比較すると、病変分布がび慢性である事、多発性に脾臓、腎臓、肝臓にも同様な病変が観察され血管内皮細胞の系統的な増殖性変化であると考えられる事、核の異型はなくヘテロクロマチンも多い事、増殖細胞性核抗原である抗 PCNA には反応を示さない事などのいくつかの組織形態学な違いが認められた。また、電子顕微鏡学的にも、胞体や核の形態に不整なもの少なく、細胞表面の微絨毛様突起や辺縁ヒダなどの内皮細胞の特徴も明らかで、重層性増殖する傾向も認められなかった。以上のことより、B6C3F<sub>1</sub> マウスに自然発生する心臓の血管内皮細胞増生と誘発性前腫瘍性病変とはその組織発生に違いがあるものと考えられ、自然発生の心臓血管内皮細胞増生は前腫瘍性病変とは考えにくいと思われた。

共通の肉眼所見として、乳癌による腹部皮下の塊(15mm以上)の他に心臓の肥大、胸水貯留、脾臓肥大などが観察され、循環障害に基因した血圧の変化やずり応力の強さの変化などの血液動力学的作用の影響が原因の一つとして考えられた。しかし、乳癌を有しない雌の15mm以上の皮下腫瘍(貧血を伴う症例を含む)および雌の胸水貯留の観察された症例の心臓には本病変は観察されなかった。このこ

とは血液流量の低下や循環障害などによる血液動力学的作用に対する内皮細胞の反応の可能性は低いものと考えた(28,31,35,47)。

結局、本病変の発生機序は不明であったが、同様に他臓器の血管内皮細胞にも変化が発生していることから、全身性の系統的病変と理解され、血管内皮細胞の何らかの機能的亢進による変化を示唆するものと考えられた。症例はいずれも担乳癌雌マウスに発生しており、人間でも乳癌がエストロゲン依存性の腫瘍であること、エストロゲンを分泌するとされている卵巣の顆粒膜細胞腫を移植されたマウスの肝臓・脾臓・副腎などに血管の拡張が報告されている(6)こと、老齡ラットに見られる副腎の紫斑病 peliosis の発生には発情との関与が指摘されていること(3)などから、本病変と雌性ホルモンの関与(3,6,43)が示唆される。また、B6C3F<sub>1</sub>マウスは乳癌好発系であるC3H/Heを雄親に持つことからマウス乳癌ウィルス(MMTV)の関与(42)も否定できない。また最近では、内皮細胞の増殖因子として線維芽細胞増殖因子(Fibroblast growth factor:FGF)や血小板由来内皮細胞増殖因子(Platelet-derived endothelial cell growth factor:PD-ECGF)、アンジオゲニン Angiogenin、トランスフォーミング グロス ファクター Transforming growth factor:TGFなどが分子レベルで同定され、その存在が確認されつつある(23,39)。このことから、乳癌に由来する腫瘍産生性の何らかの液性血管内皮細胞増殖因子が本病変に関与する可能性も考えられる。さらには、血管内皮細胞にこれら諸因子に対する特異的な受容体が存在することも推察された。

#### (結 語)

当センターで過去7年間に行なわれたB6C3F<sub>1</sub>マウス(雄:4,160 雌:3,910)を用いた慢性毒性試験あるいは発癌性試験の中で自然発生性に心臓の血管内皮細胞

由来腫瘍5例、血管内皮細胞増生を12例に認めた。

腫瘍性病変としては、2例が血管腫benign hemangioma、3例が血管肉腫hemangiosarcomaであった。血管肉腫と診断された3例の内2例が骨髄、肝臓や脾臓にも血管内皮細胞腫hemangioendotheliomaが観察され、多発性血管内皮腫瘍であった。B6C3F<sub>1</sub>の自然発生性の血管内皮腫瘍としては、脾臓、肝臓、骨髄、皮下などに単発性あるいは多発性に発生することがよく知られている。しかし、自然発生性の心臓原発の血管内皮腫瘍の報告はほとんどなく、誘発性腫瘍としても1-3-Butadiene投与や放射線照射による本病変の出現が少数に報告されているにすぎない。従って、今回の5例の自然発生性心臓腫瘍は極めてまれなものと考えられた。

一方、血管内皮細胞増生endothelial cell hyperplasiaは12例に認められた。心臓の血管内皮細胞増生についてはSolleveltら(1988)が1-3-Butadieneを投与したB6C3F<sub>1</sub>マウスに誘発される腫瘍の前腫瘍性病変として報告した以外に詳細な報告はない。我々も当センターのある毒性試験で心臓に誘発された血管肉腫の前腫瘍性病変としての血管内皮細胞増生を経験する機会を得たので自然発生病変と比較した。誘発性病変と比較するといくつかの組織形態学な違いが認められ、自然発生する血管内皮細胞増生とはその組織発生に違いがあるものと考えられた。また、血液流量の低下や循環障害などによる血液動力学的作用に対する内皮細胞の反応の可能性も低いものと考えられた。いずれの症例も担乳癌マウスに発生しており、むしろ乳癌とのなんらかの関係があるものと考えた。自然発生性の心臓血管内皮増生の最初の報告である。

(謝 辞)

稿を終わるに臨み、終始御指導と御助力を賜りました当センター常務理事榎本眞博士に深甚なる謝意を表します。また、御懇切なる御助言と御校閲を賜りました麻布大学獣医学部第一病理学教室、野村靖夫教授に深謝いたします。



(写真の説明)

写真 1 : 血液塗抹像. メイギムザ染色.  $\times 600$ . 心臓血管肉腫の1例に観察された異型赤血球。

写真 2 : 心臓良性血管腫. HE染色.  $\times 100$ . 一層の内皮細胞で囲まれた血管が心筋線維間に腔の拡張を伴って限局性に増殖している。

写真 3 : 心臓血管肉腫. HE染色.  $\times 120$ . 一層から多層の異型内皮細胞が増殖している。充実増殖部や血管腔の形成も観察される。

写真 4 : 心臓血管腫. Wheat germ agglutinin(WGA)レクチン染色.  $\times 240$ . 陽性像を示す。

写真 5 : 心臓血管肉腫. Human endothelial cell(CD31)抗体による免疫染色.  $\times 240$ . 陽性像を示す。

写真 6 : 心臓血管内皮細胞増生. HE染色.  $\times 200$ . び漫性に心筋細胞を取り囲むように内皮細胞が一層性の増生をしている。核は肥大し、血管腔の拡張があり心筋線維が離開している。右に同倍率の正常心筋を示した。

写真 7 : 心臓血管内皮細胞増生. HE染色.  $\times 200$ . 血管拡張のない部分でも血管内皮細胞が心筋線維間に密に増殖している。(乳頭筋)

写真 8：血管内皮細胞増生症例の心臓以外の臓器における血管内皮の変化

A－脾臓．H E染色．×200．髓外造血亢進とともに脾洞の血管拡張が観察される。

B－肝臓．H E染色．×240．血管内皮細胞の増数や核の肥大を伴った類洞の拡張が観察される。

C－腎臓．H E染色．×300．輸出入動脈付近の血管に内皮細胞の肥大を伴った腔の拡張が観察される。

写真 9：乳癌．H E染色．×100．多数の分岐をもつ一層から数層の上皮からなる腺管状構造が観察される。

写真10：心臓血管内皮細胞増生．Wheat germ agglutinin(WGA)レクチン染色．×240．陽性像を示す。

写真11：心臓血管内皮細胞増生．von Willebrand factor(FactorVIII related antigen)抗体による免疫染色．×240．陽性像を示す。

写真12：心臓血管内皮細胞増生．電子顕微鏡所見．×3,850．(差込み×36,000)．核は大型で細胞質に乏しく、細胞表面の微絨毛様突起が見られる。また、細胞間接着装置や辺縁ヒダ(差込み)などの構造が観察される。

写真13：誘発性心臓血管内皮細胞増生．H E染色．×120．局所性に異型内皮細胞が一層性に増殖している。核は淡明で胞体に空胞を持つ細胞も観察される。

写真14：誘発性心臓血管内皮細胞増生. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)抗体による免疫染色. ×300. 陽性像を示す。

写真15：誘発性心臓血管内皮細胞増生. 電子顕微鏡所見. ×3,440. 異型内皮細胞を示す。核では切れ込みが多く、明らかにヘテロクロマチンが少ない。また、細胞質には大型の空胞が観察される。

(文献)

