

localize the site of bleeding.² Tc-99m DTPA is used for renal scintigraphy, but can sometimes detect active bleeding from the gastrointestinal tract.^{3,4} The major disadvantage of this radionuclide is its rapid clearance from the vascular pool, making it less useful for detection of intermittent and slowly bleeding sites.⁴ Renal uptake makes it difficult to detect bleeding from structures in the upper part of the abdomen.⁴ In our case, renal scintigraphy with Tc-99m DTPA allowed diagnosis of a gastric ulcer because of active bleeding.

Kenji Torii, Joji Kawabe, Takehiro Hayashi,
Ai Oe, Jin Kotani, Etsushi Kawamura,
Susumu Shiomi, Shuhei Nishiguchi*

Departments of Nuclear Medicine, and *Hepatology,
Graduate School of Medicine, Osaka City University,
Osaka, Japan

References

1. Suzuki C, Higaki S, Nishiaki M, Mitani N, Yanai H, Yada M, *et al.* Tc-99m HAS-D scintigraphy in the diagnosis of protein-losing gastroenteropathy due to secondary amyloidosis. *J Gastroenterol* 1997;32:78-82.
2. Smith RK, Arterburn G. Detection and localization of gastrointestinal bleeding using Tc-99m pyrophosphate in vitro labeled red blood cells. *Clin Nucl Med* 1980;2:55-60.
3. Oeztuerk E, Oezgueven M, Vardareli E, Gunalp B, Bayhan H. Visualization of gastrointestinal bleeding during Tc-99m DTPA renal scintigraphy. *Clin Nucl Med* 1994;19:642-3.
4. Abdel-Dayem H, Mahajan K, Owuwanne A, Ericsson S, Nawaz K, Kouris K, *et al.* The use of 99m Tc-DTPA for detection and localization of site of acute gastrointestinal bleeding. *Eur J Nucl Med* 1988;14:98-104.

Correspondence to: Dr Kawabe. Fax: +81 (6) 6646 0686. E-mail: kawabe@med.osaka-cu-a

Image

Bleeding ileal duplication diagnosed by pertechnetate scan

A 2-year-old boy presented with four episodes of fresh rectal bleeding in the fourth month of life, without history of abdominal pain, distension, vomiting, bleeding from any other site, fever or jaundice. Except for pallor the general examination was normal. There was no abdominal lump or organomegaly. Per rectal examination did not reveal any polyps. Extensive work-up done elsewhere, including tests for coagulation disorder, liver and renal function tests, ultrasonography and CECT abdomen, were inconclusive. Upper and lower GI endoscopy had also been inconclusive.

Sodium ^{99m}technetium pertechnetate scan revealed uptake of ^{99m}Tc in a large segment of small intestine, signifying presence of ectopic gastric mucosa (Fig). A provisional diagnosis of duplication anomaly was made. At surgery, a 60-cm tubular duplication was found in the mid ileum. The duplicated intestine was resected along with adjacent ileum, and intestinal continuity was restored. The child recovered uneventfully.

Small bowel duplications may present as antenatally diagnosed intra-abdominal cyst or postnatally with intussusception, volvulus, perforation or GI bleed. GI bleed is painless and substantial; it is commonly seen with tubular duplications. Bleeding is due to ulceration of ectopic gastric mucosa that is often present in symptomatic cases. Pertechnetate scan can detect ectopic gastric mucosa with a sensitivity of 85% and specificity of 95%.¹



A K Singal, C S Bal,* M
Srinivas, V Bhatnagar
Departments of Pediatric
Surgery and *Nuclear
Medicine, All India Insti-
tute of Medical Sciences,
New Delhi 110 029

Reference

1. Harden R McG, Alexander WD, Kennedy I. Isotope uptake and scanning of stomach in man with 99m-Tc pertechnetate. *Lancet* 1967;i:1305-7.

Fig: Technetium pertechnetate scan showing uptake of isotope in long segment of intestine. Resected specimen is at bottom

I. C型肝炎ウイルス(HCV)

C型肝細胞癌

我が国におけるC型肝炎ウイルスと肝細胞癌の疫学

Epidemiology of hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma in Japan

田中 隆¹ 廣田良夫¹ 西口修平²**Keywords** : C型肝炎ウイルス, 原発性肝癌, 疫学

はじめに

厚生労働省「人口動態統計」¹⁾によると、平成13年では悪性新生物による死亡数が30万658人で、死因順位は昭和56年以来第1位である。その中で肝および肝内胆管の悪性新生物の年齢調整死亡率(人口10万人対、昭和60年モデル人口を基準)は、男性で27.3、女性で8.8となっており、男性では肺癌、胃癌に次いで第3位、女性では胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌に次いで第5位となっている。年齢調整死亡率で経年推移をみると、男性では昭和50年代から上昇傾向がみられる一方、女性は低下傾向にある中で、男女ともに平成7年に上昇したが、以後、男性は低下傾向にあり、女性は横這い傾向である。

C型肝炎ウイルス(HCV)の発見以前より、原発性肝細胞癌増加の原因として、輸血による非A非B型肝炎ウイルスの関与が想定されてきた。HCVの発見およびその後のHCV診断法の改良により、現在ではHCVと肝癌の関連は確実視されている。

本稿では、厚生労働省の人口動態統計特殊報告²⁾および、平成14年より実施されている肝炎ウイルス検診結果の報告(厚生労働省ホームページに公開されている)に基づき、両者の関連性について疫学的検討を加えたい。

1. 原発性肝癌の原因と年次推移

原発性肝癌の原因について、日本肝癌研究会の第14回全国原発性肝癌追跡調査報告³⁾によると、肝癌症例の16.5%がHBs抗原陽性、74.8%がHCV抗体陽性であった。一方、大阪肝炎・肝硬変研究会が大阪地域の9施設から収集した肝癌症例については、男性では、12.3%がHBs抗原陽性、73.3%がHCV抗体陽性。女性では9.0%がHBs抗原陽性、80.6%がHCV抗体陽性であり、HCVに関しては、全国レベルと類似した値を示していた⁴⁾。

つぎに、原因ウイルスについて年次推移を検討した。B型肝炎ウイルスに基づく原発性肝癌の人口10万当たりの死亡数の割合が1968-77年では約42%、1980-81年では約31%、1984-85年では約25%と年を経るにつれて相対的に減少してきている⁵⁾。大阪肝炎・肝硬変研究会の大阪地域でのデータでも2000年では男女とも約19%となっている⁶⁾。これはB型肝炎由来の肝癌の減少を示しているというよりは、非A非B型(C型)肝炎由来の肝癌の著しい増加による相対的な減少と考えられる。その原因として、戦後医療行為の高度化に伴い輸血を行う頻度が増加したため、非A非B型輸血後肝炎が多発し、約35-40年を経過し、原発性肝癌の急増として

¹⁾Takashi Tanaka, Yoshio Hirota: Department of Public Health, Graduate School of Medicine, Osaka City University 大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学 ²⁾Shuhei Nishiguchi: Department of Hepatology 同肝胆膵病態内科学

現れたものと考えられる。実際、大阪肝炎・肝硬変研究会の大阪地域でのデータでは診断年が1990年以降のHCV抗体陽性割合は、男性で約75%、女性で約80%と極めて高率になっている。

2. HCV抗体陽性率と原発性肝癌の死亡率

平成14年度より老人保健法による基本健康診査以外に肝炎ウイルス検診が実施された。その中の節目検診の部分につき、平成14年度肝炎ウイルス検査実施結果として公表された。'現在、C型肝炎ウイルスに感染している可能性が極めて高い'と判定された者の割合が感染者率として表されている。従来これに代わるものとして献血者のHCV抗体陽性率がよく使われてきたが、真の感染者の割合を示す指標としては前者の方が優れていると思われる。

都道府県別のHCVの感染者率を表1と図1に示すが、最も高い県は佐賀県の3.9%であり、以下広島県1.8%、福岡県1.7%、香川県1.7%と続いている。逆に感染者率の最も低い県は沖縄県が0.3%であり、以下、岩手県、秋田県、新潟県が0.6%と続いている。このように、沖縄県は例外として、東日本に比し西日本でHCVの感染者率が高い傾向が認められる。政令市別にみると大阪市が2.0%と最も高く、以下、北九州市と千葉市が1.9%で続いた。ただし、以上のデータを使用する際には対象者のバイアスの問題などの注意が必要である。例えば、大阪市を例にとると、既に平成8年より、40歳以上の肝癌ハイリスク者を対象に'ハイリスク者検診'を実施してきた。すなわち、'ハイリスク者検診'を受診した者は今回を含めその後の肝炎ウイルス検診の対象からはずれることになり、今回の結果はかなり過小評価された値を示している可能性がある。

つぎに、厚生労働省の人口動態統計特殊報告を基に原発性肝癌の年齢調整死亡率についてやはり都道府県別に検討した。表1、図2に示した男性の原発性肝癌の死亡率は明らかに西高東低の傾向が認められる。具体的には、福岡県が

