

審査の結果の要旨

氏名 枝元 良広

本研究は肝細胞癌の発生において重要な関係を持つと考えられている B 型 (HBV) 及び C 型肝炎 (HCV) 感染症の、分子生物学的手法を用いた組織病理学的解析を目的として、良好な保存性、大量検体の獲得、病理学的な検討等が可能である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 HBV-DNA、HCV-RNA 及び G 型肝炎ウイルス (HGV-RNA) の各肝炎ウイルス遺伝子の肝組織からの直接検出法を確立し、かつ多種、多様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解析することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. FFPE 肝組織からの核酸抽出において 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検出感度を検討した結果、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、 10^2 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 病理検体から細胞内 RNA のコントロールとして β actin RNA は増幅可能であった。
2. 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 抗体陽性例は肝内 HCV-RNA 陽性例と高い相関が見られ、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。
3. 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。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。

4. 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。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。
5. 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 例認められた。この内 2 例の HBV-DNA 塩基配列の解析の結果、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。

以上本論文は、11 年前のホルマリ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る事を明らかにした。日本人、米国人、スペイン人、韓国人、在米日系人、ベトナム人、ミャンマー人では、肝発癌の要因として肝炎ウイルスの地域特異性が示された。本研究は地域に関わらず肝癌と肝炎ウイルスとの関係を分子病理学的に解明する上で重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。