1. Alison RH, Elwell MR, Jokinen MP, Dittrich KL and Boorman GA(1987). Morphology and classification of 96 primary cardiac neoplasms in Fischer 344 rats. *Vet. Pathol.* 24: 488-494.
2. Augustin-Voss HG, Smith CA, Lewis RM(1990). Phenotypic characterization of normal and neoplastic canine endothelial cells by lectin histochemistry. *Vet. pathol.* 27: 103-109.
3. Dhom G, Hohbach Ch, Mausle E, Scherr O and Ueberberg H(1981). Peliosis of the female adrenal cortex of the aging rat. *Virchows Archiv B* 36: 195-206.
4. Faccini JM, Abbott DP, Paulus Gjj(1990) Cardiovascular system. In: *Mouse Histopathology*, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, pp. 64-71.
5. 藤本 淳, 上田 宏(1989). Weibel-Palade Body. *電子顕微鏡*, 24: 33-39.
6. Furth J, and Sobel H(1946). Hypervolemia secondary to grafted granulosa-cell tumor. *J. Natl. Cancer Inst.* 7: 103-113.
7. 古川文夫, 鈴木順子, 今沢孝喜, 三井雅之, 西川秋佳, 高橋道人(1993). 増殖細胞核抗原(PCNA)免疫染色における染色性の復活. 第9回日本毒性病理学会講演要旨集, pp32.
8. Giorno R(1984). A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the Avidin-Biotin interaction. *Diagn. Immunol.* 2: 161-166.
9. Gumkowski F, Kaminska G, Kaminski M, Morrissey LW, and Auerbach R(1987). Heterogeneity of mouse vascular endothelium: In vitro studies of lymphatic, large blood vessel and microvascular endothelial cells. *Blood Vessels* 24: 11-23.
10. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, and Lane DP(1990). Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathology* 162: 285-294.

11. Haseman JK, Huff J, and Boorman GA(1984). Use of historical control data in carcinogenicity studies in rodents. *Toxicologic Pathology* 12: 126-135.
12. Hoch-Ligeti C, Restrepo C, and Stewart HL(1986). Comparative pathology of cardiac neoplasms in humans and in laboratory rodents: A review. *J. Natl. Cancer Inst.* 76: 127-142.
13. Hoch-Ligeti C and Stewart HL(1984). Cardiac tumors of mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 72: 1449-1456.
14. Hubner G(1966). Electron microscopy of formalin-fixed human tissue. International symposium on electron microscopy and cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 757-758.
15. Inai K, Arihiro K, Takeshima Y, Yonehara S, Tachiyama Y, Khatun N, and Nishiyama T(1991). Quantitative risk assessment of carcinogenicity of Urethane(Ethyl Carbamate) on the basis of long-term oral administration to B6C3F<sub>1</sub> mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 82: 380-385.
16. 井上博之(1988). 背景データ D. 血液学検査. 安評センター所報, 2: 28-30.
17. 猪野義典, 広橋説雄, 佐藤雄一, 熊坂時子, 手島伸一, 下里幸雄(1983). Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) 法を用いた免疫およびレクチン組織化学. *病理と臨床*, 1: 637-640.
18. Ito N, Ogiso T, Fukushima S, Shibata M, and Hagiwara A(1984). Carcinogenicity of Captafol in B6C3F<sub>1</sub> mice. *Gann* 75: 853-865.
19. 岩田 聖, 広内康彦, 榎本 眞(1991). ワークステーションを用いた病理学情報の処理. *日本病理学会会誌*, 80:pp152.
20. Jones TC and Hunt RD(1983). Neoplasms. The cardiovascular system, In: *Veterinary Pathology*, 5th, Lea & Febiger, Philadelphia, pp1264-1266.
21. Jubb KVF, Kennedy PC, and Palmer N(1985). The Cardiomyopathies. In: *Pathology of Domestic Animals* 3rd (3), Academic Press Inc., Tokyo, pp.26-29.

- 22.北浦 泰, 河村慧四郎, 森田 大, 出口宏章, 小高正裕(1982). 心筋症の疾患モデル. 総合臨床 31: 1585-1593.
- 23.間藤方雄(1988). 血管の話. 電子顕微鏡 23: 118-124.
- 24.McAllister HA Jr and Fenoglio JJ Jr(1978). Hemangioma. In:Atlas of Tumor Pathology, Tumors of the cardiovascular system, A.F.I.P., Washington, pp46-52.
- 25.McAllister HA Jr and Fenoglio JJ Jr(1978). Angiosarcoma. In:Atlas of Tumor Pathology, Tumor of the cardiovascular system, A.F.I.P., Washington, pp81-87.
- 26.Melnick RL, Huff J, Chou BJ, Miller RA(1990). Carcinogenicity of 1,3-Butadiene in C57BL/6 x C3H F<sub>1</sub> mice at low exposure concentrations. Cancer Research 50: 6592-6599.
- 27.長村義之(1990). 腫瘍マーカー. 外科病理学 第二版, 石川栄世, 牛島 宥, 遠城寺宗知 編集, 文光堂, 東京, pp.1213-1228.
- 28.Nerem RM and Girard PR(1990). Hemodynamic influences on vascular endothelial biology. Toxicologic Pathology 18: 572-582.
- 29.西山保一(1990). 腫瘍および類似病変. 現代病理学大系, 心臓・脈管 I, 飯島宗一編集, 中山書店, 東京, pp387-402.
- 30.Novilla MN, Sandusky GE, Hoover DM, Ray SE and Wightman KA(1991). A retrospective survey of endocardial proliferative lesions in rats. Vet. Pathol. 28: 156-165.
- 31.岡野光志, 吉田洋二(1992). 内皮細胞の形態と物質の透過性. 細胞, 24: 3-9.
- 32.Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Masson DY(1990). JC70: A new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. J. Clin. Pathol. 43: 752-757.
- 33.Rebar AH, Hahn FF, Halliwell WH, DeNicola DB and Benjamin SA(1980). Microangiopathic hemolytic anemia associated with radiation-induced hemangiosarcomas. Vet. Pathol. 17: 443-454.

34. 佐藤栄一(1984). レクチンの組織化学およびその応用. 病理と臨床 2: 1418-1426.
35. 佐藤公美, 川合陽子, 池田康夫(1992). 血流と血管内皮細胞. 臨床検査, 36: 394-397.
36. Sher SP(1974). Tumor in control mice : literature tabulation. Toxicol. Appl. Pharmacol. 30: 337-359.
37. Solleveld HA, Miller RA, Banas DA, and Boorman GA(1988). Primary cardiac hemangiosarcomas induced by 1,3-Butadiene in B6C3F<sub>1</sub> hybrid mice. Toxicologic Pathology 16: 46-52.
38. Squire RA, Goodman DG, Valerio MG, Fredrickson TN, Strandberg JD, Levitt MH, Lingeman CH, Harshbarger JC and Dawe CJ(1978). Tumors. Cardiovascular system, In: Pathology of Laboratory Animals, Vol 2, Benirschke K, Garner FM and Jones TC(ed), Springer-Verlag, New York, pp1083-1091.
39. 居石克夫(1990). 血管新生の機構. 代謝 27: 1047-1055.
40. Sugimura H, Tange T, Yamaguchi K and Mori W(1986). Systemic hemangiomas. Acta Pathol. Jpn. 36: 1089-1098.
41. 鈴木 潔(1988). 交雑. 実験動物の基礎と技術 I 総論, 日本実験動物学会編, 丸善, 東京, pp197.
42. Wajjiwalku W, Takahashi M, Miyaishi O, Lu J, Sakata K, Yokoi T, Saga S, Imai M, Matsuyama M, and Hoshino M(1991). Tissue distribution of mouse mammary tumor virus(MMTV) antigens and new endogenous MMTV loci in Japanese laboratory mouse strains. Jpn. J. Cancer Res. 82: 1413-1420.
43. Wolstenholme JT and Gardner WU(1950). Sinusoidal dilatation occurring in livers of mice with a transplanted testicular tumor. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74: 659-661.
44. Ward JM, Goodman DG, Squire RA, Chu KC, and Linhart MS(1979). Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging (C57BL/6N x C3H/HeN)F<sub>1</sub>(B6C3F<sub>1</sub>) mice. J. Natl. Cancer Inst. 63: 849-854.

45. 渡辺照男, 徳永 蔵, 下釜達郎, 山田隆啓(1991). 血管内皮細胞の構造と機能. 病理と臨床, 9: 12-17.
46. Yamate J, Tajima M, Ihara M, Shibuya K, and Kudow S(1988). Spontaneous vascular endothelial cell tumors in aged B6C3F<sub>1</sub> mice. Jpn. J. Vet. Sci. 50: 453-461.
47. 吉田洋二(1988). 内皮細胞. 代謝, 25: 56-58.
48. 由谷親夫(1990). 心臓の腫瘍. 外科病理学 第二版, 石川栄世, 牛島 宥, 遠城寺宗知 編集, 文光堂, 東京, pp1026-1029.