表1 都道府県別肝癌年齢調整死亡率と肝炎ウイルスマーカー陽性率

	肝癌年齢調整死亡率 (人口10万対)		C型肝炎ウイルス感染者率 (%)		HBs抗原陽性率(%)
	男性	女性	感染者率	陽性率	
北海道	23.5	7.3	0.7	2.4	
青森	20.5	7.3	1.1	1.7	
岩手	16.6	5.4	0.6	1.4	
宮城	19.5	7.3	0.7	1.7	
秋田	17.9	5.7	0.6	1.9	
山形	17.1	6.7	0.9	1.4	
福島	21.9	7.9	0.8	1.4	
茨城	25.8	6.9	1.0	0.8	
栃木	24.6	7.9	1.1	1.3	
群馬	23.0	9.1	1.3	0.8	
埼玉	24.1	7.6	1.0	0.9	
千葉	24.1	6.5	1.0	0.9	
東京	26.3	8.4	1.1	1.1	
神奈川	25.4	8.4	1.0	0.8	
新潟	16.1	5.2	0.6	1.1	
富山	20.6	6.6	1.1	1.6	
石川	22.9	9.1	1.3	1.4	
福井	23.3	7.7	1.3	1.1	
山梨	31.1	10.4	1.4	1.3	
長野	17.5	6.7	0.9	0.6	
岐阜	26.1	8.0	1.4	1.0	
静岡	29.0	8.3	1.1	0.9	
愛知	24.2	7.8	1.2	0.9	
三重	23.7	9.1	1.6	0.7	
滋賀	21.5	6.7	0.8	0.5	
京都	29.6	10.3	1.1	0.9	
大阪	43.4	14.3	1.5	1.2	
兵庫	37.7	11.4	1.3	1.1	
奈良	33.8	10.6	1.3	1.1	
和歌山	32.5	9.9	1.1	0.8	
鳥取	30.8	7.1	1.4	2.1	
島根	34.3	10.0	1.6	1.3	
岡山	29.2	7.9	1.2	0.9	
広島	40.9	11.6	1.8	1.7	
山口	33.4	11.0	1.6	0.9	
徳島	34.0	11.8	1.2	1.3	
香川	30.9	8.3	1.7	1.0	
愛媛	38.7	9.7	0.9	1.4	
高知	24.6	8.4	1.0	1.1	
福岡	44.7	12.6	1.7	1.4	
佐賀	43.9	13.5	3.9	1.5	
長崎	33.7	9.1	1.1	1.7	
熊本	32.6	8.5	1.5	1.5	
大分	31.9	10.4	1.2	1.4	
宮崎	26.2	7.4	0.6	1.2	
鹿児島	29.1	9.0	1.1	1.6	
沖縄	15.3	3.8	0.3	3.1	

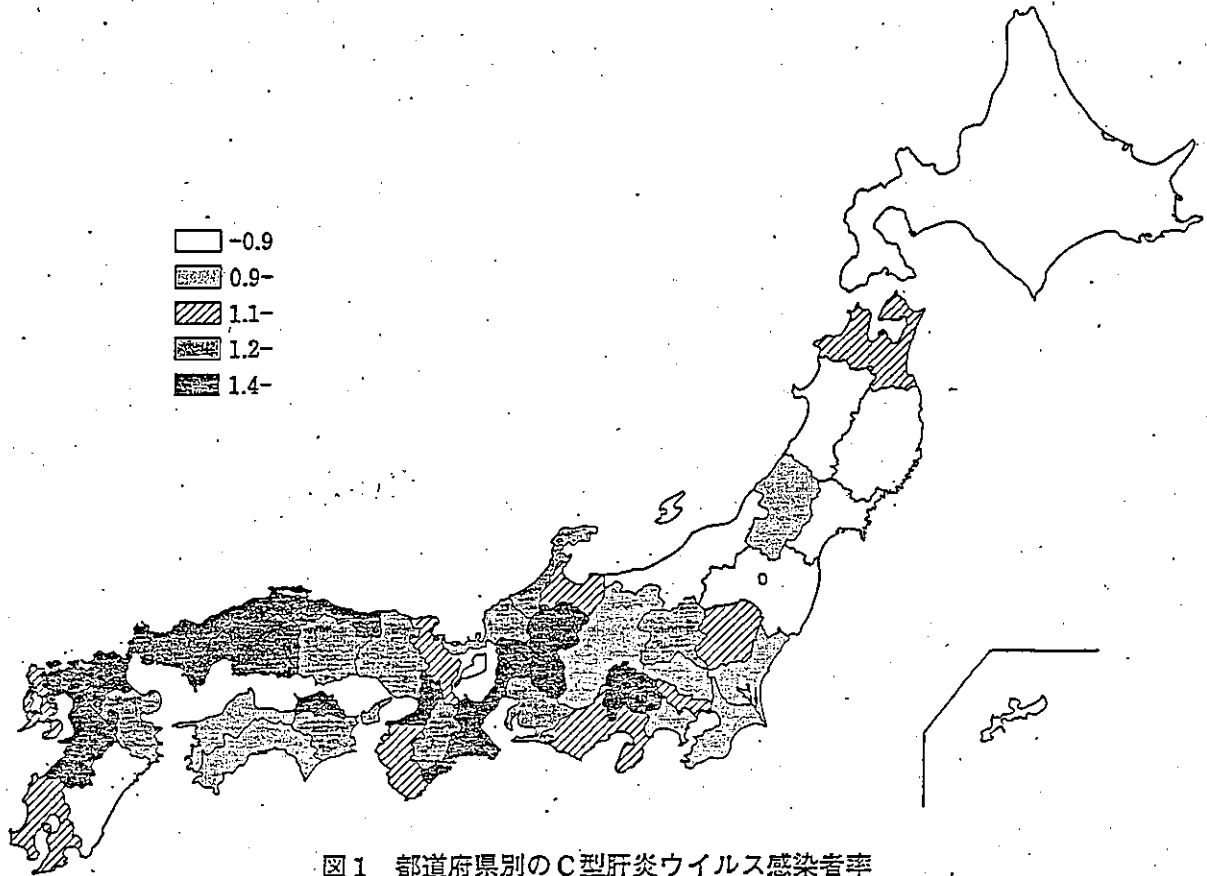


図1 都道府県別のC型肝炎ウイルス感染者率

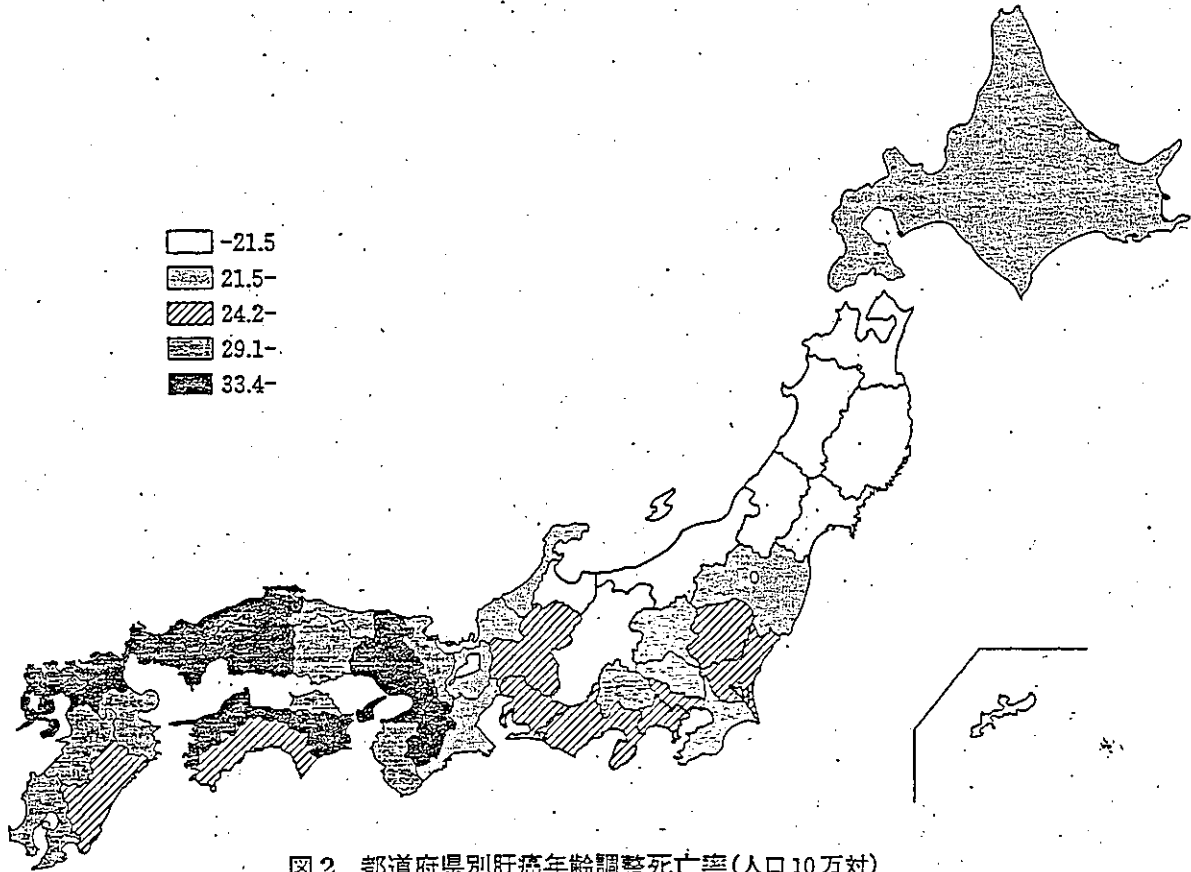


図2 都道府県別肝癌年齢調整死亡率(人口10万対)

