

論文内容の要旨

[論文題目]

肝細胞癌と B 型及び C 型肝炎ウイルスとの関係
ホルマリン固定パラフィン包埋病理肝組織からの
肝炎ウイルスの直接検出法による解析

[氏名]

枝元 良広

(目的) C型肝炎 (HCV) 感染症の研究は遺伝子工学的手法を用いたウイルスの分子生物学的解析を中心に展開している。また HCV 関連抗体測定系の確立により、HCV の血清診断も容易なものとなった。その結果 C型肝炎の特徴が次第に明らかにされつつある。HCV 感染症の最大の特徴は、高率に持続感染が成立し、その結果 20-30 年後には肝硬変および肝癌発生に深く関わる事である。肝細胞癌は全世界的にその発生率が増加しており日本においてもこの 20 年間で増加を続けている。これまで疫学的研究により肝細胞癌の成因の一つとして HCV 感染が重要な因子であることは明らかである。しかし C型肝炎の慢性化や肝発癌機構などはいまだ不明で、今後に残された大きな課題となっている。これまで C型肝炎の臨床および分子ウイルス学的特徴は、分子生物学的手法により多くのものが解明され続けているものの、組織病理学的研究報告は少ない。これは HCV の細胞内ウイルス量が極めて少ない事が一因と考えられる。そこで今回この問題にアプローチするために、保存性が良く大量の検体を得る事ができ、病理学的な検討が可能である通常ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded: 以下 FFPE) 病理材料を用いた HCV-RNA の直接検出法について検討した。またこの方法を用いて B型肝炎ウイルス (HBV)、G型肝炎ウイルス (HGV) を含めてレトロスペクティブに肝炎ウイルスと肝癌の関わりを検討し、さらにこの方法を用いていろいろな地域における肝炎ウイルス感染と肝癌の地理病理学的特徴を明らかにし、血清保存の困難な開発途上国においては肝炎ウイルスと肝癌との関係

との関係を肝内からの肝炎ウイルスの直接検出を行うことにより検討した。

(方法) 1984年から1994年にかけて外科的に切除した日本人 FFPE 肝癌組織 102 例を対象とした。また海外施設と共同で 65 例の米国人症例、55 例の韓国人症例、20 例のスペイン人症例、8 例の在米日系人症例、28 例のベトナム人症例、21 例のミャンマー人症例の計 197 症例の海外検体についても肝炎ウイルス遺伝子の検出を行った。検体は可能な限り壊死部と非癌部を除いた部分を使用した。パラフィンブロック (2~4cm²) より薄切片 (約 10 μm) を作製しマイクロチューブ内で脱パラフィン化を行った後に、プロテナーゼ K (500 μg/ml) を含む溶液 (Lysis buffer) にて消化し、フェノール、クロロホルム法にて核酸を抽出した。核酸の増幅は nested (RT-)PCR 法にて行い、HBV-DNA、HCV-RNA、HGV-RNA の各遺伝子を増幅した。β-actin RNA も同時に増幅し、細胞内 RNA の陽性コントロールとした。Lysis buffer の消化時間、ホルマリン固定時間による影響、同一例の凍結肝組織との連続希釈法による比較を行い検出感度を検討した。又 PCR 産物の特異性はサザンブロッティング法にて確認した。一部の症例ではサブクローニングにて遺伝子解析を行いその有用性を検討した。

(結果) Lysis buffer 消化 4 時間の時点より HCV-RNA は検出された。HCV-RNA は 4 ヶ月以上ホルマリン固定された切片からは検出し得なかった。新鮮凍結切片に比較し FFPE 検体の方が、10² コピーの感度低下を示し、約 10-16% の検出率低下を認めた。全ての症例の FFPE 病理検体から β actin RNA は増幅可能であった。日本人症例は HCV-RNA が 102 例中 64 例 (62.7%)、HBV-DNA は 21 例 (20.6%) で検出された。肝内 HCV-RNA、HBV-DNA 重複陽性例は 6 例 (5.9%) であった。血中抗 HCV 抗体陽性例は 77.1% で肝内 HCV-RNA が陽性を示し高い相関が見られ、HCV-RNA 陽性例中約半数でマイナス鎖 HCV-RNA も陽性であった。HCV-RNA ゲノタイプは 64 例中 50 例 (78.1%) で II 型 (=1b) を示した。HBV-DNA 陽性例中には血中 HBV 関連抗原抗体陰性例が 4 例、また HBs 抗体陽性例が 1 例で存在した。肝内 HCV-RNA 陽性肝癌の組織分化度は HCV 陽性例と HBV 陽性例では違いを認めなかった。肝内 HCV-RNA 陽性例の 75.8% と肝内 HBV-DNA 陽性例の 80.9% は完成された肝硬変を伴っていた。これら 102 例中 3 例 (2.9%) は血清及び肝内からも肝炎ウイルスは検出されなかった。海外検体の HCV-RNA の陽性率は、米国人症例 65 例中 27 例 (41.5%)、韓国人症例 55 例中 3 例 (5.5%)、スペイン人症例 20 例中 14 例 (70%)、在米日系人症例 8 例中 0 例、ベトナム人症例 28 例中 1 例 (3.6%)、ミャンマー人症例 21 例中 1 例 (4.8%) であった。HBV-DNA 陽性率は、米国人症例 65 例中 7 例 (10.8%)、韓国人症例 55 例中 45 例 (81.8%)、スペイン人症例 20 例中 6 例 (30%)、在米日系人症例 8 例中 4 例 (50%)、ベトナム人症例 28 例中 13 例 (46.4%)、ミャンマー人症例 21 例中 8 例 (38.1%) であり、肝癌と関連する肝炎ウイルスの地域特異性が認められた。ベトナム人症例およびミャンマー人症例において各一例ずつ HGV-RNA が陽性であった。HBV、HCV ともに検出された症例は米国人 1 例 (1.5%)、韓国人 2 例 (3.6%)、スペイン人 6 例 (30%)、ミャンマー人 1 例 (4.8%) であった。(表 1) 日本人症例も含めると肝内 HCV-RNA、HBV-