Tab.1 Clinical history of the cases of cardiac hemangioendothelial tumor in B6C3F<sub>1</sub> mice

Case	A	B	C	D	E	
Age (weeks)	109	109	109	109	95	
Sex	male	female	male	male	female	
Classify	S	S	S	S	M	S:Schedule sacrificed M:Moribund sacrificed
Administration	Dose	Dose	Control	Dose	Control	
						- Historical data -
Body weight	40.2	29.5	47.1	35.1	33.0	[ 38.9±4.1 ]
Heart :						
Weight(g)	0.18	0.16	-	0.22	0.34	[ 0.18±0.02 ]
Diameter(mm)	5.0	5.0	6.3	5.2	7.0	[ 5.4±0.36 ]
Hematology :						
HCT(%)	42.6	46.4	34.9	35.8	18.4	[ 40.4±1.9 ]
HGB(g/dl)	13.0	13.4	12.5	10.6	6.1	[ 14.4±0.7 ]
RBC(x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	8.48	9.34	8.09	7.56	3.91	[ 8.9±0.4 ]
MCV(μ <sup>3</sup> )	50.3	49.6	43.2	47.3	47.1	[ 45.2±1.1 ]
MCH(pg)	15.3	14.4	15.5	14.0	15.1	[ 16.1±0.5 ]
MCHC(g/dl)	30.5	29.0	35.8	29.7	32.9	[ 35.6±0.7 ]
PLT(x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1751	1174	454	1143	120	[ 1154±118 ]
WBC(x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0.9	1.6	0.6	1.1	0.6	[ 1.6±0.9 ]
Blood smear :						
Atypical RBC	-	-	-	-	+	

Tab.2 Pathological findings of the cases of cardiac hemangioendothelial tumor in B6C3F<sub>1</sub> mice

[ Gross finding ]		Case	Organ	Findings		
	A		Thymus	atrophy		
	B		Thymus	atrophy		
			Spleen	enlargement		
			Ovary	atrophy		
			Uterus	dilated lumen		
	C		Lymph node	enlargement		
			S. intestine	nodule		
			Liver	nodule		
				red path/zone		
			Prep. gland	nodule		
	D		Thymus	atrophy		
			Heart	nodule, reddish, 3x5mm		
			Liver	nodule		
	E		Thymus	atrophy		
			Spleen	nodule		
			Stomach	white patch/zone		
			Kidney	nodule		
			Uterus	dilated lumen		
[ Histological site ]						
	A		Interventricular septum (left ventricular site)			
	B		Left ventricular wall			
	C		Interventricular septum (~ posterior wall)			
	D		Apex			
	E		Interventricular septum (~ right ventricular wall)			
[ Histological diagnosis ]						
	A		Hemangioma			
	B		Hemangioma			
	C		Hemangiosarcoma			
	D		Hemangiosarcoma			
	E		Hemangiosarcoma			
[ Immunohistochemical results ]						
	Case	A	B	C	D	E
- Antigen -						
Vimentin		-	focal+	-	focal+	-
Factor VIII		+	+	focal+	focal+	focal+
CD31		focal+	+	focal+	focal+	+
- Lectin -						
UEA-1		-	focal+	focal+	focal+	focal+
Con-A		+	+	+	+	+
WGA		+	+	+	+	+

**Tab.3** Clinical history of the cases of cardiac hemangioendothelial hyperplasia in B6C3F<sub>1</sub> mice

---

Number of the case :	12	
Age (weeks) :	86 - 109	
Sex :	Female	
Classify :	Schedule sacrificed	4
	Moribund sacrificed	8
Administration :	Dose group	6
	Control group	6
		- Historical data -
Body weight :	43.9±5.4	[ 38.9±4.1 ]
Heart :		
Weight(g)	0.32±0.05 ↑	[ 0.18±0.02 ]
Diameter(mm)	6.6±0.5 ↑	[ 5.4±0.36 ]
Hematology :		
HCT(%)	19.4±8.9 ↓	[ 40.4±1.9 ]
HGB(g/dl)	6.3±3.0 ↓	[ 14.4±0.7 ]
RBC(x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	4.0±1.8 ↓	[ 8.9±0.4 ]
MCV(μ <sup>3</sup> )	48.6±5.3	[ 45.2±1.1 ]
MCH(pg)	15.4±1.5	[ 16.1±0.5 ]
MCHC(g/dl)	31.9±4.0	[ 35.6±0.7 ]
PLT(x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	465±190 ↓	[ 1154±118 ]
WBC(x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	5.2±4.6 ↑	[ 1.6±0.9 ]
Blood smear :		
Atypical RBC	5 / 10	

---

**Tab.4** Gross findings of the cases of cardiac hemangioendothelial hyperplasia in B6C3F<sub>1</sub> mice

Case	Organ	Finding
A	Subcutaneous tissue	mass 35x25mm
	Thymus	atrophy
	Thoracic cavity	hydrothorax
	Abdominal cavity	ascites
	Liver	enlargement
	Spleen	enlargement
	Uterus	dilated lumen
B	Subcutaneous tissue	mass 28x30mm
	Thymus	atrophy
	Thoracic cavity	hydrothorax
	Liver	nodule
C	Subcutaneous tissue	mass 30x25x20mm
		edema
	Thymus	atrophy
	Thoracic cavity	hydrothorax
	Heart	hypertrophy
D	Spleen	enlargement
	Subcutaneous tissue	mass 40x40mm
	Thymus	atrophy
	Thoracic cavity	hydrothorax
	Lung	reddish
	Spleen	enlargement
E	Adrenal gland	enlargement
	Subcutaneous tissue	mass 30x30mm
	Thymus	atrophy
F	Heart	hypertrophy
	Liver	nodule
	Spleen	enlargement
	Ovary	cyst
	Uterus	cyst
	Subcutaneous tissue	mass 28x20mm
G	Thymus	atrophy
	Liver	red path/zone
G	Subcutaneous tissue	mass 40x28x37mm
		edema
	Thymus	atrophy
	Thoracic cavity	hydrothorax
	Abdominal cavity	ascites
	Lung	reddish
	Liver	enlargement
	Spleen	enlargement
	Ovary	cyst
	Uterus	dilated lumen

Tab.4 (continued) Gross findings of the cases of cardiac hemangio-endothelial hyperplasia in B6C3F<sub>1</sub> mice

Case	Organ	Finding
H	Subcutaneous tissue	mass 28x28x22mm edema
	Thymus	atrophy
	Abdominal cavity	ascites
	Lung	red patch/zone
	Liver	enlargement
	Uterus	dilated lumen
I	Subcutaneous tissue	mass 30x30mm edema
	Thymus	atrophy
	Thoracic cavity	hydrothorax
	Lung	red patch/zone
	Heart	hypertrophy
	Spleen	enlargement
	Ovary	atrophy cyst
	Harderian gland	nodule
	Subcutaneous tissue	mass 25x20mm
	Liver	atrophy white patch/zone yellowish
J	Spleen	enlargement
	Lymph node	enlargement
	Uterus	dilated lumen
	Subcutaneous tissue	mass 30x30x20mm
	Thymus	atrophy
	Thoracic cavity	hydrothorax
	Lung	red patch/zone
K	Liver	cyst
	Lymph node	reddish
	Subcutaneous tissue	mass 40x10mm
	Thymus	atrophy
	Lung	reddish
	Heart	hypertrophy
L	Liver	nodule
	Uterus	dilated lumen
	Pituitary gland	red patch/zone
	Pancreas	cyst

Tab.5 Immunohistochemical result of endothelial cells

	Mouse normal endothelial cell	Spontaneous lesion	Induced lesion
[Antigen]			
Vimentin	+	+ (5/5)	+ (5/5)
Factor VIII	+	focal+ (3/5)	-
CD31	+	focal+ (3/5)	focal+ (3/5)
PCNA	-	-	+ (4/5)
[Lectin]			
UEA-1	-	-	-
Con-A	+	+ (5/5)	+ (3/5)
WGA	+	+ (5/5)	+ (5/5)

( ):number of cases.

