

肝細胞癌発症における慢性肝炎の果たす役割についての研究

《研究の概要》

日本における癌の死亡率において肝細胞癌による死亡は男性では3位、女性では4位と高位を占めている。これは日本が肝炎ウイルスの浸淫地域であることによると考えられている。しかし肝炎ウイルスは1種類ではなく慢性肝炎をきたし肝細胞癌と関係が深い肝炎ウイルスとしてはこれまでにB型肝炎ウイルスとC型肝炎ウイルスが知られている。

B型肝炎ウイルスは1965年に既に発見されており肝細胞癌との因果関係は疫学的にも明らかである。C型肝炎ウイルスが発見されたのは1989年と最近であり、肝細胞癌発癌との関係をあきらかにする追跡調査が始まってまだ経過期間が短い。またこの研究が開始された後に新たにG型肝炎ウイルスが発見されたがこのウイルスと肝細胞癌の関係は未だ不明である。

以上慢性肝炎から肝細胞癌が発症してくることは経験的に知られているがその発癌の機序は全く不明であるが、次の2通りの可能性がある。

1. 肝炎ウイルスによりヒト遺伝子に固有の異常がもたらされその結果発癌遺伝子の活性化をきたし肝細胞癌が発生する。
2. 肝炎ウイルスとの直接的な因果関係がなく慢性炎症による肝細胞の脱落により肝細胞の再生が間断なく生じることにより確立的に癌発生が高まっている。

1に関してはこの研究によりB型肝炎ウイルスのDNA中にヒトDNAの組み替えを促進する働きがある部位がありこの部位に結合する蛋白質がヒト肝細胞内に存在することがあきらかになり、この蛋白質をクローニングすることに成功した。この蛋白質は増殖期の肝臓や肝細胞癌で発現が高いことを見だしそのアミノ酸の組成を明らかにした。

一方C型肝炎ウイルスにおいてはいまのところ特に遺伝子異常は見いだされていないが、過去の病理標本からこのウイルスを検出する方法を確立できたのでこの方法によりウイルス発見以前の肝細胞癌が密接にこのウイルスと関係があることが判明した。またチンパンジーの接種実験により感染により慢性化する場合としない場合とではウイルスの変位部位に差があること明らかになりC型慢性肝炎と肝細胞癌との関係が深いことが判明した。

G型肝炎も同様な方法で検索したが肝細胞癌における率は非常に低く大部分はC型肝炎との混合感染であり、肝細胞癌との関係は少ないと推定される。

ウイルスと関係なく銅代謝異常により発癌するLECラットと肝炎ウイルスによる発癌してくるウッドチャックにたいする免疫賦活剤(OK-432)と甘草の主成分であるグリチルリチンの投与実験はまだ完全に終了していないが中間的にはいずれも事故死をのぞき100%肝細胞癌を発症してくる。前者ではOK-432は肝炎による死亡率を雄ではおさえるが肝細胞癌の発症を雄、雌いずれも早める結果となっている。グリチルリチンの効果は見いだされていない。

研究者氏名および所属機関

研究者氏名	所属機関および地位	分担研究課題
志賀淳治	帝京大学医学部教授	代表：動物実験(LEC ラット、ウツドチャック)
阿部賢治	国立予防衛生研究所主任研究官	C型肝炎ウイルス検出系の確立、動物実験(チンパンジー)
樋野興夫 (平成7年のみ)	癌研究会癌研究所実験病理部部長	B型肝炎ウイルス結合蛋白質の分離とヒトDNAに対する作用
梶野一徳	同上研究員	同上

研究報告

I. 研究目的

肝細胞癌発症における慢性肝炎の果たす役割についての研究の目的は日本においてガン死因の上位をしめる肝細胞癌の原因として慢性肝炎がどうかかわっているかを明らかにしその治療(予防)方法を確立することである。

慢性肝炎の主たる原因は肝炎ウイルスであるが肝細胞癌発症においてはウイルス感染による肝細胞の遺伝子レベルの変化が原因となるのか、あるいは慢性の炎症による肝細胞の破壊それ自体が重要な意味を持っているのかは未だ不明である。B型肝炎ウイルスにより生じる肝細胞の遺伝子変化も少なからず報告されているし、我々もこれを確認しているがこれらの変化は多様で一定の傾向を示さず現在まで確定的な証拠は見いだされていない。一方肝細胞癌発症の原因としては肝炎ウイルスが直接関与するのではなく慢性肝炎における持続的な肝細胞の壊死脱落であるとも考えられる。この二つの病因論的差異を明らかにすることは肝細胞癌の予防における戦略上重要である。

この研究では肝細胞癌関連とされているC型肝炎ウイルス(HCV)とB型肝炎ウイルス(HBV)を中心としてその肝細胞癌と関連すると想定される肝炎ウイルスを対象として肝細胞癌発症の機序をウイルスの構造と機能の側面から究明するとともに肝炎ウイルスと関係ない肝炎を母地として発症する肝細胞癌を対象としてその発症機序と治療、予防の手段を探ろうというものである。

HCVに関しては現在日本においては最も肝細胞癌と関係の深い肝炎ウイルスとされているが発見されたのが新しく慢性肝炎成立(感染が一過性に終わらず持続感染に移行する)機序そのものが解明されておらず、また過去の日本において肝細胞癌発症にどの程度関与していたか不明であるのでそれを明らかにする。

