

学 位 論 文 題 名

Serum levels of the type IV collagen 7s domain in patients with chronic viral liver diseases-A possible risk factor of hepatocellular carcinoma

(慢性ウイルス性肝疾患患者における肝細胞癌発生予知因子としての血中4型コラーゲン・7sドメイン濃度測定の意義)

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

本邦における肝細胞癌の多くは、慢性ウイルス性障害肝を母地に発生しているが、いまだに発癌を抑制する有効な手段は確立されておらず、早期発見とそれに続く外科的切除などの治療度の高い治療が行われている。

慢性ウイルス性肝障害患者は、肝細胞癌発生の高危険群として、定期的に腹部超音波およびCT検査さらには各種腫瘍マーカーの測定により経過を観察されている。しかし、これらの経過観察手段を用いてもなお、進行した状態で発見される肝細胞癌患者が少なくない。したがって従来の方法とは異なった発生予測因子の導入が早期病変の発見率向上のために必要である。

慢性障害肝の組織学的特徴の一つとして、コラーゲンをはじめとする種々の細胞外マトリックスの増加が上げられる。近年、これらの分解および副産物の血中濃度を測定することで、非観血的に肝の線維化の程度を捉えようとする試みがなされてきた。これらの結果から4型コラーゲンの分解産物である4型コラーゲン7sドメイン(7sコラーゲン)の血中濃度がもっともよく肝の線維化を反映するとされている。

本研究では、原因ウイルス別に担癌および非担癌慢性肝障害患者の7sコラーゲンを測定し、その肝細胞癌発生予測因子としての可能性について検討した。

II. 研 究

1. 対象 肝細胞癌切除患者80例と非担癌慢性ウイルス性肝障害患者105例を対象とした。肝細胞癌例では切除材料の非腫瘍部の病理組織学的検索から、非担癌例では肝生検組織の検索から各々正常肝(NL)、慢性非活動性肝炎(CPH)、慢性活動性肝炎(CAH)、肝線維症(LF)および肝硬変症(LC)の5群に分類した。各群の症例数は肝細胞癌例でNL6、CPH9、CAH17、LF8、LC40、非担癌例ではCPH16、CAH53、LC36であった。またHBs抗原(HB)、HCV抗体(HC)の測定結果からB型(HB+, HC-), C型(HB-, HC+) および非B非C型(HB-, HC-)の3群に分類した。肝細胞癌例ではB型26、C型39、非B非C型15、非担癌例ではB型58、C型47であった。ウイルスマーカーの測定には各々測定時最新のEIAキットを使用した。

2. 血中および組織中7sコラーゲン濃度の測定  $^{125}$ Iでラベルしたヒト胎盤組織由来7sコラーゲンをトレーサーとし、これに対するウサギポリクローナル抗体を一次抗体としたRIA

法により、血中7 s コラーゲン濃度を測定した。肝細胞癌患者では腫瘍部および非腫瘍部組織内濃度を併せて測定した。組織内濃度の測定には、10倍量の生理的食塩水添加下に各組織をホモジナイズし、これに対する遠沈操作(3000回転, 10分間)後に得られた上清を用い、血清と同様の方法で測定した。

3. 統計学的処理 各測定値は平均値±標準偏差で表し、2群間および多群間の有意差検定は各々Mann-Whitney's U testおよび一次配置分散分析によった。また、相関係数の検定にはSpearman's test, 群間の偏りの検定にはカイ2乗検定を用いた。

### III. 結 果

1. 血中と組織内7 s コラーゲン濃度の相関 血中7 s コラーゲン濃度(ng/ml)は非腫瘍部肝組織中の7 s コラーゲン濃度(ng/g·tissue)と有意に相関した( $r=0.58$ ,  $p<0.05$ )。一方、腫瘍組織内濃度との相関は認められなかった。

2. 非腫瘍部肝組織像と血中7 s コラーゲン濃度 血中7 s コラーゲン濃度はNL( $5.0\pm0.9$  ng/ml), CPH( $6.8\pm1.2$ ), CAH( $7.1\pm2.2$ ), LF( $6.7\pm1.8$ ), LC( $8.9\pm2.6$ )と非腫瘍部の障害度が進展するに従い増加した。LC例の測定値は他の全てに比較して有意に高値を示した( $p<0.05$ )。

3. 肝細胞癌例の原因ウイルスと血中7 s コラーゲン濃度 非B非C型 $5.9\pm1.4$  ng/ml, B型 $7.3\pm1.7$ , C型 $8.7\pm2.9$ であり、各群間に有意差を認めた( $p<0.05$ )。

