

学位論文題名

多包性肝エキノコックス症の血清診断と臨床的意義

—ELISA 法と Western-Blotting 法

学位論文内容の要旨

I. 目 的

多包性肝エキノコックス症は、悪性腫瘍に類似した性格を有する疾患である。したがって早期診断と病巣の外科的完全切除が重要であり、また術後のフォローアップも慎重に行なう必要がある。種々の診断法のうち、血清学的検査は本症に特異的なものであり、その有用性が期待される。そこで、これまで主にエキノコックス検診で集積してきた血清検査の結果から免疫酵素抗体法(以下ELISA)とWestern-blotting法(以下WB)による血清診断の評価を行ない、さらに手術患者の術後の血清値の変動を追跡して、術後血清診断の意義について検討した。

II. 対象と方法

1. 対象 1986年から1994年の間に、705,397人にELISAによるスクリーニングを行なった。ELISAが陽性であった1,636人(0.23%)のうち1,364人と、繰り越しの受診者720人の計2,084人に対して検診を行った。このうち多包性肝エキノコックス症と確診されたものは42人(2%)であり、腹部超音波検査で本症を否定されたものは1,244人であった。この1,244人を非感染者(以下非感染群)とし、検診外に診断された患者を含めた81人と血清値の変動を比較検討した。

2. 血清検査の方法 ELISA法は佐野らが報告した方法により、cotton rat腹腔内に継代中の多包虫シストから作成した粗抗原を用いてマイクロELISA間接法により測定した。判定はELISA値0.5以上を陽性とした。WB法は古屋らが報告した方法により行った。多バンド形成型で55, 66kdの位置に必ずバンドを含む完全型を陽性とし、染色の微弱なもの、30-35kdの低分子域に2本のバンドを形成するもの、97kdの高分子域に数本のバンドを形成するものを不完全型として疑陽性と判定した。

3. 臨床病期分類 病期は教室の基準に準じ、周囲臓器への浸潤や遠隔転移巣を認めない場合で腫瘍占拠肝区域が1区域、2区域、3区域のものをそれぞれStage I、II、IIIaとし、浸潤や転移を認めても完全切除可能と考えられる場合をStage IIIb、4区域(全肝病巣)におよび切除不能なものをStage IVとした。

4. 手術治癒度 手術で完全に病巣を切除し得たものを完全切除群、肝切除を行ったが病巣が僅かに遺残したものを不完全切除群、切除不能例などで明らかに病巣が残存したものを姑息的処置群として3群に分類した。

5. 統計学的方法 2群間の検定にはStudent's t-testを、多群間の比較には分散分析法(Scheffe法)を用いた。正規性、等分散性が証明されない場合はMann-Whitney U testやKruskal-Wallis testを用いた。

Ⅲ. 結 果

1. 患者群と非感染群のELISA値の比較 患者群77例のELISA値（以後E値）は 0.72 ± 0.18 であり、非感染群の 0.59 ± 0.09 に比べ有意に高値であった($P < 0.01$)。またスクリーニングと検診時のE値を比較すると、非感染群では有意に低下したが患者群では軽度上昇した。
2. 非感染群の血清検査成績 非感染群1,244例のうち、検診でELISAが陽性であったのは38%であった。陽性例のE値は 0.65 ± 0.12 であり、陰性例の 0.30 ± 0.11 に比し有意に高かった($P < 0.01$)。WBを行った845例では、WB陽性が9%、疑陽性が11%であった。WB陰性群のELISA陽性率は22%と低率であったが、疑陽性群、陽性群ではそれぞれ52%、68%と高率であり、またWB陽性群、疑陽性群のE値は、陰性群に比較し有意に高値を示した($P < 0.01$)。WBの結果により経過中WBがすべて陰性であった群、陰性もしくは疑陽性の群、1度だけ陽性を示した群、2回以上繰り返して陽性反応を示した群の4群に分類してE値の推移を比較した結果、2回以上WBが陽性を示した群のE値は0.5以上で遷延した。
3. 患者の血清検査成績 多包虫症患者77例のうち、ELISA陽性例は67例(87%)であった。WBを測定した54例ではWB陽性例が48例(88%)、疑陽性例が4例(8%)であった。両法の併用により、患者の98%はELISAかWBのいずれかが異常を示した。
4. 臨床病期、手術治癒度と術前E値 StageⅣの術前E値は、StageⅠ、Ⅱに比し有意に高かった。また、不完全切除群、姑息的処置群では完全切除群に比し有意に高値であった。
5. 血清反応の術後推移 姑息的処置群のE値は術後も高値で持続したが、完全切除群では術後1.5年で 0.47 ± 0.03 (mean $\pm$ SE)まで低下した。完全切除群18例のうち血清値が低下したものは14例あり、ELISAで術後3年(1.50 ± 0.78 年)、WBで術後4.5年(2.4 ± 1.3 年)以内に全例陰性化した。その後再上昇したものもあったが、最終的にELISAで 2.8 ± 2.2 年、WBで 3.8 ± 2.7 年までに陰性化した。不完全切除群11例のうち5例はELISA、WBともに異常反応が持続したが、浸潤の軽度であった3例と断端陽性の3例では血清反応は陰性化した。姑息的処置群10例のE値は高値で遷延し、WBも異常反応が持続した。術前E値が陰性であった症例は9例（全例完全切除群）あり、9例中6例は術後もELISAは陰性のままであったが、WBが判明していた症例は全例術前WBは疑陽性以上であり、術後は陰性化した。ELISAが術後陽性化したものは3例あり、このうち2例はリンパ節転移陽性例であった。