44.7(人口10万人対)でトップであり、以下、佐賀県43.9、大阪府43.4、広島県40.9と続いた。すなわち、全国レベルでは、HCVの感染者率の分布パターンと原発性肝癌による年齢調整死亡率の分布パターンとが極めて類似しているように思える。

そこで、両者の相関をみるため Spearman の相関係数とその確率を算出すると、相関係数 0.683 ($p < 0.0001$) と有意な相関を示した。ちなみに、同様の検討を HBs 抗原陽性率との間で行ったが、相関係数 0.011 ($p = 0.940$) と有意な相関はみられなかった。

おわりに

原発性肝癌の原因として疫学的に肝炎ウイルス、特に HCV の関与は明らかである。一方、HBV 由来の肝癌は HB グロブリンやワクチン投

与による母子感染の防止により、減少してきており、いずれ根絶が確実視される。HCV の感染経路もほぼ明らかになってきており、輸血や医療行為を介する感染は防止可能である。しかし、C 型慢性肝炎の約半数はその感染経過が明らかではなく、更には、自身が C 型肝炎ウイルスに感染していることを知らず、いきなり C 型慢性肝炎と診断される症例も多い。すなわち、原発性肝癌の減少のためには、自身の HCV 感染状況を知り、もし、感染が判明した場合には、適切な医療機関において、適切な治療、更には適切なフォローアップへの誘導が重要である。その意味においても、平成 14 年より始まった肝炎ウイルス検診の意義は大きく、従来老人保健法のもとに行われていた他臓器の「がん検診」以上に有効なものとなる可能性がある。

参考文献

- 1) 平成 13 年人口動態統計(厚生労働省大臣官房統計調査部編), (財)厚生統計協会, 2003.
- 2) 平成 12 年都道府県別年齢調整死亡率. 人口動態統計特殊報告(厚生労働省大臣官房統計調査部編), (財)厚生統計協会, 2000.
- 3) 第 14 回全国原発性肝癌追跡調査報告(1996-1997). 日本肝癌研究会肝癌追跡調査委員会. 肝臓 41: 799-811, 2000.
- 4) 大阪肝炎・肝硬変研究会: 平成 12 年度特定疾患調査研究結果報告書, 2001.
- 5) 仲谷信治ほか: 本邦における肝細胞癌と C 型肝炎ウイルスの疫学. 日本臨牀 55: 759-763, 1995.

I. C型肝炎ウイルス(HCV)

C型肝硬変

C型肝硬変に対するIFN療法の肝発癌抑制効果

Effects of IFN on incidence of hepatocellular carcinoma in HCV positive cirrhosis

西口修平¹ 久保正二² 塩見 進³

Key words: 肝癌, インターフェロン, 発癌抑制, 肝硬変

はじめに

インターフェロン(IFN)の肝発癌抑制効果に関する検討は、肝硬変に対するIFNの発癌抑制効果についての著者らの臨床試験が最初の報告である¹⁾。その後、多くの大規模試験が行われ^{2,3)}、IFNがC型慢性肝炎に対し発癌抑制効果を有することは既にコンセンサスが得られている。特に、IFNによってALT値が正常化した症例や肝組織が改善した症例ではIFNの発癌抑制効果が顕著である。しかし、肝硬変に限定すると慢性肝炎より、①検討された症例数が少ないこと、②IFNによるウイルス消失率が低率であること、③IFN投与例にも高率に肝発癌が認められることから、肝硬変に対するIFNの発癌抑制効果についてはいまだに明確な結論が得られていない。

本稿では、肝硬変に対する著者らの臨床試験を含め発癌抑制に関する主な文献を紹介したい。

1. C型肝硬変の病態と治療

C型慢性肝炎では病態の進行速度に個人差がみられるものの、多くは肝組織の肝線維化が進展し終末像である肝硬変に至る。この間、発癌のリスクは徐々に増大し、肝硬変では年率7%に達することが臨床的に最も重要な問題とされ

ている。このため、C型慢性肝炎に対するIFN治療の評価も、近視眼的な投与後のALT値の改善やHCV-RNAの消失から、肝硬変への進展抑制、発癌の予防や生命予後の改善に注目が集まるようになった。もちろん、IFNによってHCV-RNAの持続消失(sustained viral response: SVR)が得られた症例では、その後肝機能の改善や発癌の抑制が顕著であり、最終的には予後の延長が期待できる⁴⁾。更に、リバビリン併用療法によって従来のIFN難治例でも約15%にSVRが生じることから⁵⁾、更に強力な発癌抑制効果が期待されている。

慢性肝炎と肝硬変は一連の疾患であるものの、現在我が国では肝硬変に対するIFN投与は認められていない。その主な理由として、①慢性肝炎に比して高齢で血小板数が少ないためにIFNの副作用が出現しやすいこと、②SVR率も慢性肝炎の半分程度しか望めないことである。IFNの発癌抑制効果についても、肝硬変では病期期間が長いこと遺伝子異常の集積が高度で染色体にgenomic instabilityが生じており⁶⁾、既に画像診断ではとらえられない微小な肝癌が合併している確率も高いと推測されている。

2. IFNの発癌予防効果

IFNの発癌抑制効果に関する最初の検討は、

¹Shuhei Nishiguchi: Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆腸病態内科学 ²Shoji Kubo: Department of Gastroenterological Surgery 同消化器外科 ³Susumu Shiomi: Department of Nuclear Medicine 同核医学

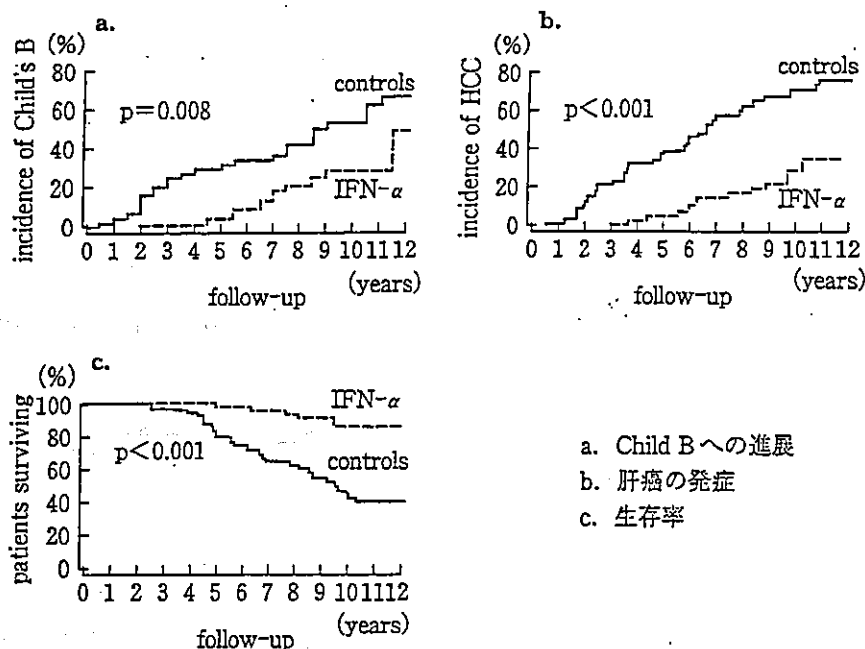


図1 C型肝硬変に対するIFNの治療効果⁷⁾

著者らが1995年に報告したC型肝硬変に対する臨床研究である¹⁰⁾。対象は、よく代償された、血小板数が7万以上のC型肝硬変の90例であり、IFN投与群(6MIU/day週3回24週)と非投与群の2群に分け治療効果を検討した。肝硬変の診断は、臨床診断であり、実際は肝組織所見ではstage 3の慢性肝炎を一部に含んでいる。

IFN投与群は対照群に比し平均のALT値は低下したが、HCV-RNAの持続消失は7例(16%)しか生じず、慢性肝炎に対する成績に比べ有効性は低かった。しかし、IFN投与群ではAFP値の増加が抑制され、アルブミン値や血小板数が増加した。更に、IFNはChild AからChild Bへの肝硬変の進展を阻止した(図1-a)。IFNは発癌率を低下させたが、IFN投与後3年以降で無効例、特にALTの高値例を中心に発癌が生じ、SVR例を除けば対照群と発癌率はほぼ同等である(図1-b)。ウイルス非消失例ではIFNの繰り返し投与の必要性を示唆する成績である。IFN投与群では肝硬変の進展や発癌の遅延によって肝不全死や肝癌死が減少し、生存率の改善が認められた(図1-c)。IFN投与群の非投与群に対するリスク比を統計的に求めると、肝硬変の進展を0.250倍、肝癌の発症を0.256倍、全死亡