HBVにおいてはその慢性肝炎成立の機序と肝細胞癌との因果関係は疫学的に明らかであり、HBV関連肝細胞癌においてはHBVDNAが宿主のDNAに組み込まれていたり、染色体の転座や欠失が見られ、またDNAパターンに変化が存在すること等により染色体の構造的変化が存在することが知られている。しかしどのようにして染色体の構造変化が生じるかは不明な点が多い。慢性肝炎が持続する状況下でHBVDNAが積極的に染色体DNAの組み込みを誘発するという仮説のもとにその関連蛋白質の分離同定とその働きを解明する。

HBVDNA の C 領域に重なる 61 断片 (15AB, HBVDNA nt. 1855-1915) には細胞増殖抽出蛋白と結合して DNA 組み替えを促進する働きがあることが証明されている。そして細胞内には 15AB に結合する蛋白が存在するのでまずこの 15AB 結合蛋白質を分離することを目的としその後その作用を検索する。

また現在最も多い HCV よる慢性肝炎に対してはインターフェロン治療が主として行われているが、これはウイルスの排除を直接目標としており著効例もあるが、治療後になお血中ウイルスが持続している例のほうが多い。この研究により肝細胞癌の発症における慢性炎症の重要性が明らかされると期待されるが、そうすればウイルスを排除できなくとも炎症さえコントロールできれば肝細胞癌予防の目的が達成される。慢性肝炎のインターフェロン治療の戦略もウイルスの排除ではなく炎症をコントロールすることで済むので患者負担と医療費負担が少くなる。また炎症をコントロールする既存の薬剤も既にいくつか開発されており、慢性肝炎に対してもインターフェロン以外の治療法をとることができ選択肢が広がる。インターフェロン治療以外の治療方法の確立のためには免疫賦活とその作用機序は明らかでないもののヒト肝炎にたいする非特異的な効果が臨床的に立証されているグリチルリチン製剤の可能性を検討した。

以上我々は肝細胞癌発症における慢性肝炎ウイルスの役割における検討では肝炎ウイルスが密接に結びついておりヒト宿主の遺伝子変化をきたし発癌にむすびつく可能性と必ずしも肝炎ウイルスが関与しない肝細胞癌発症の両面から検討しその新しい治療の可能性を検索した。

II. 研究計画および材料と方法

この研究の目的のために研究対照を動物実験とヒトの慢性肝炎ないし肝細胞癌の病理学的研究の 2 つに大別して以下の研究を行った。研究の方向は次の 3 項目に大別される。

1. ヒトの研究においてはまだ C 型肝炎ウイルスが見いだされていなかった当時の肝細胞癌症例のうち C 型肝炎ウイルスが関与していた症例がどの程度存在していたかを明らかにするために病理のパラフィンブロックとして保存されている資料からウイルスを検出する感度のよい方法の開発を目指した。その方法を中心として既知の肝炎ウイルスが病理的どの程度肝細胞癌発症に関与しているかを日本の過去の肝細胞癌症例および外国の肝細胞癌症例を検索した。

ここにおける動物実験としてはヒト C 型肝炎ウイルス感染が成立したチンパンジー C 型肝炎ウイルスキャリアーの追跡実験を行い慢性肝炎が成立する機序をウイルスの変異株をふくむ構造から検討しつつ肝細胞癌が発症するかどうかを経過観察する。

HCV 変異株と感染成立との関係を検索するためにもこの HCV 感染チンパンジーを使用する。HCV-F 株およびヒト患者血清を接種して感染が成立した 18 頭が検討対象である。持続感染成立動物と一過性感染に終了した動物とのウイルスの遺伝子構造の差を検討する。そのために感染チンパンジーにおける HCV のウイルスエンベロープ領域に存在する高変異領域 (HVR) の役割を解析した。方法は nested RT-PCR で HCV-HVR 領域 (96bp) を増幅し、サブクローニングによって塩基構造を決定した。得られた塩基構造をもとに互いにオーバーラップするようにデザインした合成ペプチド (48Vaa 1~3) を 3 種類作成しこれを抗原とし ELISA 法により血中 IgG, IgM-HVR 抗体を測定した。

なお最近発見された G 型肝炎ウイルスも同様な手法で検索系を確立してこの肝炎ウイルスが肝細胞癌発症に関係するかどうかをも検討した。

2. ヒト B 型肝炎ウイルスにおけるヒト遺伝子の不安定性の誘発

ヒト癌遺伝子を介して発症する肝細胞癌が存在するという仮説のもとに B 型肝炎ウイルスにはヒトの遺伝子転座を生じせしめる蛋白質が存在するとの仮定のもとにそれを探した。15AB 結合蛋白質の分離には DNA 組み替え活性の確認されているマウス白血病細胞 70Z/3 の発現ライブラリーを用いて標識した 15AB をプローブとしてスクリーニングを行い分離した蛋白質のクローニングを行う。クローニングされた蛋白質の 15AB との結合性の特異性を塩基配列を変換することにより確認する。次いでこの蛋白質が肝細胞の増殖期で多量に発現しているかを *in vivo* で確認し最終的にリコンビネーション活性を調べる。この活性検索には *in vitro* recombination assay 系を用いる。

3. 慢性肝炎と肝細胞癌非特異的治療のための動物実験

慢性肝炎から肝細胞癌を発生する動物を使用してその慢性炎症を既知の既に肝炎に効果があると実証されている非特異的免疫賦活剤等で炎症をコントロールして肝細胞の再生と癌化に影響があるかどうかを検討した。肝炎と肝細胞癌発症を抑制するための動物実験においては動物としてウッドチャックと LEC ラット (Long Evans Cinamon) を使用した。ウッドチャックにはヒト B 型肝炎ウイルスとほぼ同様の遺伝子構造とその生成蛋白質を有するヘパドナウイルスキャリアーが存在する。キャリアーは出産時の垂直感染によるが生後約 3 年で肝細胞癌を発症する。LEC ラットは銅の代謝異常により肝細胞内に銅が沈着し生後数週間で劇症肝炎を発症しその 1 年後に肝細胞癌を発症すると言われている。ヒト Wilson 病の動物モデルである。

