<原 著>

肝臓におけるアヒルB型肝炎ウイルス DNA の組み込み

横須賀 収* 小俣 政男* 今関 文夫*

Yi-Zhong Zhou** 奥田 邦雄*

要 旨: 中国啓東県産のアヒル23羽を用い、肝内及び血中アヒルB型肝炎ウイルス DNA (DHBV DNA) を Southern blot 法及び spot hybridization 法にて検索した。検索した23羽中16羽(70%)に DHBV DNA が検出された。1羽のアヒルに肝細胞癌がみられ、Southern blot 法により癌部にウイルス DNA の組み込みが明らかにされた。1羽に腺腫がみられたが、腫瘍部、非腫瘍部ともウイルス DNA は検出されなかった。

DHBV 感染アヒルには進行した肝病変を含む種々の病変がみられたが、非感染アヒルには進行した肝病変はみられなかった。

本論文はアヒル肝臓中に DHBV DNA の組み込みの存在する事を示すはじめての報告である。

索引用語: DHBV DNA hepatocellular carcinoma (肝細胞癌) アヒル
integrated DNA 慢性肝炎

結 言

B型肝炎ウイルス感染は肝病変と密接な関連を有している。しかしながら、B型肝炎ウイルスは感染する宿主が限られている事及び細胞培養が未だ成功していない事により、肝病変との因果関係を研究する事は困難であった。近年、B型肝炎類似ウイルスが、ウッドチャック¹⁾、ground squirrel²⁾、アヒル³⁾に存在する事がみだされた事により、B型肝炎類似ウイルスにより肝疾患が如何に起こってくるかを検索する道が開けはじめた。

小俣らは既に中国啓東県産アヒルに肝臓を含む種々の肝疾患がみられる事⁴⁾、更に DHBV 陽性血清を生後まもないアヒルに投与する事によりウイルス持続感染状態が起こる事⁵⁾を報告した。

又肝臓について、これまでヒト⁶⁻⁹⁾及びウッドチャック^{10,11)}においてはウイルス DNA が癌細胞 DNA に組み込まれている事が報告されているが、アヒル肝臓に関して未だウイルス DNA の組み込みはみだされておらず、ウイルスと発癌との関係は議論のあるところである。今回著者らは23羽のアヒル肝の新鮮凍結標本について検索したので報告する。

対象及び方法

中国啓東県産アヒル23羽(1歳~3歳)を対象とし、血清及び肝組織を検索した。肝組織は一部は採取後直ちに凍結し-80℃に保存し、肝内 DNA の検索に用い、一部は10%ホルマリン固定後、ヘマトキシリン-エオジン染色、digested PAS 染色、Azan-Mallory 染色を行ない光顕的検索を行なった。

肝組織よりの DNA の抽出及び検索は既報⁵⁾の如く行なった。即ち、³²P クロニ化 DHBV DNA を用いて Southern blot hybridization 及び spot hybridization 後オートラジオグラフィーを行ない Sakura PD 10 デンシトメーターにて測定した。血清 DNA の検索は100 μ l 相当の血清をプロナーゼ-SDS 処理後、フェノールにて抽出し同様に spot hybridization 法にて検索した。

結 果

1) 血清及び肝内ウイルス DNA

血清 DHBV DNA の検索により22羽のアヒル中9羽(41%)に DHBV DNA が検出された。更に肝内 DHBV DNA の検索を行なう事により23羽中16羽(70%)に DHBV DNA が検出された (Table 1)。

2) 肝組織学的検索

組織学的検索により、脂肪肝3例、cyst 1例、非特異性変化4例、CPH 様変化9例、CAH 様変化6例が

* 千葉大学医学部第1内科(千葉)

** 中国科学院 上海生物化学研究所(上海)

<受付日60年7月3日>

Table 1 DHBV DNA in liver and serum and histology of the liver in 23 Chitung ducks.

Histology	Total	Positive for serum DHBV DNA	Positive for serum and/or liver DHBV DNA
CAH-like ^{a)}	6	4/6 (67%)	6/6 (100%)
CPH-like ^{b)}	9	3/8 (38%)	5/9 (56%)
NSC ^{c)}	4	2/4 (50%)	2/4 (50%)
Others		0/4 (0%)	3/4 (75%)
Cyst	1		
Fatty liver	3		
Total	23	9/22(41%)	16/23(70%)

a) chronic active hepatitis-like

b) chronic persistent hepatitis-like

c) non-specific changes

Fig. 1 Photomicrograph of the liver tumor in a duck, showing macrotrabecular hepatocellular carcinoma (H & E, ×100).

検索された。進行した肝病変 (CAH 様変化) は感染アヒル16羽中6羽にみられたが、非感染アヒル7羽中には1羽もみられず、すべて DHBV に感染している事が明らかにされた (Table 1)。

2羽のアヒルに腫瘍が認められた。1羽は肝全体の半ば以上を占める腫瘍であり、光顕的検索により好酸性の細胞質と著明な核小体を有する悪性細胞が macrotrabecular 型の配列をしており肝細胞癌と考えられた (Fig. 1)。又1羽は白色の小結節状の腫瘍であり、光顕的検索では良性と考えられる bile duct adenoma であった (Fig. 2)。

3) 腫瘍組織内 DHBV DNA

肝細胞癌を有するアヒルのウイルス DNA の検索により、DHBV DNA は血清及び肝組織に検出された。肝細胞癌部の Southern blot 法による解析により、未

Fig. 2 Macroscopic view of a duck liver with bile duct adenoma (arrow).