Tab.6 50 subcutaneous tumors<sup>#</sup> except for mammary adenocarcinoma  
in B6C3F<sub>1</sub> female mice and endothelial cell hyperplasia of the heart

<u>Histological diagnosis</u>	<u>No. of cases(Anemia)</u>	<u>Heart lesion*</u>
Fibrosarcoma	11 (9)	-
Hemangiosarcoma	6 (5)	-
Rhabdomyosarcoma	6 (5)	-
Malignant fibrous histiocyoma	5 (4)	-
Squamous cell carcinoma	5 (5)	-
Metastasis(malignant lymphoma)	5 (4)	-
Hemangioendothelioma	2 (2)	-
Osteogenic sarcoma (bone)	2 (0)	-
Dermatofibroma	2 (0)	-
Leiomyosarcoma	2 (2)	-
Trichoepithelioma	1 (0)	-
Histiocytic sarcoma	1 (1)	-
Xanthoma	1 (1)	-
Lipoma	1 (0)	-

<sup>#</sup>:more than 15mm in size

\*:Endothelial cell hyperplasia of the heart.

Tab.7 Heart lesions in 48 cases shown hydrothorax except for the cases of mammary adenocarcinoma in B6C3F<sub>1</sub> female mice

<u>Heart lesion</u>	<u>Number of cases</u>
1.Endothelial hyperplasia	0 / 48
2.Dilated chamber	8 / 48
3.Metastasis, malignant lymphoma	9 / 48