ウッドチャックは 1 年齢のウッドチャック肝炎ウイルスキャリアーで実験群は雄 5 匹、雌 7 匹、対照群は雄 6 匹、雌 5 匹の構成である。使用した免疫賦活剤としての薬剤としては抗癌剤である OK-432 (中外製薬) を 1 週間に 1 回 0.5ml を筋肉内に注射した。肝機能障害の程度とウイルス活性の変化を測定するために血清 GOT, GPT, rGT P, 肝炎ウイルスの表面抗原と抗体 (WHsAg, WHsAb), WHV DNA, WHcAb を 2 カ月に 1 度測定した。LEC ラット: 7 週齢の雄、雌の LEC ラット (CSK リサーチパーク) を使用した。薬剤投与後 25 週齢の生存率および死亡までの経過期間の差を検討した。

投与薬剤とその方法は以下の如くである。

1. OK-432: 免疫賦活剤としては OK-432 (中外製薬) を用いた。経口投与群は実験群 1 匹あたり 2.5 単位 (0.5ml) を経ロゾンデを使用 1 週間 1 度投与した。コントロール群にたいしては同様に生理食塩水を同量投与した (雄: 実験群 31、対照群 31。雌: 実験群 17、対照群 14)。腹腔内投与群は 5.0 単位 (1.0ml) を週 1 度腹腔内に投与した (雌のみ実験群 6、対照群 6 匹)。

2. グリチルリチン (ミノファージェン) の実験群に関してはこれを飼料とした与えた群と腹腔内接種した群を作成した。飼料群では通常のラット飼料に混じり含有量 0.025% とし、雄は毎日グリチルリチン平均 5mg、実験群 8、対照群 7、雌は 3.5mg を摂取することにした実験群 10、対照群 10 匹。腹腔内接種群では 2mg を 1 週間に 1 度投与した。雌のみで実験群 6、対照群 6 匹。

さらにグリチルリチン投与群では銅蓄積障害の影響をみるために通常飼料の銅含有量

の約 1/2 (9 μ g/g) とした飼料 (CE2: 船橋) を 1 日 20g 与えた群を作成した。この群にはグリチルリチンを (1mg: 皮下注射) 週 3 回投与した (雄 12 匹)。これにたいするコントロール群では同量の生理食塩水を与えた (雄 11 匹)。

以上死亡動物は全例全臓器を病的に検索した。

3. OK-432 の免疫活性効果は NK の活性を指標とした。NK assay は実験群においては OK-432、5KE を 5 匹の雄に連日投与、腹腔内投与を 5 日続けた後に動物を殺傷して末梢血、脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板のリンパ球を回収しこれを使用した。コントロール群では生理食塩水を 5 匹の雄に同様に投与して比較した。

4. 肝臓の銅の定量は雄ラットに 6 匹に経口で OK-432 を 5KE を週 1 回投与し 10 週齢、20 週齢で 3 匹ずつ殺傷して肝臓をとりだして乾式灰化の後原子吸光光度計によって測定した。コントロール群では生理食塩水を同様に投与し、実験群とおなじ操作で比較した。

III. 研究成果

1. C 型肝炎ウイルスと肝細胞癌との関連についての研究

1). 微量 HCV-RNA を nested RT-PCR 法でパラフィンブロックから高感度、特異的に検出する方法を確立した。これにより多数保存されている過去の病理検体からのレトロスペクティブな検索が可能となった。

日本人および外国人肝細胞癌症例における原因ウイルスの判明しえた症例をまとめると以下の如くである。

人種	HBV-DNA	HCV-RNA	HBV+HCV
日本人 (102 名)	21 (20.6%)	64 (62.7%)	6 (5.9%)
韓国人 (55)	35 (63.6%)	3 (5.5%)	2 (3.6%)
米国人 (65)	7 (10.8%)	27 (41.5%)	1 (1.5%)
日系ハワイ人 (8)	4 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
スペイン人 (5)	0 (0%)	3 (60%)	0 (0%)

以上の結果から日本人の肝細胞癌の 77.4% に B もしくは C 型肝炎ウイルスが関与していることが判明したが約 2396 の原因は不明である。

2). また近年発見された G 型肝炎ウイルス (HGV) により肝臓に持続感染が成立すると言われているので HGV の診断系を確立して肝細胞癌の症例を検討した。

対象は肝細胞癌によって手術された症例 36 例の新鮮凍結肝癌組織と 56 例の血清である。

nested RT-PCR 法によって HGV-RNA を増幅した。PCR プライマーは HGV ゲノムの 5'-noncoding 領域から作成した。血清では 5/56 (8.9%) で陽性であったが 4 例は C 型肝炎と重複感染で単独 G 型肝炎感染は 1 例のみであった。肝内の HGV-RNA は癌部、非癌部組織において全例 (36 例) 陰性で血清 HGV 陽性例も陰性であった。他方 HCV-RNA は癌部で 22 例 (61.1%) 非癌部で 28 例 (82.3%) と高率に検出された。

3). チンパンジーの C 型慢性肝炎の経過観察

チンパンジーにおける HCV 一過性感染群と持続感染群との間における抗体応答の差があり

IgG48Vaa 抗体は 3/18 (17%) のみであった。いずれも持続感染成立例のみで一過性感染のものでは検出されなかった。HCV ゲノムの変異は抗体レスポンスを示した 3 例で HVR ゲノムの変異が顕著であった。しかし変異の箇所は個体によって異なった。この陽性率は他の領域に対する陽性率 (67~100%) に対して有意に低い。この HCV 抗体応答の悪さがキャリア移行の大きな要因の一つとなっていることが考えられた。