率を0.135倍に低下させた。以上の成績は、少数例ながらIFNの発癌抑制と予後改善作用を示唆した成績である。

慢性肝炎に対する発癌抑制効果に関しては、その後多くの多施設大規模研究によってこれらの効果が再確認された。特に、吉田らは、IFNの発癌抑制作用はIFNによって肝機能改善が得られた症例(BR)ではSVR例とほぼ同様の効果が認められることを明らかにした⁹⁾。Chanderらのmeta-analysisの結果もBR例での発癌抑制作用を追認している(図2)⁹⁾。IFN抵抗性肝炎であっても、IFNによる肝機能の正常化は約15%に認められるため、临床上重要な知見である。更に、前述の吉田らは、C型慢性肝炎の標準化死亡率(SMR)は一般人の1.9倍に達するが、IFN投与例では、主に肝臓関連死の低下によって、0.9倍まで低下することを明らかにしている⁹⁾。このように、IFNは肝機能の安定化を介して、発癌抑制や予後の延長を来すことが明らかとなった。

我が国で行われた代表的な大規模研究であるIHIT研究³⁴⁾やImaiらの研究²⁾においても、肝硬変であるF4に限定すればIFNは対照群に比して発癌率は低下するものの有意差は得られてい

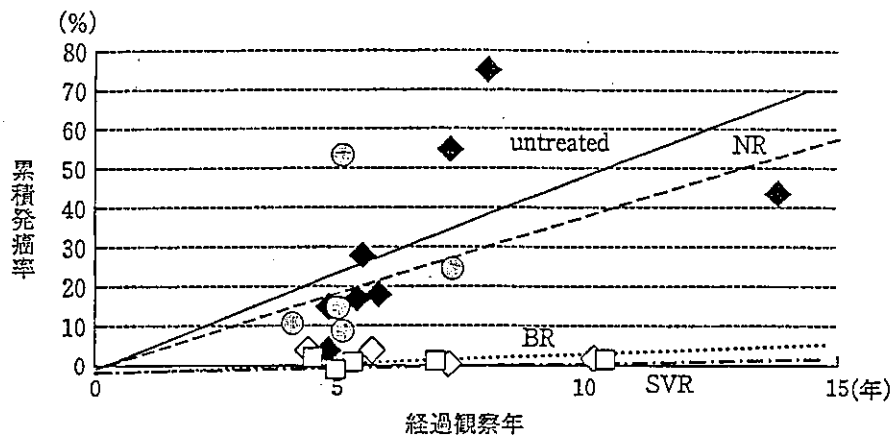


図2 IFNの発癌抑制効果に関するメタアナリシス⁸⁾
BRはSVRとはほぼ同等の発癌抑制効果を示す。

表1 C型肝硬変を対象としたIFNの肝発癌と生命予後に及ぼす効果

報告者	手法	症例数	IFN投与例数	対照群例数	経過観察年数	肝発癌	生命予後
Nishiguchi (1995, 2001)	P	90	45	45	8.7	低下	改善
Mazzella (1996)	P	285	193	92	2.7	低下	—
Fattovich (1997)	R	329	193	136	5.0	NS	改善
Serfaty (1998)	R	103	59	44	3.3	低下	改善
Valla (1999)	P	99	47	52	3.1	NS	NS
Hu (1999)	R	112	49	63	4.5	NS	NS
Gramenzi (2001)	P	144	72	72	4.6	低下	NS
Ikeda (2001)	R	694	113	581	7.6	低下	—
Testimo (2002)	R	130	59	71	8.0	NS	—

ない。症例数が少ないことと、対照とした症例がIFN投与例と背景因子に差があった可能性も否定できないが、慢性肝炎に比して肝硬変ではIFNの発癌抑制効果が弱いことは事実である。表1は現在までに発表されているC型肝硬変を対象とした主な臨床研究であるが、肝発癌リスクを低下させるという報告が5研究、有意差なしとする研究が4研究である⁹⁾。これらの成績の解離の一因として、日本やイタリアなどのC型肝硬変からの肝発癌率が高い地域での検討ではIFNの発癌抑制効果が明確になりやすいが、発癌率の低い地域においてIFNの効果を検証するためには症例数や経過観察年が不足していることが考えられる。

3. IFNの治療法の工夫

C型慢性肝炎に対するSVR率は、IFN単独療

法では約30%、リバビリン併用療法では約50%と考えられている。それぞれ約15%のBRが生じるためリバビリン併用療法では約7割の患者がBRかSVRに至り、より強力な発癌抑制効果が期待できる。肝硬変では慢性肝炎よりIFNの有効率が低率であることから、リバビリン併用可能な症例には投与することが望ましい。しかし、リバビリンは副作用の発現頻度が高いため投与対象として、①おおむね65歳以下で、②ヘモグロビン値が12g/dl以上で、③クレアチニンクリアランスが50ml/min以上であること、④糖尿病や高血圧などの他疾患の合併がなく、更に、⑤現在の保険適用は肝硬変に進展していない症例に限定されている。少なくとも5年程度の発癌抑制効果に関しては、前述のようにSVR例とBR例に差がないことから、高齢者や身体条件に問題がある場合や肝硬変の患者

ていないのが現状である。しかし、我が国では肝硬変の肝発癌率が高く、従来 of 肝庇護剤で ALT の安定化が生じない症例に対しては積極的に IFN を投与することが望ましい。特に、HCV genotype 2a, 2b の症例や 1b であってもウイルス量が少ない症例では、IFN による SVR 率が高く発癌抑制効果を期待して積極的に投与すべきである。現在、我が国では難治例を除いた肝硬変に対する IFN- β の臨床治験が行われているが、肝硬変に対しては IFN の保険適用が得られておらず早期の承認が望まれる。慢性肝炎に対しては、従来の IFN- α や β 製剤に、2001 年末よりコンセンサス IFN とリバビリンの併用療法

が加わり、更にポリエチレングリコール(PEG)を結合させた PEG-IFN も承認済みである。2004 年末中には、最も有効率が高いとされている PEG-IFN とリバビリンの 1 年投与も承認される¹⁴⁾。また、治療期間についての制限はほぼ撤廃され、治療法の選択肢が増えている。我が国の患者は感染からの期間が長いため、患者の病態に大きな幅が生じ、なかでも高齢でかつ肝硬変に進展した症例への治療法が問題になっている。これらの患者に適切で有効な医療を提供するためには、これらの新薬についても対象を肝硬変や肝癌まで拡大し、治療の選択肢を増やすことが望ましい。

文 献

- 1) Nishiguchi S, et al: Randomised trial of effects of interferon- α on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C with cirrhosis. *Lancet* 346: 1051-1055, 1995.
- 2) Imai Y, et al: Relation of interferon therapy and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 129: 94-99, 1998.
- 3) Yoshida H, et al: Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. *Ann Intern Med* 131: 174-181, 1999.
- 4) Yoshida H, et al: Interferon therapy prolonged life expectancy among chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 123: 483-491, 2002.
- 5) 坪田昭人: リバビリン併用療法. *Prog Med* 23: 1115-1122, 2003.
- 6) 樋野興夫ほか: 慢性肝炎から慢性肝癌への時代である. *医学と薬学* 47: 86-88, 2002.
- 7) Nishiguchi S, et al: Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic active hepatitis C and cirrhosis. *Lancet* 357: 196-197, 2001.
- 8) Chander G, et al: Treatment of chronic hepatitis C: A systemic review. *Hepatology* 36: S135-S144, 2002.
- 9) Mazzella G, et al: Alpha interferon treatment may prevent hepatocellular carcinoma in HCV-related liver cirrhosis. *J Hepatol* 24: 141-147, 1996.
- 10) 左近賢人ほか: インターフェロン併用化学療法. *肝胆膵* 46: 583-589, 2003.
- 11) Kubo S, et al: Randomized clinical trial of long-term outcome after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma by postoperative interferon therapy. *Br J Surg* 89: 418-422, 2002.
- 12) Merle P, et al: Long-term high-dose interferon- α therapy delays Hepadna virus-related hepatocarcinogenesis in X/myc transgenic mice. *Oncogene* 22: 2762-2771, 2003.
- 13) Nishiguchi S, et al: Changes in hypervariable region 1 in patients with chronic hepatitis C of genotype 1b with biochemical response to interferon. *Hepatol Res* 23: 237-250, 2002.
- 14) Fried MW, et al: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347: 975-982, 2002.

I. C型肝炎ウイルス(HCV)

特殊型C型肝炎の臨床特論

HBV, HCV重複感染慢性肝疾患の疫学と臨床的特徴

Prevalence and clinical course in HBV and HCV dually chronic infection

田守昭博 西口修平

Key words : HBV, HCV, 重複慢性肝炎

はじめに

B型肝炎ウイルス(HBV)とC型肝炎ウイルス(HCV)の重複感染には急性肝炎として同時に感染する場合(coinfection)といずれかの慢性肝疾患患者に新たに異なる肝炎ウイルスが感染する(superinfection)場合, 更に両者が慢性持続感染している場合がある. 本稿では重複感染についてB型, C型慢性肝炎患者へのsuperinfectionと重複慢性肝炎とについて最近の論文を概説したい.

1. 重複感染慢性肝疾患の頻度

HBVとHCVはともに血液を介した感染経路をもつことからその重複感染の機会が多いものと推測される. しかし成人感染では慢性化しにくいHBVの臨床経過から慢性重複感染の頻度は少ない. これまでB型肝炎患者におけるHCV抗体陽性頻度が報告されており, 10~15%とされている¹⁾. 我が国においてもHBVキャリアを対象として15/86例(17%)のHCV抗体陽性例を認めたとの報告や, 20/156例(13%)の重複感染を認めたとの報告がある. 一方, C型肝炎患者を対象としてHBV重複感染の頻度を多数例の血清HBs抗原から検討した報告はないが, 日常臨床からはその頻度は少ないようで

ある. 一方, 肝組織中のHBV-DNAを検討した報告によると, 66/200例(33%)と高い頻度を検出している²⁾. しかしHBV-DNAをPCR法にて検出する潜在的HBV感染の存在は, 施設において賛否の分かれる問題であり, 今後測定系の標準化が課題である.