DNA の重複陽性例は 299 例中 16 例(5.4%)で、その内 HBs 抗原陰性が明らかなものは 9 例(3%)であった。この 9 例中 HBc 抗体陽性例は 5 例(56%)認められ肝内 HBV-DNA の指標として HBc 抗体の重要性が示された。HCV-RNA のゲノタイプは米国人症例、韓国人症例、スペイン人症例はそれぞれ II 型(=1b)が 27 例中 21 例 (77.8%)、3 例中 3 例 (100%)、14 例中 14 例 (100%) と最も多く、ベトナム人及びミャンマー人症例は分類不能型であり、地域に関係なくゲノタイプ II 型(=1b)が多く認められた。HCV 陽性肝癌では全症例肝硬変を合併していた。肝内肝炎ウイルス及び血清学的に肝炎ウイルスの関与が否定された症例は、米国人 65 例中 4 例(6%)と、スペイン人 1 例(5%)のみであった。この米国人 4 例は全て肝硬変を伴っているものの、日本人症例と異なり門脈域の炎症細胞浸潤は認めないか認めても極わずかであった。韓国人 FFPE 肝癌症例において血清 HBs 抗原 抗体の重複陽性症例が 4 例認められ、この内 2 例の HBV 各領域における遺伝子解析が可能であった。HBs 抗原共通抗原決定基 a 上の N 末端から 126 番目のアミノ酸がスレオニン又はイソロイシンからセリンに置換していた。precore 領域では 1896 番目の塩基が G→A に変異し、28 番目のアミノ酸がトリプトファンからストップコドンに置換していた。HBx 領域では 1753 番目の塩基が T→C に変異し、イソロイシンまたはバリンがスレオニンに置換していた。また 19bp の塩基の欠失を認めた。

(考察) 今回の研究により 1 日という短い時間内に 11 年前の通常の行程を経たホルマリオン固定パラフィン包埋肝癌組織からでもごく微量な HCV-RNA を含む肝炎ウイルス遺伝子の検出が可能であり、肝癌と肝炎ウイルスとの密接な関係を検索する事ができた。C 型肝炎ウイルスは、特にゲノタイプ II(=1b)型は、日本人、米国人、スペイン人において肝発癌の重要な要因であることが示された。しかしながら韓国人、在米日系人、ベトナム人、ミャンマー人では、B 型肝炎ウイルスが肝発癌の主要な要因であり、肝発癌と関係する肝炎ウイルスの地域特異性が示された。この韓国人症例の HBs 抗原抗体重複陽性例では、HBs、HBprecore、HBx 領域での特徴的な変異を検索し得た。また B 型、及び C 型肝炎ウイルス重複陽性例のうち、約半数は血清 HBs 抗原陰性症例であり肝組織内からのウイルス遺伝子検出の重要性が示された。これに対して G 型肝炎ウイルス遺伝子は 2 例の肝癌組織内からしか検出されず、肝発癌の要因として B 型、及び C 型肝炎ウイルスと同様な関係は示されなかった。日本人症例の 3%、米国人症例の 6%、スペイン人症例の 5%は、血清及び肝組織内からも肝炎ウイルス遺伝子の検出されない成因不明肝癌と診断された。この成因不明肝癌において日本人症例では、米国人症例と対照的に非癌部肝組織に強い慢性炎症細胞の浸潤を認め、ウイルス等の肝炎を引き起こす別の要因が考えられた。地域に関係なく肝癌症例のほとんど (75%-100%) は、肝硬変を伴っており肝癌と肝硬変の密接な関係が示された。

表1 各国FFPE肝癌組織におけるHCV-RNA 及び DNA、HGV-RNAの検出率

人種	症例数	HBV DNA	HCV RNA	HGV RNA	H
日本人	102	21(21%)	64(63%)	0	
韓国人	55	45(81.8%)	3(5.5%)	0	
米国人	65	7(10.8%)	27(41.5%)	0	
在米日系人	8	4(50%)	0	未検査	
スペイン人	20	6(30%)	14(70%)	0	
ベトナム人	28	13(46.4%)	1(3.6%)	1(9.7%)	
ミャンマー人	21	8(38.1%)	1(4.8%)	1(4.8%)	

* 血清学的データ及びPCR結果により判定