現在までの経過では C 型慢性肝炎チンパンジーから肝細胞癌は発症していない。

2. HBV DNA 関連蛋白質による遺伝子組み替え促進作用の研究

7 つの 15AB 結合蛋白質を分離したがそのうちの特に結合の強い 3 クローン (A, E, P) について cDNA 全長をクローニングして大腸菌で発現させた。この蛋白質の特異性は以下のように確認された。15AB 中の配列 5'-CCAAG3' を 5'-TGCGC3' に置換した 21AB では E 蛋白質のみの結合性が低下した。また 15AB の 5'-CUUGG-3' を 5' GCGCA-3' に置換した 22AB では 3 つのすべてのクローン全部の結合性が低下した。よってこの 3 クローンの 15AB 結合特異性が確認された。3 クローンのうち P クローンが最も結合性が強かった。

これらクローンはいずれもマウスの正常肝細胞では発現が低く、肝切除後の肝細胞増殖期や肝細胞癌では明らかに増殖していた。またヒトの肝細胞癌でも癌部では非癌部に比較して発現の昂進が認められた。クローン E はマウスの肝細胞癌組織と肝切除後の再生肝組織の両方で発現が昂進していたが、その発現パターン (メインバンドのサイズ) に差が認められた。このことは悪性腫瘍と良性の増殖過程ではことなる発現の制御がなされていることを示すと考えられた。

15AB と最も結合性の強かったクローン P でリコンビネーション活性を調べたが 70Z/3 抽出蛋白質の混合物では 70Z/3 単独よりも 10 倍の活性を示した。ホモロジー検索によりクローン P はラットのアルドラーゼ B 遺伝子の発現制御領域に結合する Y-box binding protein family に属することが明らかになった。

3. 肝細胞癌治療のための動物実験

1. LEC ラット発症肝炎と肝癌に対する OK-432 とグリチルリチの効果

動物は実験開始後徐々に体重を増加していくが 11 週齢頃で黄疸を発症して体重はピークに達して減少する。14 週令ではほぼ全例黄疸を呈しさらに、目、鼻から出血傾向を示し、死亡するラットもではじめる。死亡ラットの大部分は 17 週齢までに半数が死亡し、生き残ったラットはその後体重を増加させ成長し 2 年以上生存し最終的には肝臓の癌で死亡するが一部のラットは肝炎の再発により癌の発症前に死亡することもある。

病的には肝炎で死亡した個体においては実験群と対照群による差は明確でなく、いずれも肝臓の凝固壊死、胆汁うっ滞を認めまた残存肝細胞には異型性が目立ち再生肝細胞と判断された。また肝臓以外の臓器では腎臓の多くの近位尿細管に著しい壊死、変性所見と一部集合管の壊死所見が認められ直接死因としては肝臓の壊死ではなく腎臓の尿細管の壊死によると考えられた。生存動物は約 120 週でほぼ全例肝臓癌のために死亡するが組織的には肝細胞癌と胆管癌が混在しヒトの場合の混合型肝臓癌に相当する。

癌死亡にたいする実験の最終的な結果はまだ出ていないが肝炎による死亡率に対する中間的な結果としては雄の経口投与群のみが肝炎による死亡率を有為差で抑制している。NK activity はそれぞれの組織で投与群で高い傾向があったが有為差はなかった。

肝臓の銅含有量では 10 週齢の実験群では $130 \pm 12 \mu\text{g}$ 、コントロール群では $154 \pm 18 \mu$

g、20 週齢では実験群では $206 \pm 15 \mu\text{g}$ 、コントロール群では $228 \pm 17 \mu\text{g}$ で 10 週齢に比較して明らかに 20 週齢が実験群、コントロール群とも高度であり成長とともに肝臓内の銅の蓄積が増加しつつあることを示したが OK-432 投与群と非投与群を比較すると差がなかった。

グリチルリチン投与の癌死亡に対する最終的な結果もいまだ判明していないが、中間的にはすべての群において生存率に有意な差は存在しない。

低銅飼料を投与した群では普通食に比し、死亡時期に明らかに差がみられ、通常食の動物に比較して 4 週の生存日数の延長が認められた。25 週でのグリチルリチン投与、低銅食群では死亡数は 33%、グリチルリチン投与、普通食では死亡数は 6796 であった。

しかし 1 年以上の生存率には差がなかった。

2). ウッドチャックにおけるウイルス性慢性肝炎と肝癌にたいする OK-432 の効果

97 年 8 月末現在までに残存する実験群は雄 3 匹、雌 5 匹、対照群は雄 3 匹、雌 3 匹であり、実験群で 4 匹対照群で 5 匹減少した。実験群の 1 匹が動脈瘤破裂で死亡した以外はすべて肝細胞癌による死亡である。

各々の血清検査結果の結果の平均と標準偏差を 3 時点のみ示すと以下のとおりであり、トランスアミナーゼの変動は少なく WHVDNA は最終的に軽度上昇している。 γ GTP が実験群で著しく上昇しているが対照群では依然として低値である。