次にC型慢性肝疾患におけるHBV関連抗体の検出頻度の報告を述べる. Marusawaら³⁾は2,014例のC型慢性肝疾患を対象としてHBc抗体を測定し約50%に検出したことを報告している. その頻度は慢性肝疾患を認めない健常人におけるHBc抗体陽性率12%より有意に高いとしている. さらに肝疾患の進行とともにHBc抗体陽性率は慢性肝炎426/972(44%), 肝硬変215/430(50%), 肝細胞癌363/611(59%)と高くなることも示している. Hiraokaら⁴⁾は献血者を対象としてHBc抗体陽性率はHCV抗体陽性例において76/135(56%), HCV抗体陰性例では65/255(25%)とC型肝炎キャリアにおいてHBc抗体陽性例が多いことを報告している. 著者らはHBc抗体陽性C型肝炎細胞癌においてHBV-DNAが組み込まれていることを証明している⁵⁾. しかしC型慢性肝疾患においてHBc抗体の有無がその病態に何らかの影響を及ぼすか否かについては結論は出ていない.

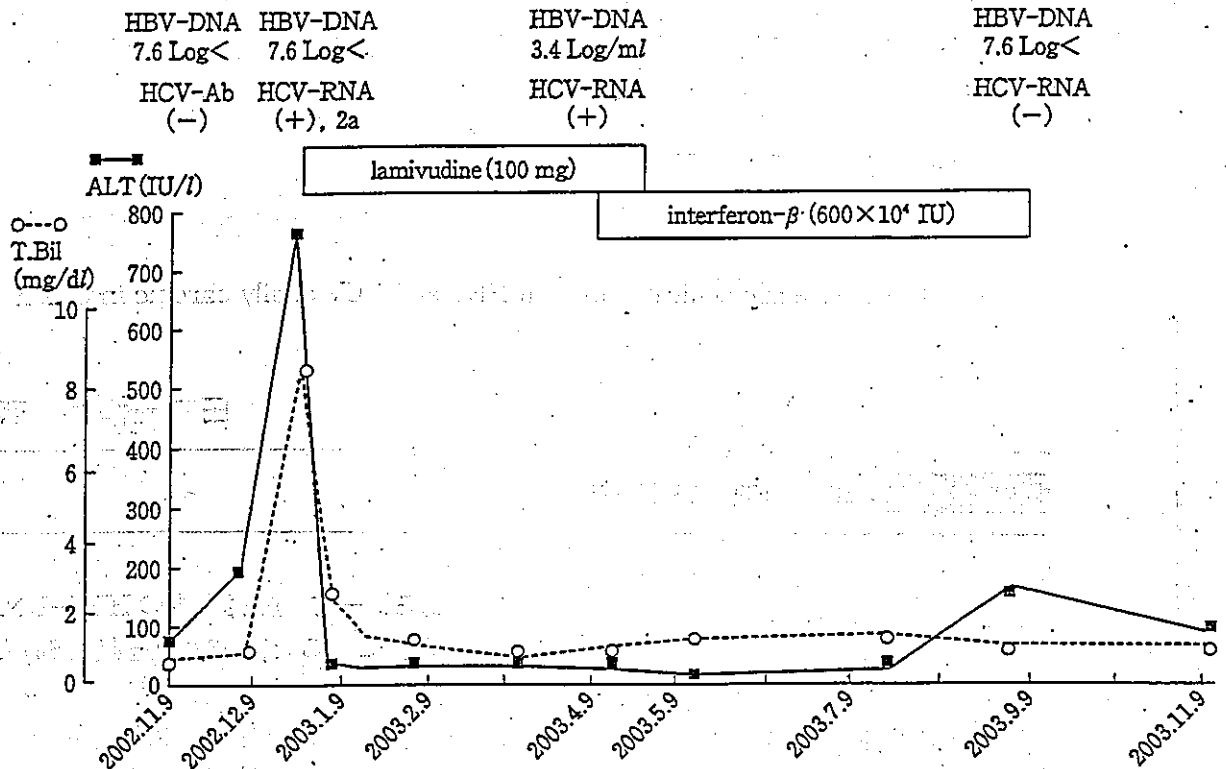


図1 HBVキャリアへのC型肝炎ウイルス感染例の臨床経過

2. 重複感染慢性肝疾患の病態と臨床経過

HBVとHCVの重複感染(superinfection)に関するまとまった報告はなく、その頻度は不明である。複数のウイルス感染時には互いに干渉作用があることが一般的に知られている。肝炎ウイルスにおいてもHBe抗原陽性群と陰性群におけるHCV-RNA量の比較から、HBV量が多いHBe抗原陽性群ではHCV量が少なく、HCV増殖がHBVにより影響を受けることが示唆されている。また一方、HCV抗体陽性群と陰性群の比較においてHBs抗原の力価が異なることやHBs抗原の年率累積消失率の検討(HBV単独群0.43%、HCVとの重複感染群2.08%)からHCVにもHBV増殖への干渉作用があることが推測されている。

次に臨床経過についてB型慢性肝炎患者にHCVが重複感染した際の肝炎の病態を述べたい。ウイルス相互の干渉作用からウイルス増殖は抑制されることとは異にして、肝炎は重症化しやすいと報告されている。著者らが経験した

症例においても黄疸が出現し肝炎は重症化し入院を要した(図1)。特に劇症肝炎への進展頻度が高いと報告されており、注意が必要である。

また、C型慢性肝炎患者へのHBV感染に関する病態は急性B型肝炎をHCV抗体陽性21例(重複感染群)と陰性20例に分けその臨床経過を比較した報告が参考になる。Sagnelliら⁶⁾の論文では感染初期のHBV-DNA量は両群に差異はなかったが、HBe抗原から抗体へのセロコンバージョンは重複感染群において速やかに起こったとしている。臨床経過では血清ALTは両群とも2,000以上に上昇したが、肝不全を示す兆候(腹水、脳症、プロトロンビンの25%以下への低下)は重複感染群にのみ認められた。

以上に述べたように、慢性ウイルス肝炎の臨床経過において急性増悪が起こった際に新たな肝炎ウイルスの重複感染の可能性も鑑別診断にあげる必要があるものと考えられる。

3. 重複感染慢性肝疾患に対する治療

慢性肝疾患への新たな肝炎の感染に対する治

療は、劇症化の可能性を考慮し慎重に行う必要がある。一般的には単独の急性肝炎と同様に肝庇護療法が行われているが、これが最良の方法であるか否かのエビデンスはない。近年、HBVに対する抗ウイルス薬の使用も可能となり、劇症化が予測されれば速やかに投与開始すべきであると考える。

著者らが経験した症例を提示する(図1)。患者は39歳、男性。会社検診では肝機能異常を指摘されたことはない。妹2人がB型肝炎にて加療中であり、近医で採血したところトランスアミナーゼの軽度上昇を指摘され当院を紹介された。血液検査ではHBV-DNA 7.6以上(PCR法)、HCV抗体陰性、血小板26.3万、AST 30、ALT 82、 γ -GTP 47。肝生検では著明な脂肪沈着のみを認め、この1年間の急激な体重増加を加味し患者の肝障害は脂肪肝によるものとして食事指導を行った。

その3カ月後全身倦怠感と黄疸を主訴として来院した。T. Bil 8.5, AST 412, ALT 758でありHBVキャリアの急性増悪と考え入院のうえラミブジン投与を開始した。ところが今回の入院時における採血でHCV抗体が陽性であるとの報告があり、直ちにHCV抗体の再検とともにHCV-RNAを測定した。その結果、HCV genotype 2a, HCV-RNA 1.8kIUであり初回入院時にHCV抗体陰性であったことから、今回の肝障害はB型肝炎ウイルスキャリアへのC型急性肝炎の可能性があると診断した。なお再入院時のHBV-DNAは7.6以上(PCR法)であった。その後ラミブジン投与を継続し肝炎は鎮静化し黄疸も消失した。以降6カ月の経過でHCV-RNAは持続陽性であるためインターフェ

ロン治療を開始した。2週間のラミブジン併用後はインターフェロン単独にて6カ月治療を行い経過観察中である。

次にB型C型重複慢性肝炎の治療であるが、重複肝炎ではウイルス相互の干渉作用により両ウイルスともに増殖が盛んに起こっている例は少ないと推測される。したがって治療の選択としては優位なウイルス増殖を示す方を対象として行うことが妥当とする意見が多い。しかし、重複肝炎例ではHCVに対するインターフェロン治療が奏効しにくいことが報告されている。最近、台湾のグループ⁷⁾からインターフェロンとリバビリン併用療法に関して示唆に富む報告があった。24例のHBs抗原陽性、HCV抗体陽性を対象としてHCV-RNA陽性21例と陰性3例に対してインターフェロン、リバビリン併用療法を行いHCV単独陽性肝炎群での治療成績と比較検討している。治療後24週におけるHCV-RNA消失率は重複群で43%、単独群では63%で有意差はなかった。また重複群においてHCV-RNA陰性の3例(B型肝炎群)では肝機能改善も認められなかった。以上の結果から重複慢性肝炎に対してインターフェロン、リバビリン併用療法がHCV消失に有効であることを示唆している。

おわりに

HBVとHCVの重複慢性感染例については治療や予後について明らかとすべき課題が残されている。また慢性肝疾患への新たな重複ウイルス感染については肝不全へのリスクが高く、臨床的に注意すべき病態と考える。

参考文献

- 1) Liaw YF: Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection. *Hepatology* 22: 1101-1108, 1995.
- 2) Cacciola I, et al: Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 341: 22-26, 1999.
- 3) Marusawa H, et al: High prevalence of anti-hepatitis B virus serological markers in patients with hepatitis C virus related chronic liver disease in Japan. *Gut* 45: 284-288, 1999.
- 4) Hiraoka H, et al: Lack of epidemiological evidence for a role of resolved hepatitis B virus infection in hepatocarcinogenesis in patients infected with hepatitis C virus in Japan. *Intervirology* 46: 171-

176, 2003.