写真1

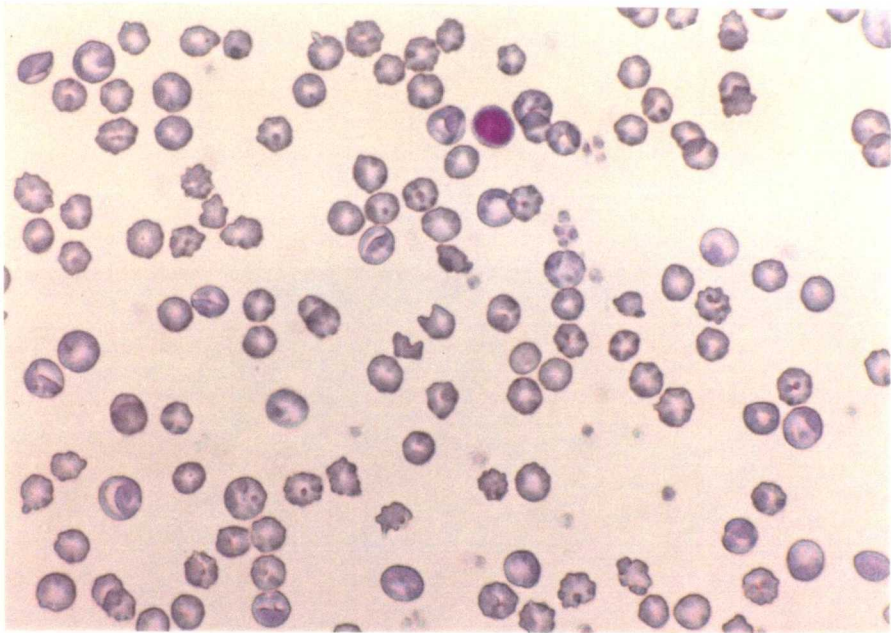


写真2

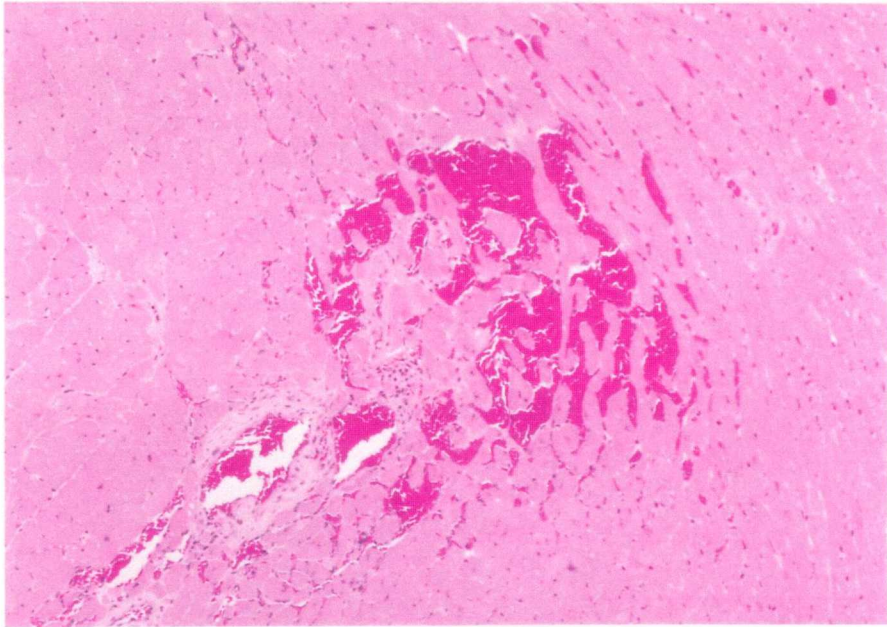


写真3

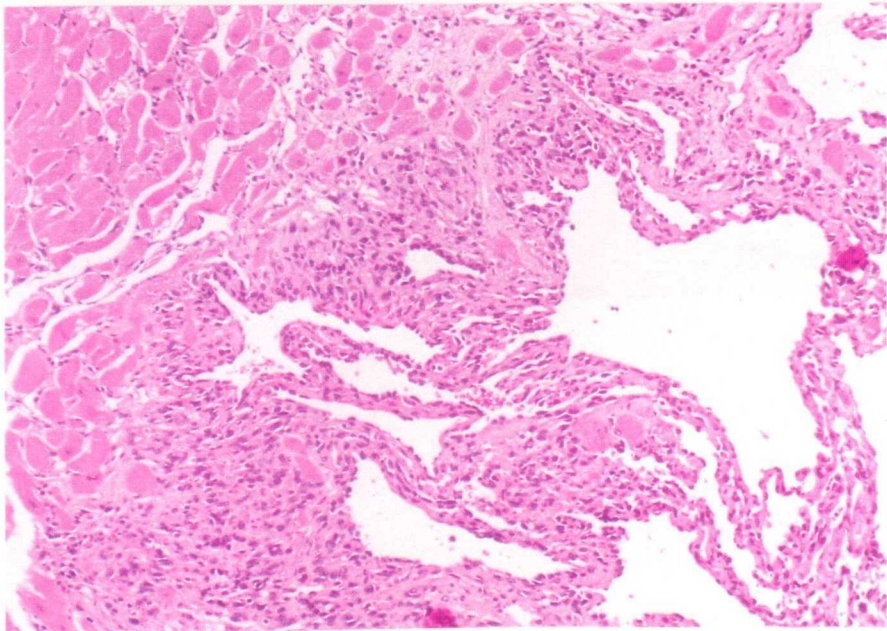


写真4

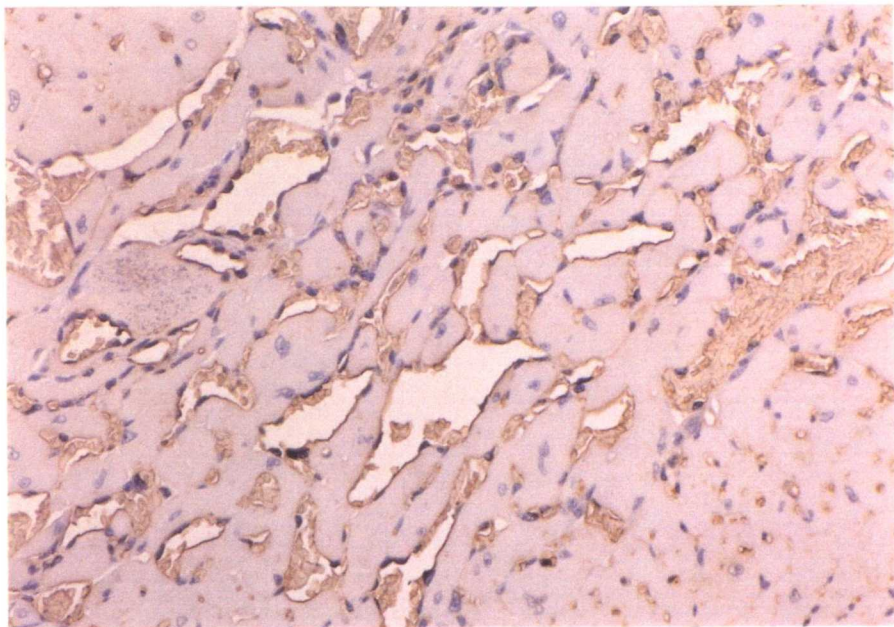


写真5

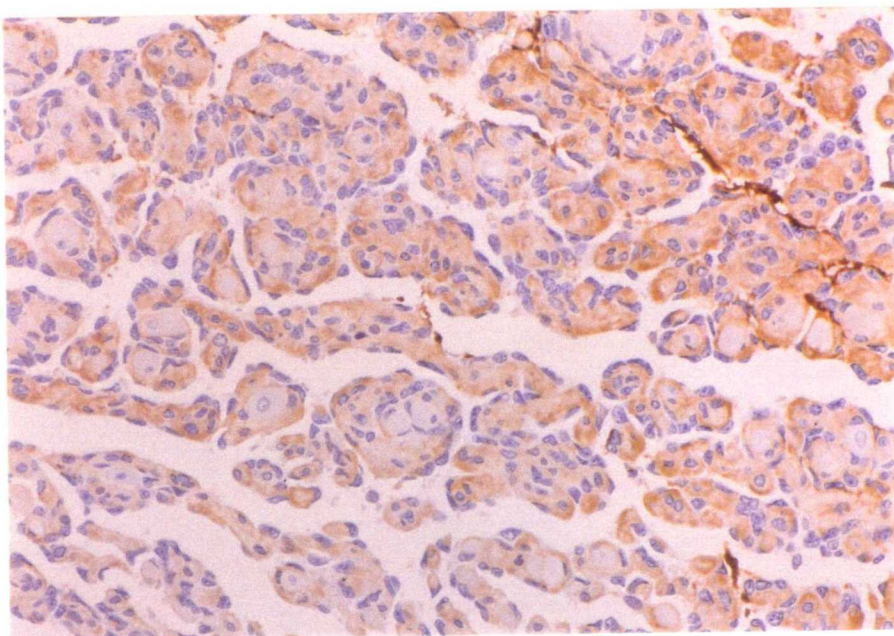


写真6

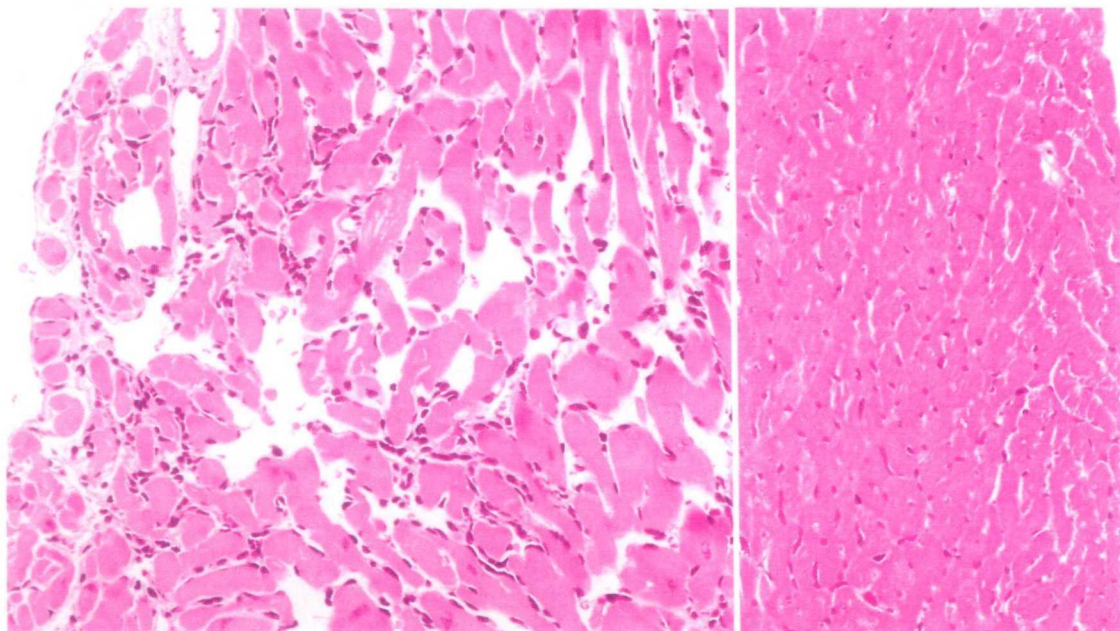
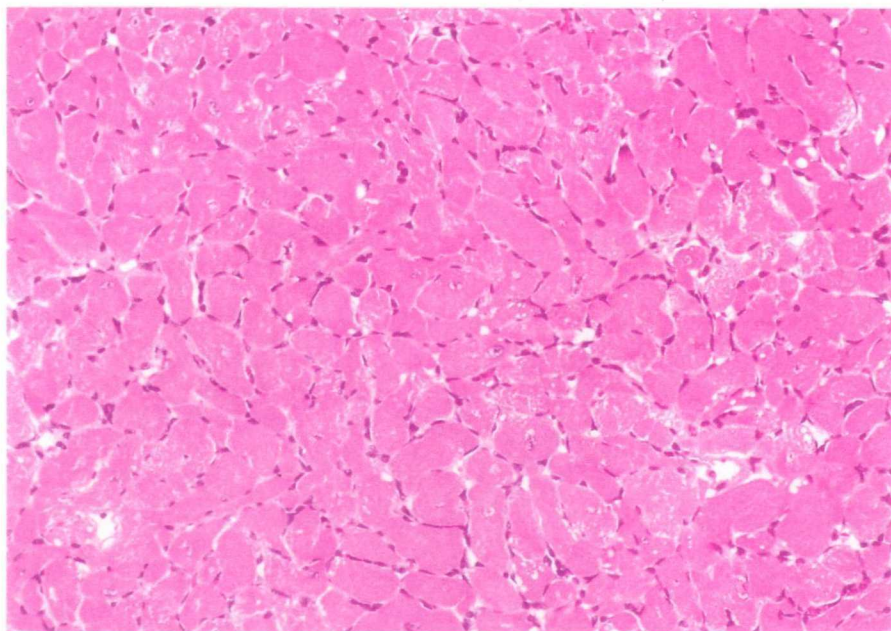
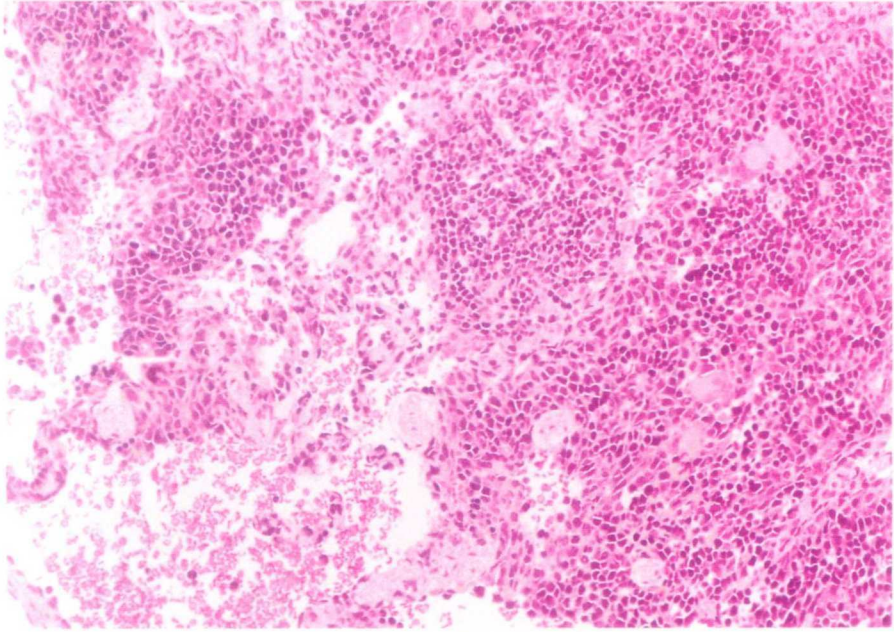