4. 肝細胞癌例と非担癌例の血中7 s コラーゲン濃度 B型では肝細胞癌例、非担癌例の順にCPH $6.3\pm0.9$  ng/ml ( $n=3$ ),  $5.3\pm1.5$  ( $n=7$ ), CAH $6.1\pm0.2$  ( $n=3$ ),  $6.1\pm1.9$  (34), LC $7.9\pm1.8$  ( $n=17$ ),  $8.5\pm3.1$  ( $n=17$ )であった。C型では同様の順にCPH $7.3\pm1.2$  ng/ml ( $n=5$ ),  $5.6\pm2.0$  ( $n=9$ ), CAH $7.4\pm2.5$  ( $n=12$ ),  $5.2\pm0.9$  ( $n=19$ ), LC $9.7\pm3.0$  ( $n=21$ ),  $8.0\pm3.1$  ( $n=19$ )であった。B型ではいずれも2群間に有意差を認めなかったのに対し、C型では肝細胞癌例の血中7 s コラーゲン濃度は、非担癌例のそれに比べて全ての組織像で有意に高い値を示した(CPHおよびCAH例: $p<0.05$ , LC例: $p<0.01$ )。

5. 血中7 s コラーゲン濃度による肝細胞癌発生予測 C型肝炎細胞癌39例とC型非担癌47例の検討では、肝細胞癌発生の血中7 s コラーゲン濃度のカットオフ値は $7.0$  ng/mlと推定された。本カットオフ値の敏感度は $71.8\%$ , 特異度は $74.5\%$ , positive predictive valueは $70.0\%$ , negative predictive valueは $76.1\%$ であり、もっとも高い信頼度( $77.9\%$ )を示した。なお肝細胞癌例と非担癌例の各肝組織像による症例の分布に統計学的な差を認めなかった。

### IV. 考 察

肝炎ウイルスの発癌機序についていまだ十分な解明はないが、疫学的調査やウイルス中の癌遺伝子の研究などからB型とC型肝炎ウイルスの発癌機序には大きな相違があることが推測される。

本研究の結果から血中7 s コラーゲン濃度は担癌状態でも非腫瘍部の線維化の程度をよく反映しており、さらに肝障害の進展がC型肝炎患者の発癌に大きく関与していることが推測された。

癌の浸潤、転移にコラーゲン分解酵素が重要な役割をはたしているとされている。この場合、腫瘍細胞が産生するコラーゲン分解酵素が周囲のコラーゲンを分解し、その結果として血中7 s コラーゲン濃度が増加することも考えられる。しかし、通常肝癌組織では癌細胞の浸潤を示す因子に原因ウイルスによる差異は認められていない。したがってC型でのみ認められた担癌、非担癌症例間の血中7 s コラーゲン濃度の差は、より進展した非腫瘍部の肝障害を示すものと考えられた。

これらの事実からC型肝炎患者における血中7 s コラーゲン濃度の肝細胞癌発生危険因子と

しての可能性が示唆された。本研究のC型非担癌症例は一定期間、同一の医師により測定されたものであり、C型慢性肝炎患者の現状を反映するものと考えられた。これらと非腫瘍部の組織像の分布に差のないC型担癌患者を比較した結果から、血中7 s コラーゲン濃度が7.0ng/mlを越えた場合に肝細胞癌併存の危険性が高くなり、血中7 s コラーゲン濃度にもとずく経過観察方法の変更の必要性が推測された。また、本研究のC型担癌患者は全例切除が可能であった症例であり、患者の予後の点からも、このカットオフ値は意味のあるものと考えられた。

## V. 結 語

1. 血中7 s コラーゲン濃度は担癌患者でも非腫瘍部の肝障害の程度を反映した。
2. B型肝炎患者では発癌における肝障害の進展の関与はC型患者よりも少ないと推測され、肝障害の程度による癌発生予測は困難であった。
3. C型肝炎患者では発癌機序に肝障害の進展が大きく関与していることが推測され、血中7 s コラーゲン濃度が7.0ng/mlを越えた場合、肝細胞癌発生の頻度が高いことが判明した。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎  
副 査 教 授 西 信 三  
副 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 内 野 純 一

### 学 位 論 文 題 名

Serum levels of the type IV collagen 7s domain in  
patients with chronic viral liver diseases-A possible  
risk factor of hepatocellular carcinoma

(慢性ウイルス性肝疾患患者における肝細胞癌発生予知因子  
としての血中IV型コラーゲン・7sドメイン濃度測定の意義)

本邦における肝細胞癌の約90%は慢性ウイルス性障害肝を母地に発生しているが、いまだに発癌を抑制する有効な手段は確立されておらず、早期発見とそれに続く外科的切除をはじめとした治療が肝要である。慢性ウイルス性肝炎患者は肝細胞癌発生の高危険群として、定期的に各種画像診断および腫瘍マーカーの測定により経過を観察されている。しかし、これらの経過観察手段を用いてもなお、進行した状態で発見される癌患者が少なくない。したがって従来の観点とは異なった経過観察手段の導入が早期病変の発見率向上のために必要であると考えられる。今回、申請者は肝生検よりも簡便で非観血的に測定可能な肝線維化指標である血中IV型コラーゲン7sドメイン濃度(7sC)を担癌および非担癌慢性肝障害患者において原因ウイルス別に測定し、この濃度と肝細胞癌の合併頻度との関連から血中7sC測定の肝細胞癌合併高危険群の推測における有用性について検討した。