Ⅳ. 考 察

粗抗原を用いたELISAは、疑陽性率は高くなるが患者陽性率の点では有用とされる。著者は、WBの併用により検診で約80%の疑陽性者を除外できた。また、WBが繰り返して陽性となった群のE値が高値で遷延したことは、互いの抗原が多包虫に起因した同一の原因によるものであった可能性を示唆するものであり、病巣が微小なうちに自然治癒した多包虫感染者が含まれていたことが考えられた。一方、多包虫症患者の患者血清陽性率は、ELISAで87%、WBで89%（疑陽性を含めると96%）であった。ELISAとWBを併用した場合の陽性率は94%（WB疑陽性を含めると98%）になり、精製抗原を用いたELISA（Em2-ELISAで91~93%、Em2^{plus}ELISAで97%）と比較しても高い陽性率であった。又、術前E値が高い症例は病期が進行している症例が多く注意が必要であった。術後の血清反応の変動をみると、姑息的処置群の血清値は全例高値で遷延したが、完全切除例の約75%は術後2年から3年で漸次低下した。約25%は両法で陽性反応が持続し微小病変の遺残が疑われたが、再発が認められず、感染の極く初期に自然治癒した不顕性の微小病巣が術前から存在していた可能性が考えられた。また、リンパ節転移陽性例の血清値は全例高値で遷延しており、転移巣についても同様にほとんどのものが不顕性のうちに自然治癒した可能性があった。不完全切除例でも、再発がなく臨床的に治癒したと考えられるものが多く、腫瘍辺縁部が僅かに遺残しても治癒する可能性のあることが示唆された。

V. 結 語

1. ELISA法とWB法を併用したエキノコックス症の血清診断は、陽性率が高く偽陰性率の低い優れた検査法であり、E値が高い症例は病期の進行したものが多かった。
2. 完全切除術後2ないし3年で血清反応は陰性化するが、血清値が異常値で遷延する場合には病巣の遺残と自然治癒を考慮しなければならない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一
副 査 教 授 皆 川 知 紀
副 査 教 授 宮 坂 和 男

学 位 論 文 題 名

多包性肝エキノコックス症の血清診断と臨床的意義

—ELISA 法と Western-Blotting 法

多包性肝エキノコックス症は、悪性腫瘍に類似した性格を有する疾患であり、早期診断と病巣の外科的完全切除が重要である。また術後の経過観察も慎重に行なう必要がある。血清学的診断は本症に特異的なものであり、その有用性が期待されるが、尚多数例の詳細な検討はない。そこで申請者は、これまでエキノコックス検診で集積してきた血清検査の結果から免疫酵素抗体法（以下ELISA）とWestern-blotting法（以下WB）による血清診断の評価を行ない、さらに手術患者の術後の血清値の変動を追跡して、術後血清診断の意義について検討した。

1986年から1994年の間に、705,397人にELISAによるスクリーニングを行ない、ELISAが陽性であった1,636人（0.23%）のうちの1,364人と、繰り越しの受診者720人の計2,084人に対して2次検診を行った。このうち多包性肝エキノコックス症と確診されたものは42人（2%）であり、腹部超音波検査で本症を否定されたものは1,244人であった。この1,244人を非患者（以下非患者群）とし、検診外に診断された39人を含めた患者81人（以下患者群）と血清値の変動を比較検討した。ELISA値（以下E値）は、cotton rat腹腔内に継代中の多包虫シストから作成した粗抗原を用いマイクロELISA間接法により測定した。判定はE値0.5以上を陽性とした。WBは古屋らが報告した方法により行った。多バンド形成型で55, 66kdの位置に必ずバンドを含む完全型を陽性とし、染色の微弱なもの、30-35kdの低分子域に2本のバンドを形成するもの、97kdの高分子域に数本のバンドを形成するものを不完全型として疑陽性と判定した。