- 5) Tamori A, et al: Sequencing of human-viral DNA junctions in hepatocellular carcinoma from patients with HCV and occult HBV infection. *J Med Virol* 69: 475-481, 2003.
- 6) Sagnelli B, et al: HBV superinfection in hepatitis C virus chronic carriers, viral interaction, and clinical course. *Hepatology* 36: 1285-1291, 2002.
- 7) Liu CJ, et al: Ribavirin and interferon is effective for hepatitis C virus clearance in hepatitis B and C dually infected patients. *Hepatology* 37: 568-576, 2003.

（以下は極く薄い印刷のため、ほとんど不可読な状態です。内容は、上記の参考文献に関する詳細な説明や、研究の背景、方法、結果、結論、謝辞、参考文献リスト、および著者の連絡先に関する情報が含まれていると推測されます。）

（以下は極く薄い印刷のため、ほとんど不可読な状態です。内容は、上記の参考文献に関する詳細な説明や、研究の背景、方法、結果、結論、謝辞、参考文献リスト、および著者の連絡先に関する情報が含まれていると推測されます。）

（以下は極く薄い印刷のため、ほとんど不可読な状態です。内容は、上記の参考文献に関する詳細な説明や、研究の背景、方法、結果、結論、謝辞、参考文献リスト、および著者の連絡先に関する情報が含まれていると推測されます。）

（以下は極く薄い印刷のため、ほとんど不可読な状態です。内容は、上記の参考文献に関する詳細な説明や、研究の背景、方法、結果、結論、謝辞、参考文献リスト、および著者の連絡先に関する情報が含まれていると推測されます。）

（以下は極く薄い印刷のため、ほとんど不可読な状態です。内容は、上記の参考文献に関する詳細な説明や、研究の背景、方法、結果、結論、謝辞、参考文献リスト、および著者の連絡先に関する情報が含まれていると推測されます。）

（以下は極く薄い印刷のため、ほとんど不可読な状態です。内容は、上記の参考文献に関する詳細な説明や、研究の背景、方法、結果、結論、謝辞、参考文献リスト、および著者の連絡先に関する情報が含まれていると推測されます。）

II. B型肝炎ウイルス (HBV)

B型肝炎細胞癌

B型肝炎細胞癌の疫学—我が国と諸外国との比較—

Epidemiology of HBV related hepatocellular carcinoma in Japan

西口修平¹ 田守昭博¹ 田中 隆²

Keywords: B型肝炎ウイルス, 肝細胞癌, 疫学, HBワクチン, 発癌予防

はじめに

癌の三大要因として、疫学では環境要因、宿主要因、病因を想定しており、これらの要因が相互に作用して癌を発生させると考えられている。疫学上、病因(ウイルス感染)と発癌の因果関係を探るためには、それぞれの地区の感染状況のみならず環境要因や人種による特性についての調査が必要である。これらの要因を考慮したうえでウイルス感染と特定の癌との関連性を解析し、更にウイルス感染によって発癌のリスクが高まることを証明しなければならない。

B型肝炎ウイルス(HBV)による肝癌発症はウイルス発癌の代表格であり、両者の強い関連性は疫学的研究によって明らかにされ、更に発癌の機序についても多数の基礎研究がある。我が国ではHBVよりもC型肝炎ウイルス(HCV)に起因する肝癌が増加したが、アジア・アフリカ地域の肝癌の主体は依然としてHBVの持続感染が主体である。

HBVに対して、我が国では世界に先駆けて全国レベルでの感染予防対策や、B型慢性肝炎に対する積極的な抗ウイルス療法が導入された。特に、HBsヒト免疫グロブリン(HBIG)とHBワクチンによる母子感染防止対策によって、新規感染はほぼ消滅した。更に、感染者に対しては

抗ウイルス療法による肝硬変・肝癌への進展抑制が期待できることから、HBVによる肝癌の発生は減少することが予測されている。

本稿では、我が国の肝癌の実態を外国の状況と比較するとともに、我が国で行っているHBVに対する種々の対策の有効性について検証を加えたい。

1. B型肝炎ウイルスの世界分布

世界中では総人口の約6%に相当する3億5千万人のHBVキャリアが存在すると推測されている。持続感染者の多くはアジア・アフリカに集中しており、これらの地域は人口の8%以上のHBs抗原陽性率を有している¹⁾。これらの地域は肝癌の発生も多く、その主な原因は我が国のようなHCVではなくHBVが原因と推定されている。

HBVには多くのgenotypeが存在し、genotypeは慢性化や発癌などの病態をある程度規定する。アフリカに多いgenotype Aaでは若年でHBe抗原のseroconversionが生じ、母子感染は起こりにくい。このため、アジアとは異なり幼少時の水平感染が主体であるが、若年者に肝癌が多発する。我が国ではgenotype Cに比べgenotype Bの発癌率は低いが、台湾ではgenotype Bによる若年層の肝癌が多い。この解離は、同じgeno-

¹Shuhei Nishiguchi, Akihiro Tamori: Department of Hepatology, Osaka City University Graduate School of Medicine 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆臓病態内科 ²Takashi Tanaka: Department of Public Health 同公衆衛生学

typeであっても我が国と台湾では subtype が異なることで説明されている²⁾。発癌に影響する他の因子として、感染時期、ワクチンプログラムの有無、衛生環境や食料事情、HIVの重感染などが考えられる。例えば、台湾では、国家的ワクチンプログラムによって既に小児肝癌の減少が報告されているが³⁾、アフリカでは現在も適切な対策が取られていない。また、環境因子としてアジア・アフリカの肝癌の場合は、カビ毒であるアフラトキシンの関与が推定されている。

WHOでは、HBVキャリア率が2%以下を低頻度国として扱っている⁴⁾。ヨーロッパ諸国、北米、日本がこれに該当する。ヨーロッパでもイタリア、ギリシャ、スペインは感染率が2%を越えている。アメリカ合衆国では、アジア・アフリカ系移民においてはHBVの感染率が高く、感染経路も母子感染や小児期の感染が主体である。しかし、白人に限ると感染経路は成人期の性行為と麻薬の静脈注射が主体であり、若年の成人男性に感染者が集中している。感染が持続することは少なく、発癌に至る症例もまれである。

2. 肝癌発生数の年次推移

2003年度の‘国民衛生の動向’によると、我が国の肝癌による死亡者数は男性23,596人、女性10,715人であり、それぞれ悪性腫瘍による死亡の第3位と第4位である⁵⁾。消化器系の癌による死亡者数の年次推移を人口10万人当たりの調整死亡率でみると、男女とも胃癌の著しい減少が認められる。それに対し、肝癌は男性では、1975-90年にかけて急激に増加しているが、最近はやや頭打ちになっている。女性の肝癌では、1980年頃までは緩やかに減少し、その後はほぼ横ばいである。

肝癌の増加の原因として、輸血などの医療行為によるC型肝炎の蔓延が考えられている。言い換えれば、B型肝炎由来の肝細胞癌の患者数はほぼ一定であり、肝細胞癌に占めるHBs抗原の陽性率は相対的に減少している(図1)⁶⁾。第15回全国原発性肝細胞癌追跡調査によれば、HBs抗原の陽性率は16.8%、HBs抗体の陽性率

は22.3%であった⁶⁾。更に、HBs抗原とHCV抗体の両者を測定した17,688人中、HBs抗原陽性は2,977人(16.8%)、HCV抗体陽性は11,345人(64.1%)であり、両者陽性は557人(3.1%)、両者陰性は2,809人(15.9%)に認められた。

3. HBVキャリアからの発癌リスク

HBVが肝癌の発生に強く関与することは、疫学的検討によって初めて明らかにされた。Beasleyらの台湾における検討では、HBs抗原陽性者3,454人から3.2年の間に40人の肝癌発症例が認められ、非キャリアに対する相対危険度は223倍であった⁷⁾。

HBVキャリアでは、組織学的に早期の状態からも発癌が認められることが報告されている。しかし、総数ではやはり肝硬変に至ってからの発癌が多い。著者らの成績では、HBs抗原陽性の肝硬変からは年率約4%に肝癌が発生し、非B非C型よりは高いもののC型肝炎の約8%に比べ低率であった(図2)。