		GPT	GOT	γ GTP	WHsAg	WHVDNA
実験前	実験群	3.7 ± 1.5	66.5 ± 18.0	4.1 ± 2.1	31.0 ± 19.5	4820 ± 5187
	対照群	2.9 ± 1.4	58.9 ± 23.4	3.6 ± 1.7	37.0 ± 15.7	2394 ± 2465
8 カ月後 (96.4.3)	実験群	3.5 ± 1.3	43.1 ± 30.4	3.5 ± 6.9	77.2 ± 7.7	4227 ± 2510
	対照群	3.0 ± 2.3	34.2 ± 34.2	1.3 ± 1.4	48.8 ± 24.9	2141 ± 2225
2 年後 (97.7.21)	実験群	7.3 ± 3.5	84.9 ± 37.7	318.5 ± 549	83.1 ± 3.1	5660 ± 4584
	対照群	5.3 ± 2.2	54.0 ± 42.6	21.3 ± 27	371.6 ± 3.3	5242 ± 2000

V. 考察

肝細胞癌発症における肝炎ウイルスの関与に関しては過去において NBNC 慢性肝炎ウイルスによる肝細胞癌と称されていた肝炎の原因ウイルスの 60%は C 型肝炎ウイルスにより、20%は B 型肝炎ウイルスによると判明したがそれでもなお原因不明の肝細胞癌が 20% 残る。

最近発見された G 型肝炎ウイルス (HGV) が慢性肝炎を介して肝細胞癌を発症させる可能性がでたのでこれも検索したが、血清中で 5 例に証明されたが 4 例は C 型肝炎ウイルスとの合併で単独に G 型肝炎ウイルスが証明されたのは 1 例のみであった。血清中でのこの HGV 陽性率は健常人の陽性率 (05. -1.4%) と比較すると有意に高値である。しかし肝臓組織中では癌部、非癌部ともにすべて陰性で HGV-RNA は証明されなかった。従って HGV により肝細胞癌が発症する可能性は残されているがこのウイルスが癌発症に大きな役割を果たしているかどうかは未だ結論がでないが少なくともおおきな役割ははたしていないようである。

HGV 単独感染で慢性肝炎が成立しその結果肝細胞癌が発症するかどうかはもっと多くの臨床症例の蓄積が必要である。

またこの結果により他の未だ発見されていない肝炎ウイルスが肝細胞癌に発症に関係している可能性もあり我々の確立した C 型肝炎ウイルスの証明系の感度が未だ不十分である可能性も示唆された。

チンパンジー実験により C 型肝炎持続におけるウイルス側の要因として HVR 領域の抗体応答の鈍さに関係していると考えられた。宿主が抗体を作成する前に HCV が変異するためにウイルスを宿主が排除できずキャリア化するため、慢性肝炎が成立している個体ではこの変異の早いウイルスが選択的に残存しているとも考えられ C 型肝炎ウイルスの今後のインターフェロン治療に対する初期の治療の重要性を示唆するものであり、それ以外の非特異的な治療法の開発の重要性を示唆する結果である。

HBV DNA 関連蛋白質の遺伝子組み替え活性に関する研究では 15AB 結合蛋白質を 3 種クローニングしたがいずれも増殖期の肝細胞において発現していることを確認しさらにこのうち最も結合性の強いクローン P はリコンビネーション活性を有することが証明できた。

ホモロジー検索の結果クローン P は RYB-a family にぞくする事が判明したがこのことは RYB-a が *in vitro* の系でリコンビネーションに関与する蛋白であることを示唆している。今後これらの蛋白質が直接癌化をきたすことを *in vitro* および *in vivo* で証明することが必要である。

最終頁の図に我々のヒトウイルス発癌に関する仮説を示す。まず、増殖期の細胞内で DNA 組み替え蛋白の発現が高まり、その蛋白がいつかの DNA 配列を認識することによりその活性が誘発され、染色体の不安定化を誘発し、それが原因となり細胞増殖などの制御に必要な遺伝子の働きを壊して細胞を癌化へと導くというものである。この配列には HBVDNA 上の 15AB が相当するが我々はこれに類似した配列が宿主の DNA にも存在していることを確認しており我々の仮説はウイルス肝細胞癌の発癌のみならず癌一般の発癌機序の説明にも適応できると考えている。

LEC ラット実験においては今回免疫賦活剤として溶血性連鎖球菌製剤である OK-432 を使用したが、これは本来制癌剤として使用されている薬剤である。その機能としては NK cell 活性を高めまたインターフェロンなどのサイトカインを誘導する働きがあり免疫賦活剤としても知られている。

今回の一連の OK-432 の投与実験では雄の経口投与群のみで有意の差を認め、他の実験群では期待された効果が認められなかった。

肝炎ウイルスによる肝炎などであれば免疫賦活剤の効果も期待されるが、何故代謝疾患による劇症肝炎モデルとされる LEC ラットに効果があるのは現在のところ説明できない。おそらく OK-432 に免疫賦活作用以外の効果もあると推定されるがいずれにせよ今後の問題である。

グリチルリチンは臨床的に肝炎に対してすでに使用されており、その効果は確認済みである。OK-432 との比較のために使用したが、有意の差は得られなかった。おそらく銅代謝異常による LEC ラットの劇症肝炎は腎不全をとともなう激烈なものであり、効果がおだやかなグリチルリチンでは効果がでにくかったと考えられる。したがってまだ途中であるが飼料中に銅含有量を少なくした実験系での効果が期待される。