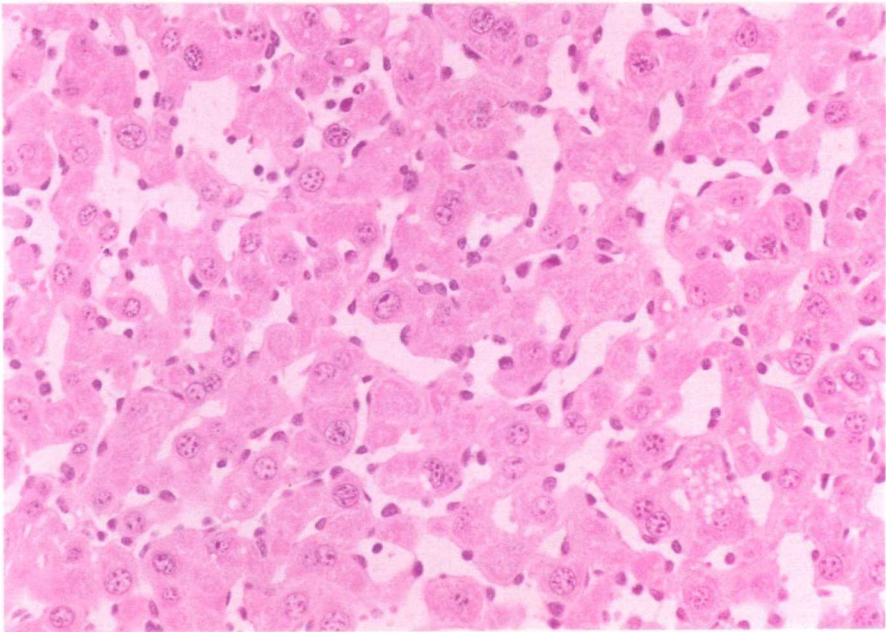
写真7



A



B



C

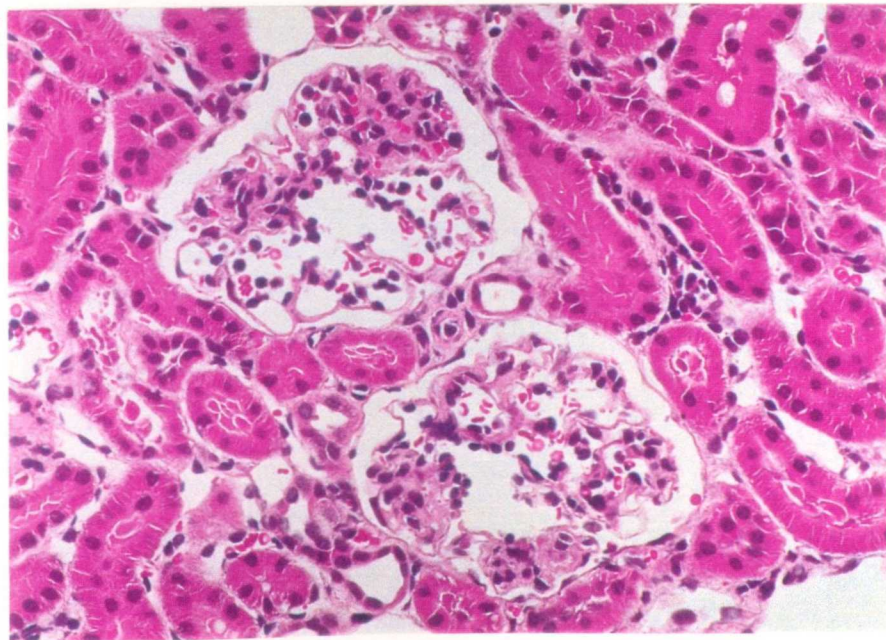


写真 9

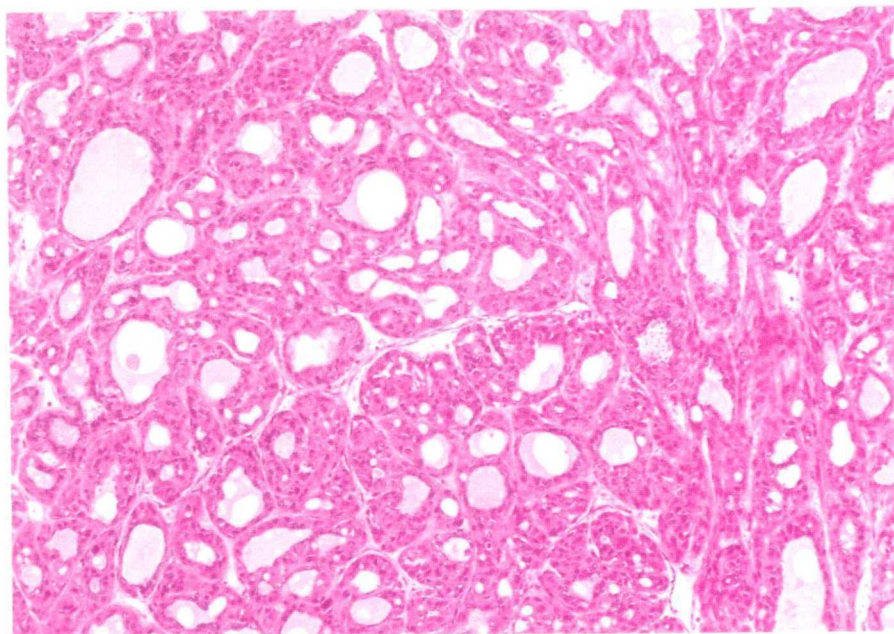


写真10

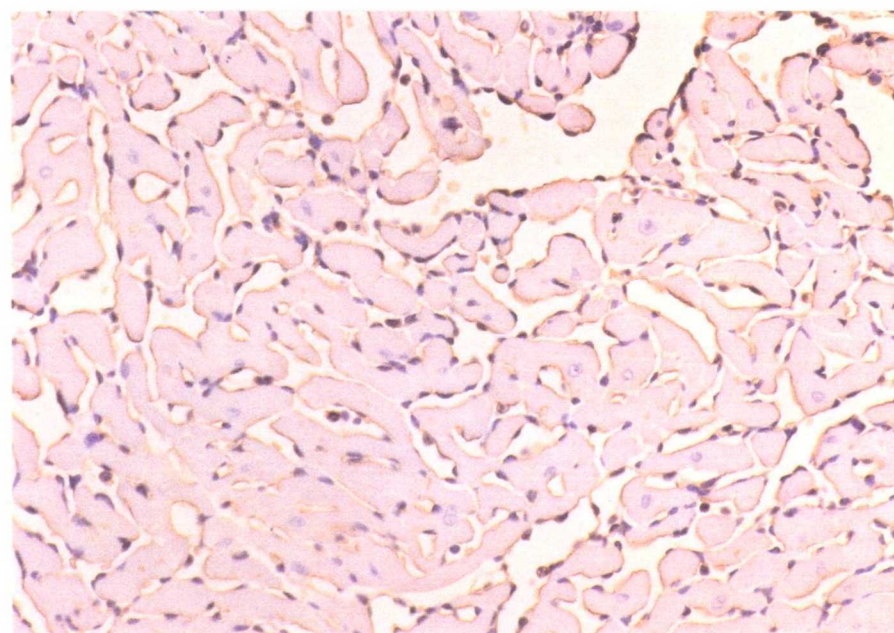


写真11