4. 肝細胞癌の一次予防と二次予防

我が国のHBVキャリアの成因は、母子感染と幼少時の水平感染が考えられている。HBVキャリアを減少させることは、肝癌の一次予防となる。水平感染に関しては、一般的な衛生状態の改善や、注射器のディスポーザブル化の徹底など医療を介する感染リスクの減少によって、4歳以下の小児における水平感染はほぼ消失している。更に、HBVの感染予防対策として、1986年より全国レベルで公費負担によるHBIGとHBワクチンの併用による感染予防処置が出生直後に行われている。この処置により、我が国の新生児のHBVキャリア発生は95-98%阻止されている⁸⁾。1986年以降の出生者のHBVキャリア率は0.04%である。この体制が継続されれば2020年頃には、HBVキャリアの母がほとんど存在しなくなるため、母子感染はほぼ消滅する。しかし、HBVキャリア自体がほとんど存在しなくなるには更に2060年以降まで待たねばならない。

次に、慢性肝炎・肝硬変への進展や肝癌の発

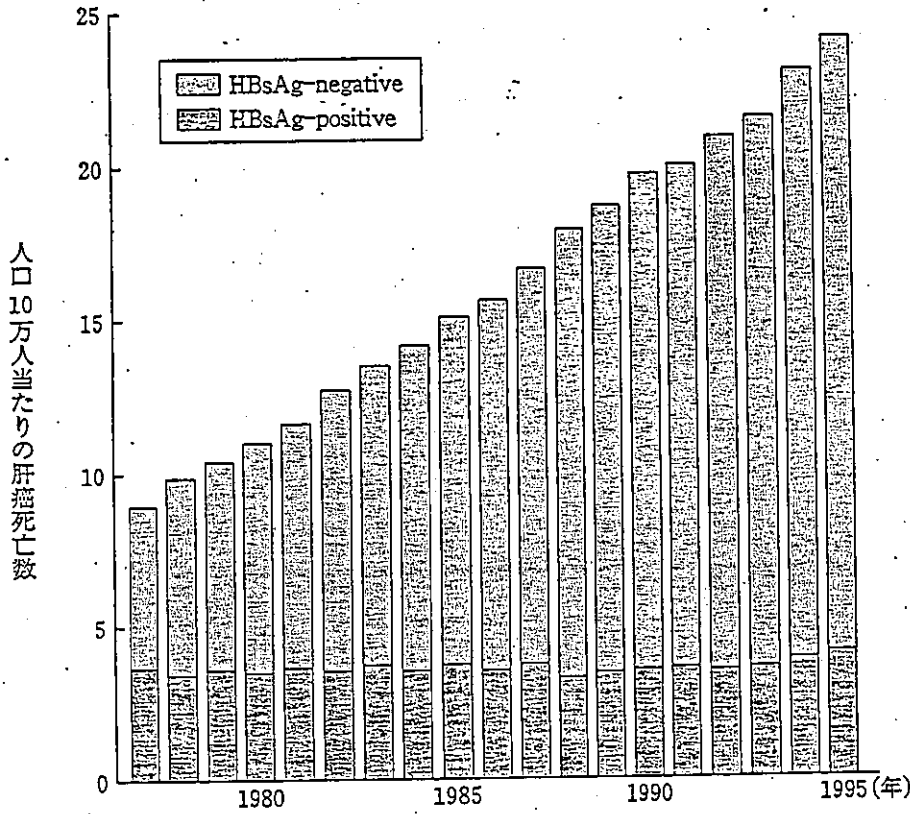


図1 我が国のB型肝炎の年次推移

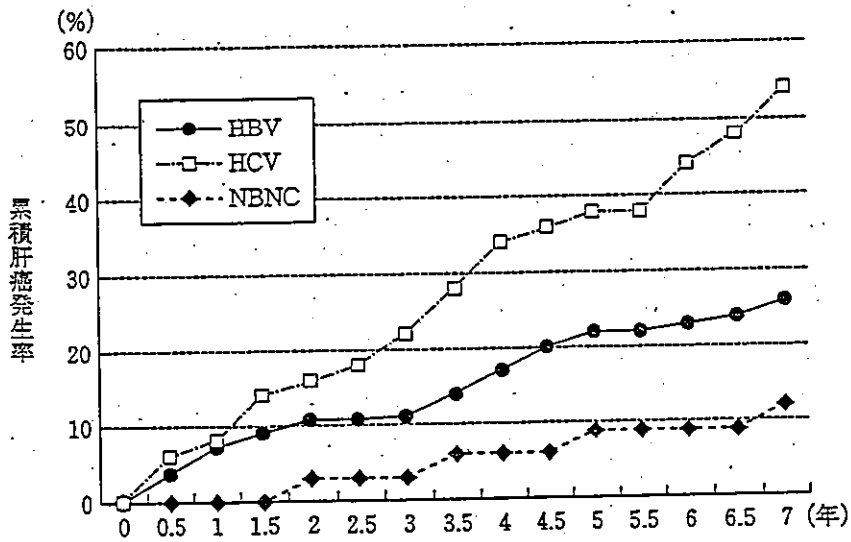


図2 肝硬変の病因と累積肝癌発症率

症を防ぐには、HBVキャリアに対して何らかの二次的発癌予防対策が必要である。既に、若年層の栄養状態の改善によってHBe抗原の陰性化が早まっているという報告もある。また、慢性肝炎の段階においても栄養状態の改善や禁酒指導によってある程度進行を防止できる。更に、

我が国ではB型慢性肝炎を対象に、積極的にインターフェロン(IFN)やラミブジンなどの抗ウイルス療法を行っている。IFNについては、従来の4週間投与から2000年末には24週投与が承認され、長期投与の有効性が報告されている。また、同時期にラミブジンが保険適用され、

YMDD 変異などの耐性株の問題を有するものの、強力な抗ウイルス効果を発揮することが明らかにされている。IFN による発癌抑制効果は、C 型慢性肝炎・肝硬変において既に検証されているが⁹⁾、池田らは IFN の長期投与例に限れば B 型においても発癌が抑制されることを明らかにした¹⁰⁾。ラミブジンについては、清澤らが我が国のラミブジン治療例について 30 施設の成績を集計し、ラミブジン投与による発癌抑制を報告している¹¹⁾。

おわりに

我が国における HBV キャリアの発生は、1986 年から開始された B 型肝炎母子感染防止対策事

業の成功によって激減した。また、献血者の HBs 抗原陽性率も 0.4% 程度にすぎない。しかし、最近、成人男性を中心にヨーロッパ型である genotype Ae の HBV 感染が増加しつつある。genotype A は抗体産生が芳しくないため、成人期の感染であるにもかかわらず持続感染率が高く、成人の B 型急性肝炎は慢性化しないという我が国の常識は覆された。STD の意味合いが強いため、ハイリスク群に対する HB ワクチンの啓蒙が必要であろう。また、成人期に感染した HBV キャリアの発癌率については不明であるが、IFN などの反応性が高いため積極的な治療によって発癌を防止すべきであろう。

参考文献

- 1) <http://www.who.int/emc-documents/hepat...yo20022/disease/>
- 2) Hwei C-M, et al: Hepatitis B vaccination and hepatocellular carcinoma rates in boys and girls. *JAMA* 284: 3040-3042, 2000.
- 3) Sugauchi F, et al: Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology* 124: 925-932, 2003.
- 4) 厚生統計協会: 人口動態. 国民衛生の動向 50: 40-64, 2003.
- 5) Yoshizawa H: Characteristics of hepatocellular carcinoma in Japan. *Oncology* 62: 8-17, 2002.
- 6) 肝癌追跡調査委員会: 第 15 回全国原発性肝細胞癌追跡調査報告, 日本肝癌研究会事務局, 2002.
- 7) Beasley RP, et al: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Lancet* ii: 1129-1133, 1981.
- 8) 住山景一郎ほか: 小児期の B 型肝炎ウイルスの疫学調査. *日児誌* 90: 2132-2138, 1986.
- 9) Nishiguchi S, et al: Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic active hepatitis C and cirrhosis. *Lancet* 357: 196-197, 2001.
- 10) Ikeda K, et al: Interferon decreases hepatocellular carcinogenesis in patients with cirrhosis caused by hepatitis B virus. A pilot study. *Cancer* 82: 827, 1998.
- 11) 清澤研道ほか: Lamivudine 治療は B 型肝炎の自然経過を修飾するか. B 型・C 型肝炎の病態と治療 (犬山シンポジウム記録刊行会編), p3-9, アークメディア, 2003.