なお LEC ラットは従来肝不全で死亡するとされてきたが、病的には腎不全も大きな役割をはたしていると考えられ、どのようにして腎不全にいたるかも検討されねばならない。ウッドチャックの血液検査項目の結果では肝炎の指標においては特に実験群と対照群とで差はなかったが表面抗原とコア抗体および（表にはしめていない） γ GTP が 2 年後に実験群において上昇してきた。 γ GTP に関しては過去の経験から肝細胞癌の発生で上昇するので肝細胞癌がかなり成長してきたと推定される。対照群よりも実験群のほうが高いので免疫賦活剤によって癌の成長が促進されている可能性がある。また表面抗原とコア抗体の上昇に関しては肝炎の進展が軽度なので説明が難しいがウッドチャックにおいては肝細胞癌中でヒト肝細胞癌と異なりこれらの蛋白質が発現している可能性もあると推定される。

以上

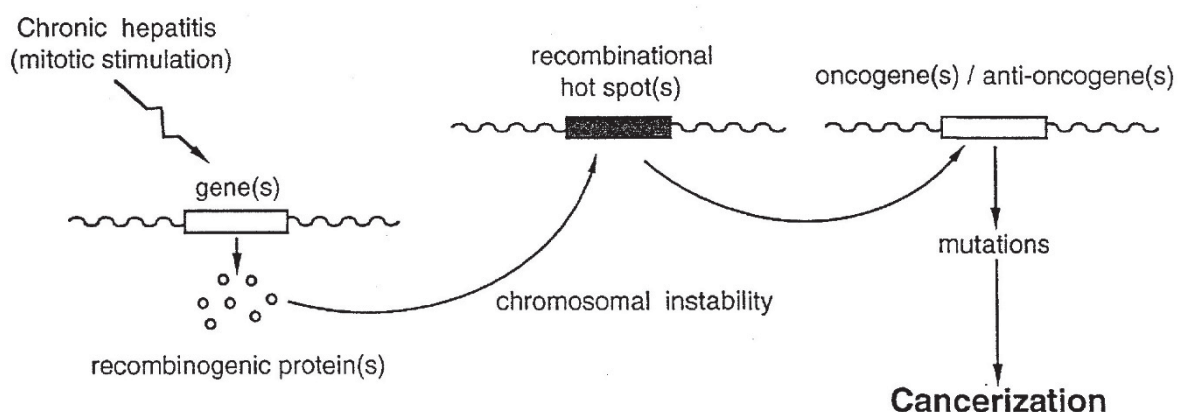


図. 肝発癌過程における遺伝子不安定性の誘発。

発表論文

1. Nakai K., Saitou T., Arakawa Y., Kurata T. and Abe K.: Genetic drift in hypervariable region of viral genome in chimpanzees infected with hepatitis C virus. *International Hepatology Communications* 3: S47, 1995
2. Edamoto Y., Tani M., Kurata T. and Abe K.: Hepatitis C and B virus infections in hepatocellular carcinoma: analysis of direct detection of viral genome in paraffin-embedded tissues. *Cancer* 77: 1787-1791, 1996
3. Young Nyun Park, Kenji Abe, Hongbo Li, Terence Hsuih, Swan N. Thung, David Y. Zhang: Detection of hepatitis C virus RNA using ligation-dependent polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissues. *American Journal of Pathology* 149: 1485-1491, 1996
4. Kenji Abe, Mitsuhiko Moriyama, Shigeki Hayashi, Kazuhiko Nakai, Ikuo Miyauchi, Yoshihiro Edamoto, Tamiko Saito, Sugano Fukushima, Toshihiro Shimizu, Hiroshi Matsumura, Yasuyuki Arakawa: Prevalence of hepatitis G virus infection among

- patients with liver diseases in Japan. *International Hepatology Communications* 6: 239-248, 1997
5. Young Nyun Park, Kazuhiko Nakai, Chanil Park, Kenji Abe: Hepatitis B virus mutants in hepatocellular carcinoma patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. *Hepatology Research* 8: 52-62, 1997
 6. Tamiko Saito, Hideo Naito, Teiichiro Shiino, Yasuyuki Arakawa, Shigeki Hayashi, Kenji Abe: Geographical characterization of hepatitis G virus genome: evidence for HGV genotypes based on phylogenetic analysis. *Journal of Viral Hepatitis* (in press)
 7. Ikuo Miyauchi, David Y. Zhang, Yasuyuki Arakawa, Kenji Abe: Application of ligation-dependent polymerase chain reaction for HCV RNA detection in formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissues. *Clinical Molecular Pathology* (in press)
 8. Kenji Abe, Yoshihiro Edamoto, Young Nyun Park, Abraham M.Y. Nomura, Grant M. Stemmerman, Teresa Casanovas Taltavull, Masayoshi Tani and Swan N. Thung. Geographic study on hepatitis virus type B, C and G-related hepatocellular carcinoma using paraffin-embedded liver tissues. *Hepatology* (in press)
1. 阿部賢治: ウッドチャック肝炎、肝癌の比較病理. 肝臓 36: 333-335, 1995.
 2. 杉谷雅彦 阿部賢治 志方俊夫: チンパンジーを用いた HCV 感染実験. 肝臓 36: 330-333, 1995.
 3. 押本浩一 斎藤修一 蒔田富士雄 松本達彦 小中和子 竹原健 高木均 長嶺竹明 森昌明 福里利夫 阿部賢治: 特発性門脈圧亢進症に合併した肝血管肉腫の 1 例. 日本消化器病学会雑誌 93: 573-577, 1996.
 4. 森山光彦 田中直英 大久保 仁 石塚英男 阿部賢治: G 型肝炎ウイルス (HGV) の遺伝子診断. 日大医学雑誌 56: 128-130, 1997.
 5. 林 茂樹 福島清乃 阿部賢治 正木尚彦 梅田典嗣: 急性 G 型肝炎の臨床像. 日本臨床 55: 613-616, 1997.
1. Kajino, K. Hotta, Y. Hino, O. Determination of putative recombinogenic human hepatitis B virus sequence and its binding cellular protein. *Cancer Res.* 54:3971-3973, 1994.
 2. Hino, O. Kajino, K.: Hepatitis virus-associated hepatocarcinogenesis. *Intervirology* 37: 133-135, 1994.
 3. Kajino, K. Jilbert, AR. Saputelli, J. Aldrich, CE. Cullen, J. Mason, WS. Woodchuck hepatitis virus infection: very rapid recovery after prolonged