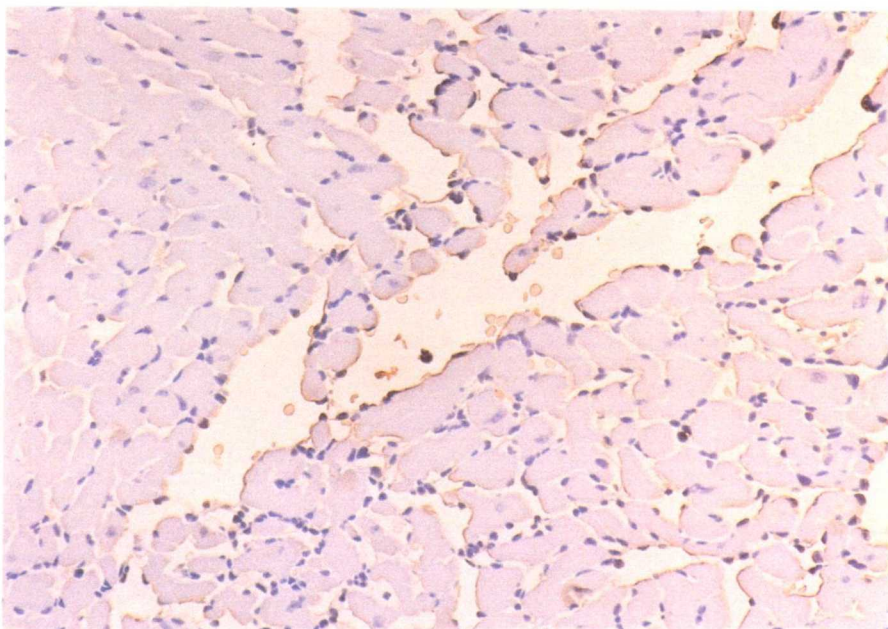


写真12

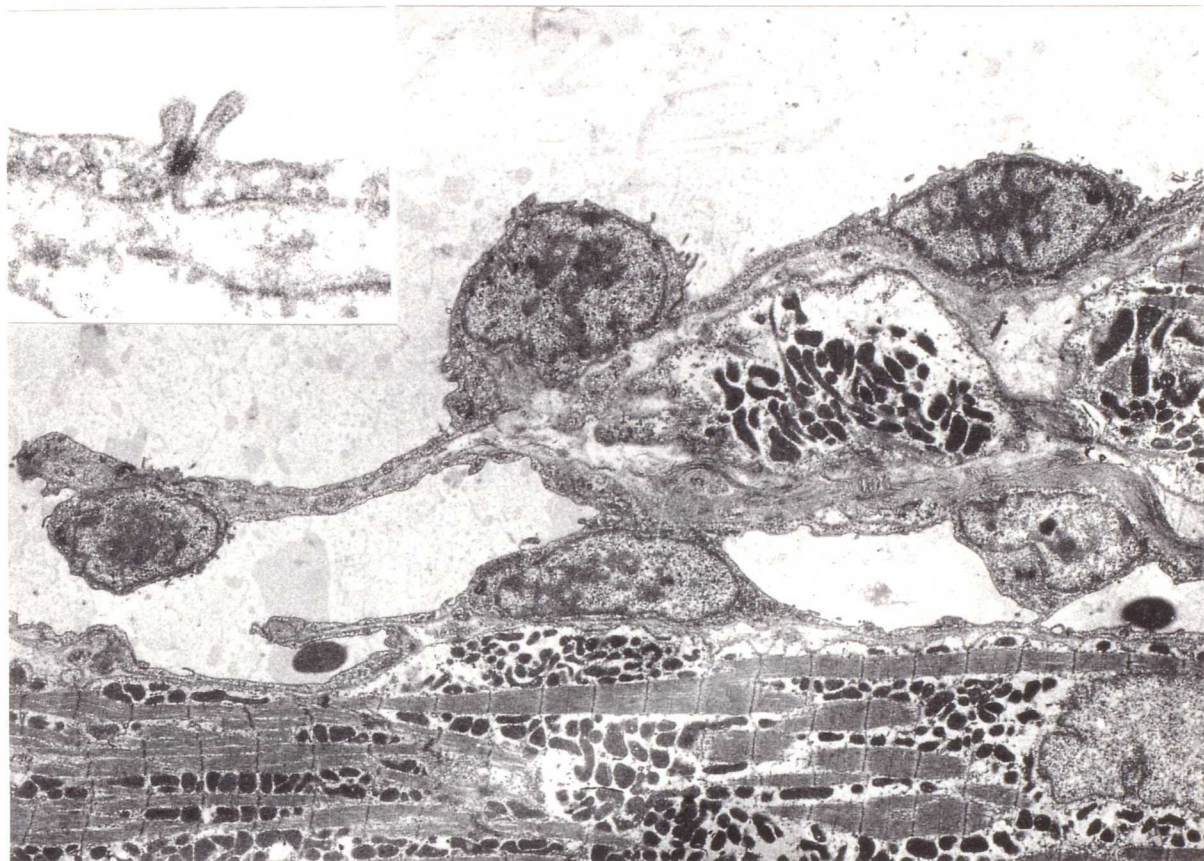


写真 13

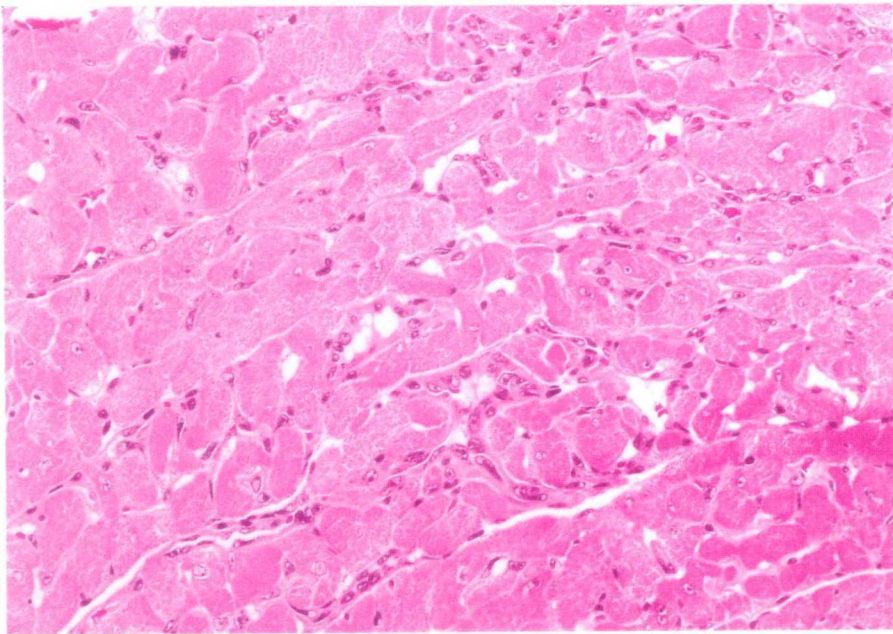


写真 14

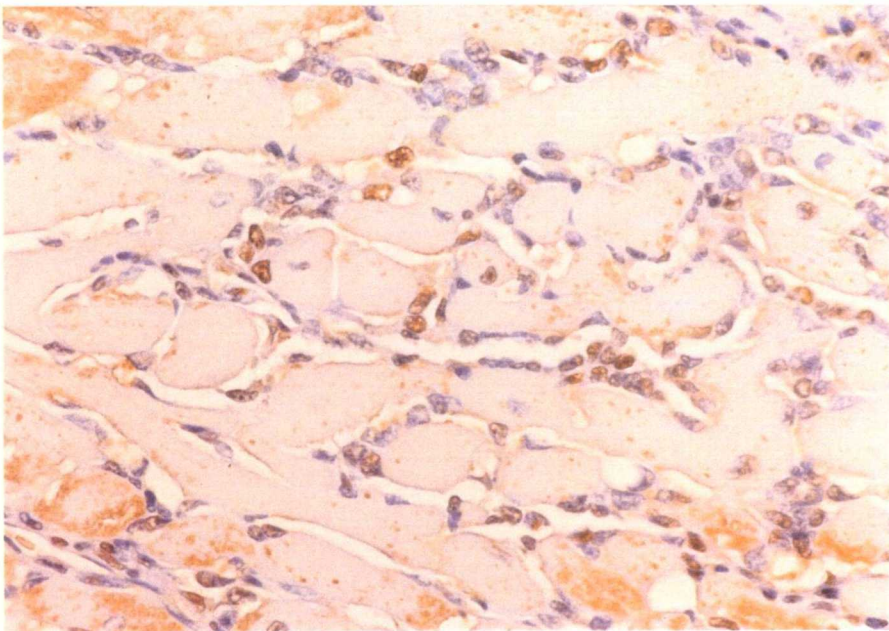
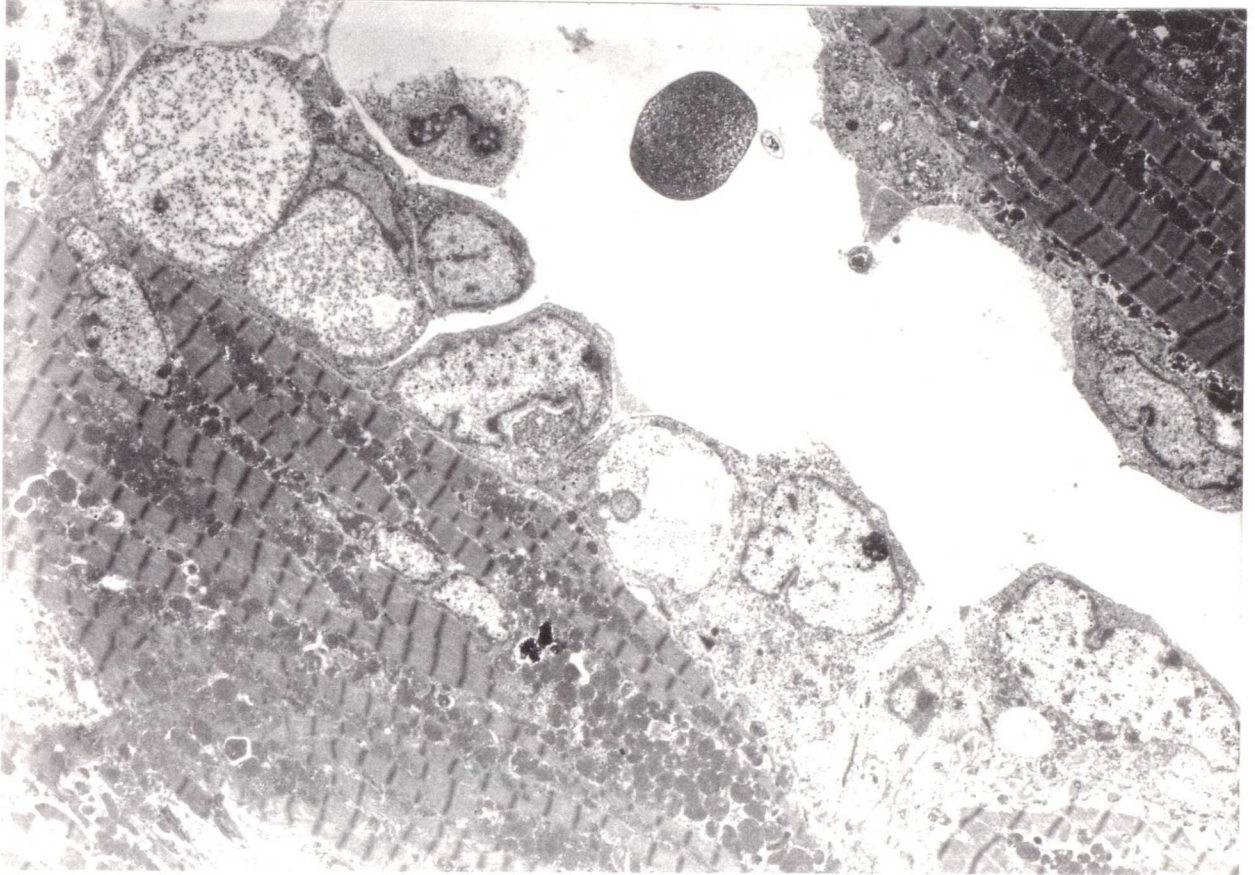