Differential gene alteration among hepatoma cell lines demonstrated by cDNA microarray-based comparative genomic hybridization

Kazunori Kawaguchi, Masao Honda, Taro Yamashita, Yukihiro Shirota, Shuichi Kaneko *

Department of Gastroenterology, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, Kanazawa, Japan

Received 17 January 2005

Abstract

We assayed chromosomal abnormalities in hepatoma cell lines using the microarray-based comparative genomic hybridization (array-CGH) method and investigated the relationship between genomic copy number alterations and expression profiles in these hepatoma cell lines. We modified a cDNA array-CGH assay to compare genomic DNAs from seven hepatoma cell lines, as well as DNA from two non-hepatoma cell lines and from normal cells. The mRNA expression of each sample was assayed in parallel by cDNA microarray. We identified small amplified or deleted chromosomal regions, as well as alterations in DNA copy number not previously described. We predominantly found alterations of apoptosis-related genes in Hep3B and HepG2, cell adhesion and receptor molecules in HLE, and cytokine-related genes in PLC/PRF/5. About 40% of the genes showing amplification or loss showed altered levels of mRNA ($p < 0.05$). Hierarchical clustering analysis showed that the expression of these genes allows differentiation between α -fetoprotein (AFP)-producing and AFP-negative cell lines. cDNA array-CGH is a sensitive method that can be used to detect alterations in genomic copy number in tumor cells. Differences in DNA copy alterations between AFP-producing and AFP-negative cells may lead to differential gene expression and may be related to the phenotype of these cells.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Microarray-based comparative genomic hybridization; Hepatocellular carcinoma; α -Fetoprotein

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies worldwide [1]. Among the factors implicated in the etiology of HCC are infection with hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV), dietary aflatoxin, alcohol consumption, and exposure to chemical carcinogens [2–4]. Alterations in genomic DNA copy number are key genetic events in the development and progression of human cancers, including HCC [5–7].

Comparative genomic hybridization (CGH) is a highly specific molecular cytogenetic approach that allows positional identification of gains and losses of DNA sequences throughout the entire genome [8–12].

CGH is based on the use of competitive fluorescence in situ hybridization (FISH) on normal chromosome spreads of differently labeled total genomic DNA from appropriate control and tumor tissue [13]. CGH, however, is unable to detect DNA copy number changes within narrow regions of chromosomes, and alterations of <1 Mb are difficult to detect [14].

Microarray-based CGH (array-CGH) was developed to detect genome-wide alterations in tumor samples by Pinkel et al. using cDNA microarray slides [14–16]. This technique has enabled rapid surveys of known copy number alterations in tumor samples, but resolution can be hampered when only small regions of the genome are amplified [17,18]. Using cDNA clones instead of BAC or PAC clones as probes, however, would make it possible to directly detect amplification and deletion

* Corresponding author. Fax: +81 76 234 4250.
E-mail address: skaneko@medf.m.kanazawa-u.ac.jp (S. Kaneko).

of copy numbers of individual genes. Moreover, using cDNAs arrayed on slides would enable parallel measurements of mRNA levels, which may reveal the degree to which variation in gene copy number contributes to variation in gene expression in tumor cells [19,20]. We previously analyzed the alterations of mRNA expression in hepatoma cell lines using an in-house cDNA microarray [21,22], and we showed that α -fetoprotein (AFP)-producing and AFP-negative hepatoma cell lines had different gene expression profiles [23].

In this study, we assayed chromosomal abnormalities in hepatoma cell lines using the cDNA array-CGH method and investigated the relationship between genomic copy number alterations and mRNA expression profiles in these hepatoma cell lines.

Materials and methods

Cell lines and cells. We used three positive control cell lines: the HL-60 promyelocytic leukemia cell line, the IMR-32 neuroblastoma cell line, and the RCF-26 hepatoma cell line, which contain amplified copy numbers of the *c-myc*, *N-myc*, and luciferase genes [24–26]. Five AFP-producing hepatoma cell lines: Huh7, Hep3B, HepG2, PLC/PRF/5, and Huh6; two AFP-negative hepatoma cell lines: SK-Hep1 and HLE; two non-hepatoma cell lines: HeLa and KMBC (bile duct cancer cell derived) were used for gene expression profiling and analysis of genomic copy number alterations. As a reference sample in these microarray experiments, we used peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy volunteers and a SV40-T antigen-immortalized normal human hepatocyte cell line (THLE-5b) [27].

cDNA clones and sequence verification. The cDNA microarrays used in this study were made in collaboration with Hitachi Software Engineering (Yokohama, Japan), using an SPBIO2000 robotic arraying machine. The cDNA clones used for making microarrays were selected from UniGene cluster (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>), and most of them were obtained from the IMAGE Consortium libraries (<http://image.llnl.gov/>) through Research Genetics (Huntsville, AL). Each microarray contained a total of 1080 cDNA clones, consisting of 930 unique sequence-verified clones and four housekeeping genes. The 930 clones included 141 apoptosis-related genes, 99 cell cycle-related genes, 154 cell–cell interaction-related genes, 198 cytokine and growth factor genes, 123 oncogenes, 81 transcription factor genes, 26 DNA repair-related genes, 93 stress response-related genes, and 87 hematology-related genes. Polymerase chain reaction (PCR) products from the clones were prepared and printed onto glass slides as previously described [28,29].

Copy number analyses by cDNA microarrays. CGH experiments on cDNA microarrays were performed using a modification of a previously described procedure [30]. Nuclei were isolated from cells and dissolved in “hypotonic buffer,” consisting of 10 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dichlorodiphenyltrichloroethane-1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT), and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Following digestion in proteinase K in the presence of SDS, genomic DNA was isolated by phenol–chloroform extraction. From each sample, 20 μ g of genomic DNA was sonicated for 10 min and digested for 32 h with *DpnII* (New England Biolabs, Beverly, MA), followed by phenol–chloroform extraction. Each digested hepatoma cell line or positive control DNA was labeled with Cy5-dUTP (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), and each normal DNA was labeled with Cy3-dUTP (Amersham-Pharmacia) using a Bioprime Labeling Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Briefly, digested sample DNA was mixed with 15 μ g

random octamers in a total volume of 41 μ l reaction buffer, heated at 100 °C for 5 min, and chilled on ice. Five microliters of 10 \times dNTPs (i.e., 1.2 mM each of dATP, dGTP, and dCTP, and 0.6 mM dTTP), 3 μ l Cy5-dUTP or Cy3-dUTP, and 1 μ l Klenow fragment were added to the DNA and then incubated at 37 °C for 2 h. Reactions were stopped by adding 5 μ l of 0.5 M EDTA, pH 8.0, and labeled probes were purified on a Microcon 30 column (Millipore, Bedford, MA). Thirty micrograms of human Cot-1 DNA (Invitrogen), 100 μ g yeast tRNA (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), and 20 μ g poly(A) (Sigma–Aldrich) were added as blocking reagents and then the samples were concentrated to 12 μ l. 2.55 μ l of 20 \times SSC and 0.45 μ l of 10% SDS were added, and each 15 μ l sample was heated at 100 °C for 90 s and then used as a hybridization probe for the DNA-spotted slides. The slides were covered with glass coverslips (22 mm \times 22 mm), fixed in a Hybridization Cassette (TeleChem, Sunnyvale, CA), and hybridization was performed at 70 °C for 12 h. The slides were washed in 2 \times SSC, 0.03% SDS at 70 °C for 5 min, 1 \times SSC at 70 °C for 5 min, and 0.2 \times SSC at room temperature for 5 min.

Expression analyses by cDNA microarrays. Total RNA was isolated using a ToTally RNA Kit (Ambion, Austin, TX), and mRNA was isolated from total RNA samples using a MicroPoly(A)Pure Kit (Ambion), according to the manufacturer's instructions. RNA prepared from THLE-5b cells was used as a reference for all cDNA microarray analyses. Fluorescently labeled cDNA probes were made from 2 μ g aliquots of mRNA by reverse transcription using oligo(dT) primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Labeling and hybridization were performed as previously described [23].

Imaging and analyses. Fluorescence intensities generated by the Cy5 and Cy3 probes immobilized on the microarray slides were measured by a laser confocal microscope equipped with a scanning system (ScanArray 5000, GSI Lumonics, Billerica, MA) with appropriate excitation and emission filters. The fluorescence images for Cy5 and Cy3 were scanned separately and stored for image analysis using ImaGene Ver. 3.0 Software (BioDiscovery, Marina del Rey, CA). The signal intensity of each spot was corrected by subtracting background signals in the immediate vicinity, and each Cy5/Cy3 ratio was calculated using global normalization. Clones with a copy number ratio >1.80 were considered to be amplified and those with a ratio <0.55 were considered to be deleted. Over- and underexpression of mRNAs used the same ratios.

Southern hybridization. Genomic DNAs from each cell line and PBMCs were digested overnight with the appropriate restriction enzyme, electrophoresed in 0.8% agarose gels, transferred onto Hybond-N⁺ nylon membranes (Amersham-Pharmacia), and hybridized with a ³²P-labeled probe previously shown to be amplified or deleted in our array-CGH experiments, according to the standard method [31,32].

Statistical analysis. BRB-Array Tools Ver. 3.1.0 (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) were used to compare gene amplification in AFP-producing and AFP-negative hepatoma cell lines. Genes showing significant differences were determined by univariate significance test, with a threshold of $p < 0.05$, using a randomized variance model. Hierarchical clustering was performed using centered genes and correlations were determined using average linkage analysis.

Results

Establishment of a sensitive CGH analysis of cDNA arrays

To evaluate the reliability of our CGH method using cDNA microarray slides, we first assayed our positive control cell lines, IMR-32, HL60, and RCF-26, which are known to have amplified copies of *c-myc* (HL60), *N-myc* (IMR-32), or luciferase (RCF-26) [24–26]. Using