- viremia and infection of virtually every hepatocyte. *J. Virol.* 68: 5792-5803, 1994
4. Hino, O. Kobayashi, E. Nishizawa, M. et al.: Renal carcinogenesis in Eker rat. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121: 602-605, 0995
 5. Kajino, k. Aoki, H., Hino, O.: Genomic insatability involved in virus related hepatocarcinogenesis. *Intervirolgy* ; 38: 170-172, 1995
 6. Kajino, k. Aoki, H., Hino, O.: Cellular proteins related to genomic instability in HBV-induced hepatocarcinogenesis. *Int. hepatol. Communications.* 3(suppl.) 160, 1995.
 7. Aoki, H. Kazino, K. Hino, O.: Molecular cloning of a rat chromosome putative recombinogenic sequence homologous to the hepatitis B virus encapsidation signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7300-7304, 1996
 9. Nakai K, et al.: Genetic drift in hypervariable region of viral genome in chimpanzees infected with hepatitis C virus. *Int. hepatol. Communications* 3(suppl): S47, 1995
 10. Hino, O. H. Mitani, H. Kobayashi, H. et.al: Pathophysiological features of hereditary cancers. *Gann Monograph on Cancer Research* 44: 175-187, 1996.
 11. Fazle, SM. Kanjino, K. Tanimot, K. et. al: Placebo-controlled trial of vaccination with hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus taransgenic mice. *J. Hepatology.* 26: 131-137, 1997.
1. 樋野興夫、梶野一徳、青木宏 Genomic instability に関する HBV-DNA 結合蛋白。日本臨床増刊号分子肝炎ウイルス学 94-96, 1995.
 2. 樋野興夫、梶野一徳、青木宏。モレキュラーメデイシン、32: 1180-1183, 1995
 3. 樋野興夫、梶野一徳、B 型肝炎ウイルスと発癌。モレキュラーメデイシン 32:260--264, 1996
1. Takano, Y., Colanzi, R. P., Shiga, J.: High incidence of Epstein-Barr virus associated non-Hodgikins lymphoma in the Bolivian mountains. *Path. Int.* 44: 237-240, 1994
 2. Shiga, J.: Histopathological findings in liver damage of Suncus murinus. *Proceeding of ROC-Japan Symposium on Suncus Murinus.* 63-69, 1994
 3. Niki, T., Oka, T., Shiga, J., Machinami, R.: Kupffer cells in multiple organ failure-Their activation as revealed by immunohistochemistry for lysozyme, α_1 -antichymotrypsin, and lectins *Gen. Diagn Pathol.* 141: 21-27, 1995
 4. Niki, T., Oka, T., Shiga, J., Takahashi, K., Greets, A., Machinami, R.: Increased S-100 protein-immunoreactivity of Kupffer cells is associated with lymphohematological malignancy. *Path. Int* 45:742-747, 1995
 5. Saegusa, M., Takano, Y., Hashimura, M., Okayasu, I. Shiga, J.: HPV type 16 in conjunctival and junctional papilloma, dysplasia, and squamous cell carcinoma.

- J. Clin. Pathol. 48: 1106-1110, 1995
6. Shiga, J., Irie, H., Kataoka, M.: Natural course of long evans cinamone (LEC) rat and effect of OK 432 and glycyrrhizin for fatal hepatitis. Path. Int. 46, supplement 1. 549, 1996.
 7. Matsumoto, R., Nakano, I., Shiga, J. Akaoka, I.: Systemic lupus erythematosus with multiple spongy changes in the cerebral deep structures, midbrain and cerebellar white matter: a case. J. Neurol.Sci. 145: 147-153, 1997
 8. Shimizu-Saito, K., Horikawa, S., Kojima, N., Shiga, J., Tukada, K.: Differential expression of S-adenosylmethioin synthetase isozymes in different cell types of rat liver. Hepatology 26: 424-431, 1997
1. 飯野ゆき子 大蔵真一 志賀淳治 鳥山 稔 工藤宏一郎 エリスロマイシン療法施行症例における副鼻腔粘膜の病理組織学的検討 日耳鼻 97(6) 1070-1078、1994
 2. 三宅和彦 山中正己 志賀淳治 遷延性黄疸を呈し急性E型肝炎と考えられた一症例 帝京医学雑誌 18(1):83-88, 1995
 3. 志賀淳治: 慢性肝炎の分類と組織評価 消化器内視鏡 7(9): 1193-1199、1995
 4. 志賀淳治: 急性肝不全の病理肝胆膵 31(5) 753-758、1995
 5. 志賀淳治: 肝細胞癌内包性過形成結節 肝胆道系症候群、別冊日本臨床 No.7 371-373、1995
 6. 志賀淳治: 肝肉芽腫 肝胆道系症候群、別冊日本臨床 No.7 420-422, 1995
 7. 志賀淳治: 肝類上皮血管内皮腫. 肝胆道系症候群, 別冊 日本臨床 7: 438-440, 1995
 8. 志賀淳治: 慢性肝炎の分類と組織評価 消化器内視鏡 7(9). 1193-1199, 1996
 9. 志賀淳治: 肝硬変の組織分類 消化器内視鏡 8(3) 285-291, 1996
 10. 中野今治、新井信隆、小田雅也、水谷俊雄、志賀淳治 錐体路の病理 Brain Medical 8(4) :403-411, 1996