臨床病期分類は教室の基準に準じ、周囲臓器への浸潤や遠隔転移巣を認めない場合で腫瘍占拠肝区域が1区域、2区域、3区域のものをそれぞれStage I、II、III aとし、浸潤や転移を認めても完全切除可能と考えられる場合をStage III b、4区域（全肝病巣）におよび切除不能なものをStage IVとした。手術治療度は、手術で完全に病巣を切除し得た完全切除群、肝切除を行ったが病巣が僅かに遺残した不完全切除群、切除不能例などで明らかに病巣が残存した姑息的処置群の3群に分類して検討した。

その結果、患者群77例のE値は 0.72 ± 0.18 であり、非患者群の 0.59 ± 0.09 に比べ有意に高値であった。また1次と2次スクリーニング時のE値を比較すると、非患者群

では有意に低下したが患者群では軽度上昇した。非患者群1,244例のうち、初回2次検診でELISAが陽性であったのは38%であった。陽性例のE値は 0.65 ± 0.12 であり、陰性例の 0.30 ± 0.11 に比し有意に高かった。WBを同時に行った845例では、WB陽性が9%、疑陽性が11%であった。WB陰性群のELISA陽性率は22%と低率であったが、疑陽性群、陽性群ではそれぞれ52%、68%と高率であり、またWB陽性群、疑陽性群のE値は、陰性群に比較し有意に高値を示した。WBの結果により経過中WBがすべて陰性であった群、陰性もしくは疑陽性の群、1度だけ陽性を示した群、2回以上繰り返して陽性反応を示した群の4群に分類してE値の推移を比較した結果、2回以上WBが陽性を示した群のE値は0.5以上で遷延した。多包虫症患者77例のうち、ELISA陽性例は67例(87%)であった。WBを測定した54例ではWB陽性例が48例(88%)、疑陽性例が4例(8%)であった。両法の併用により、患者の98%はELISAかWBのいずれかで異常を示した。臨床病期、手術治療度別に術前E値を比較検討すると、Stage IVの術前E値は、Stage I、IIに比し有意に高い値を示し、不完全切除群、姑息的処置群では完全切除群に比し有意に高値であった。

血清反応の術後推移は、完全切除群18例のうち血清値が低下したものは14例あり、E値で術後3年(1.50 ± 0.78 年)、WBで術後4.5年(2.4 ± 1.3 年)以内に全例陰性化した。その後再上昇したものもあったが、最終的にE値は 2.8 ± 2.2 年、WBは 3.8 ± 2.7 年までに陰性化した。不完全切除群11例のうち5例はELISA、WBともに陽性反応が持続したが、浸潤の軽度であった3例と断端陽性の3例では血清反応は陰性化した。姑息的処置群10例のE値は高値で遷延し、WBも異常反応が持続した。術前E値が陰性であった症例は9例(全例完全切除群)あり、9例中6例は術後もELISAは陰性のままであったが、WBが判明していた症例は全例術前WBは疑陽性以上であり、術後は陰性化した。E値が術後陽性化したものは3例あったが、このうち2例はリンパ節転移陽性例であった。

以上の結果より、ELISA法とWB法を併用した多包性肝エキノコックス症の血清診断は、患者血清陽性率が高く偽陰性者の少ない優れた診断法であることが判明した。また、術前E値が高い症例は病期の進行したものが多く、術前薬物療法などの必要性が示唆された。さらに手術により完全に病巣が切除されると2ないし3年で血清反応は陰性化するが、血清反応が陽性で遷延する場合には病巣の遺残の他、自然治癒病巣の存在も考慮しなければならない。また、リンパ節転移陽性例では血清反応が長期化する傾向にありその評価には注意を要することなどが発表された。

審査にあたり、皆川教授から生化学検査との関連、病巣の完全切除の判断などについて質問があり、IgGサブクラスや細胞性免疫検査などの検討が必要であること、手術所見による完全切除の判断には限界があり血清学的検査による治療判定が期待されることなどが解答された。宮坂教授から術後の血清値の変動と非患者群の血清反応の長期推移について質問があり、抗原の局在は判明しつつあるが免疫反応は複雑で未解明な点が多いこと、術後E値は境界値付近である程度変動する可能性があること、検診除外例は1~2年しか追跡できないことが解答された。藤岡助教授から血清検査の地域性、自然治癒例の判定法についての質問があり、これに対し地域性の報告はあるが今回の検討では地域による考察はなかったこと、自然治癒病巣の画像診断とラット腹腔内への病巣接種による治癒病巣判定法などが解答された。石渡助手から交差反応とWB疑陽性の評価について質問があり、単包虫症以外に交差反応を認めていないこと、WB疑陽性以上を陽性と判断する妥当性について述べられた。

ELISA法とWB法の併用による本症の血清診断の有用性と、術後の経過観察の指標

としての可能性を明らかにした点で意義があり、審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。