写真15





Study on Spontaneous Hemangioendothelial Cell Proliferative Lesions  
of the Heart in B6C3F<sub>1</sub> Mice.

- Abstract -

Hijiri Iwata.

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (An-Pyo  
Center).

582-2, Arahama, Shioshinden, Fukude-cho, Iwata-gun, Shizuoka-ken,  
Japan 437-12.

B6C3F<sub>1</sub> mouse is a hybrid F<sub>1</sub> mouse of C57BL/6 female mouse and C3H/He male mouse. This mouse is usually used as the experimental animal, especially for long term toxicity studies and/or carcinogenicity studies. Hemangioendothelial cell tumor is known to develop in the variety of organs including the spleen, liver, bone marrow and subcutis tissue either as a single lesion or multiple lesions in B6C3F<sub>1</sub> mice. Spontaneous cardiac vascular endothelial cell tumors in rodents, although extremely rare, were reported in a rat by Schardein (1968) et al., and in a mouse by Leigeti(1984) et al. A few cases of vascular tumors of the heart have been reported to be induced by chemicals including 1,3-Butadiene, 3-Methylcholanthrene, Captafol and Urethane or by irradiation. On the other hand, endothelial cell hyperplasia of the heart was reported as precancerous lesion of hemangiosarcoma, appearing in the heart of mice induced by chemicals such as mentioned above or irradiation. However, no spontaneous cardiac endothelial cell hyperplasia has been reported in animals or even in human beings.

Spontaneous hemangioendothelial cell tumor and hyperplasia of the heart were found in B6C3F<sub>1</sub> (C57BL/6CrSlc x C3H/HeSlc) mice which were used in chronic toxicity and carcinogenicity studies at the Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides. In this report, morphological changes of these endothelial cell lesions and pathogenesis of spontaneously occurring cardiac endothelial hyperplasia are discussed.

**Spontaneous hemangioendothelial cell tumor :** Only five tumors were

found in 4,160 male and 3,910 female B6C3F<sub>1</sub> mice. Hematological and macroscopical examinations revealed no common findings among them. Histologically, two cases(1 male and 1 female) were benign hemangioma and other three cases(2 males and 1 female) were hemangiosarcoma. Since hemangioendothelioma of the bone marrow, liver and spleen were also observed in two cases out of three cases which were diagnosed as hemangiosarcoma of the heart, these cases were likely of so-called systemic or multiple vascular cell tumors. Immunohistochemically, the endothelial cells of two benign hemangiomas and three hemangiosarcomas showed positive reaction to human von Willebrand factor(Factor VIII related antigen) and human endothelial cell (CD31) antigen and positive binding with lectins Wheat germ agglutinin(WGA) and Concanavalin A(Con-A). Consequently, these cardiac tumor cells were identified as hemangioendothelial cells.

**Spontaneous hemangioendothelial cell hyperplasia :** Twelve cases were found in 4,160 male and 3,910 female B6C3F<sub>1</sub> mice. All cases were found in female mice. Furthermore, all cases had mammary adenocarcinomas. Hematological examinations revealed the decreased packed cell volumes, hemoglobin levels and red blood cell and platelet counts in each cases. Atypical red blood cells were also present. Both the weight and maximum diameter of the hearts were greater than those of control data in our institute. Macroscopically, cardiac hypertrophy was a common finding. Histological lesions appeared diffusely in the heart. Numerous widened vascular spaces lined by a single layer of the

endothelial cells with enlarged nuclei were present among the muscle fibers of cardiac wall. Endothelial cell lesions including an increase in number of nuclei, enlarged nuclei and a dilatated vascular cavity were also observed in the spleen, liver and the kidney.

Immunohistochemically, the endothelial cells of these cases showed positive stains for vimentin, human von Willebrand factor and human endothelial cell antigen, respectively and showed positive binding with lectins such as WGA and Con-A. Electron-microscopy revealed microvilli-like structures at the free surface, few cytoplasmic organelles, intermediate filaments, desmosomes and tight junctions at the inter-cellular boundaries and marginal folds, suggesting that proliferating cells of the heart were derived from the hemangioendothelial cells.

**Induced hemangioendothelial cell hyperplasia** (comparison with spontaneous lesion) : Histologically, distribution of the induced lesion was focal or multifocal in the heart. Proliferating endothelial cells in the chemically induced foci had clear and irregular shaped nuclei, slightly enlarged cytoplasm and occasional vacuolations in the cytoplasm. Immunohistochemically, these cells were positive for proliferating cell nuclear antigen(PCNA). However, all cases stained negative for human von Willebrand factor. Electron-microscopy clarified these cells were often irregular oval or cubic in shape, and had a irregularly outlined nuclei containing decreased amount heterochromatin. Organelles were more abundant in the cytoplasm than those of the cells lining

spontaneous lesions and large vacuoles were observed in the cytoplasm. In the induced lesions, endothelial cells exhibited a piling-up proliferation pattern. However, induced endothelial cell proliferations were not found in any other organs.

As described above, morphological differences were evident between the spontaneous and the induced hemangioendothelial cell hyperplasia which was recognized as a pre-neoplastic lesion of hemangiosarcoma. These facts suggested a non-preneoplastic nature of spontaneous cardiac endothelial cell hyperplasia in B6C3F<sub>1</sub> mice.

**Pathogenesis of the spontaneous hemangioendothelial cell hyperplasia of the heart :** Large mammary tumor mass greater than 15 mm in diameter, hypertrophy of the heart, hydrothorax and enlargement of the spleen were common gross lesions among the cases with spontaneously-occurring cardiac endothelial cell hyperplasia. Therefore, hemodynamic influences such as a change of blood pressure originated in circulatory disturbances or shear stress on endothelial cells were suspected to contribute to the development of hemangioendothelial cell hyperplasia. However, no endothelial cell hyperplasia of the heart was present in the cases with subcutaneous tumors other than mammary adenocarcinoma, greater than 15 mm in diameter, frequently accompanying anemia or in the cases of hydrothorax. Spontaneous hemangioendothelial cell hyperplasia appeared to be a systemic lesion, since similar endothelial cell lesions were also present in other organs including the spleen, liver and the

kidney. Therefore, a certain hyperfunction of the endothelial cell was considered as a cause of this lesion. And also, the influence of mouse mammary tumor virus, female sex hormones, or humoral endothelial cell growth factors produced by mammary tumors may have some relation to the pathogenesis of this newly recognized lesion, since all cases of this series had mammary adenocarcinomas. Furthermore, the expression of receptor for these factors on the endothelial cell surfaces was speculated.

Most of the hemangioendothelial proliferative lesions of the heart in mice reported in the literature were hemangiosarcomas or precancerous lesions of hemangiosarcoma induced by the chemicals. In this report, the author described spontaneous hemangioendothelial cell tumor and endothelial hyperplasia of the heart observed in B6C3F<sub>1</sub> mice. It was interesting that pathogenesis of the spontaneous hemangioendothelial hyperplasia was considered to be different from that of the induced hemangioendothelial cell hyperplasia which was recognized as a pre-neoplastic lesion of hemangiosarcoma. Although the pathogenesis of the spontaneous cardiac endothelial cell hyperplasia in B6C3F<sub>1</sub> female mice is still obscure, the lesion is estimated as a new endothelial cell disease.