国際学会発表(1995-1997)

1. Yoshihiro Edamoto, Masayoshi Tani, Kenji Abe, Takeshi Kurata, Saburo Kawai, Shigeki Hayashi: Hepatitis C and B virus infection in hepatocellular carcinoma analysis by direct detection of HCV-RNA and HBV-DNA in paraffin-embedded specimens-. The 4th International Symposium on Treatment of Liver Cancer. February 1995, Singapore.
2. YN ParK, K Abe, H Li, T Hsuih, SN Thung, DY Zhang: Detection of HCV-RNA using ligation-dependent polymerase chain reaction (LD-PCR) in formalin-fixed paraffinembedded tissue. Nucleic Acids: A decade of discovery. The San Diego Conference, November 1995, California, U.S.A.
3. Kenji Abe, Yoshihiro Edamoto, Takeshi Kurata, Masayoshi Tani, Young N. Park,

- Chanil Park, Teresa C. Taltavull, Swan N. Thung: Geographic study of hepatitis virus type B, C and G-related HCCs using paraffin-embedded tissues. 47th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1996, Chicago, U.S.A.
4. Kazuhiko Nakai, Yasuyuki Arakawa, Takeshi Kurata, Kenji Abe: Immune response and genetic drift in the hypervariable region of viral genome in chimpanzees infected with HCV. 47th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1996, Chicago, U.S.A.
 5. Young N. Park, Kazuhiko Nakai, Takeshi Kurata, Chanil Park, Kenji Abe: Hepatitis B virus mutants in both HBsAg and anti-HBs positive hepatocellular carcinoma patients. 47th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1996, Chicago, U.S.A.
 6. Sugano Fukushima, Shigeki Hayashi, Kenji Abe, Naohiko Masaki, Noritsugu Umeda: Clinical features of acute hepatitis G. 47th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1996, Chicago, U.S.A.
 7. Kenji Abe, Kazuhiko Nakai, Ikuo Miyauchi, Yasuyuki Arakawa, Takeshi Kurata: Highly sensitive PCR assay for hepatitis G virus. 47th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1996, Chicago, U.S.A.
 8. Kenji Abe, Koichi Ishikawa, Kazuhiko Nakai, Ikuo Miyauchi, Takeshi Kurata, M Osei-Kwasi, NK Ayisi, Jim Brandful, Francis K. Nkrumah, Shudo Yamazaki: High prevalence of HGV infection among Ghanaian patients infected with HIV. 47th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1996, Chicago, U.S.A.
 9. Mitsuhiko Moriyama, Ikuo Miyauchi, Kazuhiko Nakai, Toshihiko Shimizu, Yasuyuki Arakawa, Kenji Abe: HGV infection in Japanese patients with various forms of liver diseases. 47th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1996, Chicago, U.S.A.
 10. Takashi Segawa, Mitsuhiko Moriyama, Yasuyuki Arakawa, Kenji Abe: Effect of interferon treatment in HGV and HCV coinfecting patients with chronic active hepatitis. 47th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1996, Chicago, U.S.A.

11. KH Han, W Choi, SP Hong, YN Park, ES Park, YW Hwang, WS Ryu, CY Chon, YM Moon, CI Park, K Abe: Prevalence of hepatitis G virus in Korean patients with various liver diseases and blood donors. 4th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, March 1997, Kyoto, Japan
12. M Moriyama, I Miyauchi, K Nakai, T Shimizu, Matsumura, T Segawa, N Tanaka, H Okubo, Y Arakawa, K Abe: HGV infection in Japanese patients with various forms of liver diseases. 4th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, March 1997, Kyoto, Japan
13. T Segawa, M Moriyama, I Miyauchi, H Matsumura, T Shimizu, K Kanda, N Shibahara, N Tanaka, H Okubo, H Ishizuka, Y Arakawa, K Abe: Effect of interferon treatment in HGV and HCV coinfecting patients with chronic active hepatitis. 4th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, March 1997, Kyoto, Japan
14. TD Schiano, MI Fiel, K Abe, Y Edamoto, DY Zhang, SN Thung, HC Bodenheimer: Absence of hepatitis G virus within liver tissue of patients undergoing liver transplantation for cryptogenic cirrhosis. 16th Annual Meeting of the American Society of Transplant Physicians, May 1997, Chicago, U.S.A
15. K Abe, T Saito, T Shiino, S Hayashi, Y Arakawa, KH Han, M Osei-Kwasi, FK Nkrumah, A EI-Zayadi: Geographical characterization of HGV and evidence of genotypes within 5'-UTR. 48th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1997, Chicago, U.S.A.
16. N Masaki, S Hayashi, PK Shrestha, K Abe, R Shoda, N Umeda: Prevalence of HBV, HCV, HGV and HIV in blood donors and patients with chronic liver diseases in Nepal. 48th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1997, Chicago, U.S.A.
17. S Hayashi, N Masaki, S Yamashina, K Abe, H Naito, A Niihata, N Isoo, H Ohhara, K Sekigawa, J Akiyama, S Fukushima, M Matsukawa, S Yamato, R Shoda, T Muraoka, K Matsueda, E Shimojo, N Umeda: Spontaneous disappearance of HCV viremia in three cirrhotics. 48th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1997, Chicago, U.S.A.
18. A El-Zayadi, K Abe, O Selim, AAH Hamdy: Prevalence of HGV infection among Egyptians. 48th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1997, Chicago, U.S.A.