対象および方法:肝細胞癌切除例80例と非担癌慢性ウイルス性肝障害例105例を対象とした。担癌例では切除材料の非腫瘍部の病理組織学的検索から、また非担癌例では肝生検組織の検索から各々正常肝(NL)、慢性非活動性肝炎(CPH)、慢性活動性肝炎(CAH)、肝線維症(LF)および肝硬変症(LC)の5群に分類した。また、HBs抗原(HB)およびHCV抗体(HC)の測定結果からB型(HB+, HC-), C型(HB-, HC+)およびNBNC型(HB-, HC-)の3群に分類した。血中7sCの測定は<sup>125</sup>Iでラベルされたヒト胎盤組織由来7sCをトレーサーとしたRIA2抗体法により測定した。担癌例では腫瘍部および非腫瘍部組織内の7sCを併せて測定した。組織内濃度の測定には10倍量の生理食塩水添加下に各組織をホモジナイズし、これに対する遠沈操作(3000回転, 10分間)後に得られた上清を用いて血清と同様の方法で測定した。

結果:担癌例における血中7sC(mean  $\pm$  S.D. ng/ml)はNL( $5.0 \pm 0.9$ , n=6), CPH( $6.8 \pm 1.2$ , n=9), CAH( $7.1 \pm 2.2$ , n=17), LF( $6.7 \pm 1.8$ , n=8), LC( $8.9 \pm 2.6$ , n=40)であり, LC例では他の全てに比べ

有意に高値を示した( $p<0.05$ )。さらに、肝癌例における血中7sCは非腫瘍部肝組織中の7sC濃度( $\text{ng/g}\cdot\text{tissue}$ )と有意に相関( $r=0.58, p<0.05$ )したが、腫瘍組織中の濃度とは相関せず、肝癌例においても血中7sCは非腫瘍部の肝障害度を反映すると考えられた。肝癌例の原因ウイルスによる血中7sCはNBNC型( $5.9\pm 1.4, n=15$ )、B型( $7.3\pm 1.7, n=26$ )、C型( $8.7\pm 2.9, n=39$ )の順に有意に高値を示した( $p<0.05$ )。肝癌、非肝癌例の血中7sCはB型のCPHで各々 $6.3\pm 0.9(n=3)$ と $5.3\pm 1.5(n=7)$ 、CAHで $6.1\pm 0.2(n=3)$ と $6.1\pm 1.9(n=34)$ 、LCで $7.9\pm 1.8(n=17)$ と $8.5\pm 3.1(n=17)$ であり、二者間に差を認めなかった。C型では肝癌、非肝癌の順にCPHで $7.3\pm 1.2\text{ng/ml}(n=5)$ と $5.6\pm 2.0(n=9)$ 、CAHで $7.4\pm 2.5(n=12)$ と $5.2\pm 0.9(n=19)$ 、LCで $9.7\pm 3.0(n=21)$ と $8.0\pm 3.1(n=19)$ であり、肝癌例の血中7sCは非肝癌例に比べ有意に高値を示した。癌の浸潤を表す病理組織学的因子はB、C型間で差がなく、前述のC型肝癌例での血中7sCの上昇は、より進展した肝障害を反映するものと考えられた。C型肝癌39例とC型非肝癌47例の検討から肝細胞癌合併に対して最も高い信頼度(77.9%)を示した血中7sCのカットオフ値は $7.0\text{ng/ml}$ であった。本カットオフ値の敏感度は71.8%、特異度は74.5%、positive predictive valueは70.0%、negative predictive valueは76.1%であった。一方、B型では有意なカットオフ値は認められなかった。

以上より、B型肝炎患者の血中7sCは肝細胞癌合併高危険群の推測因子となりえないが、C型肝炎患者では有用な推測因子となりうる可能性が示唆された。すなわち血中7sCが $7.0\text{ng/ml}$ を越えたC型肝炎患者では、より綿密な経過観察が必要であると考えられた。

審査に当たって、第3内科吉田先生より原因ウイルスによる癌病巣の違い、コラーゲン代謝と発癌の関連について、第1生化学西教授、第3内科浅香教授より7sCと組織線維量との関係、7sCの健常時および腫瘍摘除後の変動、腫瘍細胞培養系での変化などについて、癌研病理細川教授より予知因子としての意味、7sCと血小板数との比較、第2病理長嶋教授よりアルコール性肝炎での変動についての質疑があったが、申請者はおおむね妥当な回答を行った。

肝生検よりも安全かつ非観血的に測定可能な血中肝線維化マーカーによる肝細胞癌合併高危険群の推測に関する報告はなく、肝細胞癌の早期発見率の向上につながる可能性を示した点で意義があり、博士(医学)の授与に値するものとする。