消化 DNA には高分子領域にスミア状に DHBV DNA が認められたが (Fig. 3, lane 1), 制限酵素消化により3.0kbより重い分子の領域に数本の明らかなバンドが認められ (Fig. 3, lanes 2, 3), 肝癌細胞 DNA の specific site へのウイルス DNA の組み込みが示唆された。非癌肝組織には大量の遊離型ウイルス DNA が認められた (Fig. 3, lanes 4~6)。一方 bile duct adenoma においては腫瘍部、非腫瘍部ともに DHBV

Fig. 3 Southern blot hybridization of hepatocellular carcinoma (lanes 1 through 3) and non-neoplastic liver (lanes 4 through 6) in the same duck as Fig. 1. Lanes 1 & 4; uncut, lanes 2 & 5; EcoRI digested, and lanes 3 & 6; Hind III digested.

DNA は検出されなかった。

考 案

既に小俣⁹⁾は中国啓東県産アヒルに肝癌を含む様々な肝疾患がみられる事を報告したがその報告においては肝組織の新鮮凍結標本が得られなかった事により肝内ウイルス DNA の検索は出来なかった。今回、血清及び肝組織内 DHBV DNA を検索する事により、以前の血清のみの検索に比し、この地区のアヒルは70%と高率に DHBV に感染している事が明らかにされた。しかしながら、肝病変を有するアヒルがすべて DHBV に感染しているわけでない事^{4,13)}及び肝癌を有するアヒル肝に DHBV DNA の組み込みがみられなかった事¹²⁾、実験室内感染でない事等より、肝疾患特に肝癌の病因として DHBV 感染が果たす役割りに関して疑念が持たれていた。

今回の検索において DHBV に感染しているアヒルにのみヒトの慢性活動性肝炎と同様の進行した肝病変がみられ、非感染アヒルには軽度の炎症細胞浸潤はみ

られたが著明な線維化や小葉構造の改変を伴う進行した肝病変はみられなかった。更に肝癌と bile duct adenoma の腫瘍部、非腫瘍部の DHBV DNA の検索により肝癌部にウイルス DNA の組み込みがみられたのに対し、bile duct adenoma では腫瘍部、非腫瘍部共にウイルス DNA は検出されなかった。これらの成績はアヒルにおいても DHBV 感染と肝疾患、肝癌とに深い関連のある事を示唆すると考えられる。

これまでヒト及びウッドチャックにおいては肝細胞癌中にウイルス DNA が組み込まれている事が報告されている⁶⁻¹¹⁾が、アヒル肝癌中にはウイルス DNA の組み込みはみだされていなかった。即ち Marion らは2羽のアヒル肝癌の検索を行なったがウイルス DNA の組み込みをみだす事が出来なかったと報告している¹²⁾。しかしながら Marion らの肝癌組織標本は種々の理由で肝内 DNA の検索には不適當（特に変性が強い）であった (Marion, 私信)。今回著者らはアヒル肝癌にウイルス DNA が組み込まれている事を明らかにしたが、これはヒトやウッドチャック同様アヒルにおいてもウイルスと肝癌とに関連のある事を示唆するものである。

このように、ヒト、ウッドチャック更にアヒル肝癌にB型肝炎類似ウイルス DNA が組み込まれている事は明らかにされたが、ウイルスの組み込みが肝癌発癌に直接関係するか否かについては未だ明らかでない。ウイルス DNA の組み込みによる発癌機構としてウイルス組み込み部位が特異的な部位におこる事、或いはウイルス DNA 中に oncogene が存在する事、或いはウイルス DNA の一部がプロモーターの役割りを果たし oncogene の近傍に組み込まれた場合に発癌の起こる可能性がある事等が考えられるが現在までこれらの可能性は実際に存在するという明らかな証拠は得られていない。又肝癌中にウイルス DNA の組み込みがみられる1つの可能性として、random site に組み込まれたウイルス DNA が全く関係のない原因で発癌の生じた場合に monoclonal に細胞増殖が起こり、Southern blot 法では明らかにし得なかった組み込み DNA が顕在化してくる可能性もある。Rogler ら¹³⁾は非癌肝疾患肝より抽出した DNA をクローニングする事により組み込み DNA がみられた事を報告しており、非腫瘍性の肝より抽出した DNA に対してもクローニングして調べる必要があると考えられる。

ウイルスによる発癌機構と直接的な関係の無いアフラトキシンや化学発癌剤による癌にウイルス DNA の

組み込みが検出されるか否か興味深い。今後は実験室内での発癌条件を設定する事が重要と考えられる。

謝辞：本研究の一部は難治性肝炎研究班研究費及び科学研究費一般研究（B）58480215，がん特A59010029によった。

文 献

- 1) Summers J, Smolec J, Snyder R: A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4533—4537, 1978
- 2) Marion PL, Oshiro LS, Pegnery DC, et al: A virus in Beechy ground squirrels that is related to hepatitis B virus on humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2941—2945, 1980
- 3) Mason WS, Seal G, Summers J: Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 36: 829—836, 1980
- 4) Omata M, Uchiumi K, Ito Y, et al: Duck hepatitis B virus and liver diseases. *Gastroenterol* 85: 260—267, 1983
- 5) Omata M, Yokosuka O, Imazeki F, et al: Transmission of duck hepatitis B virus from Chinese carrier ducks to Japanese duckings: A study of viral DNA in serum and tissue. *Hepatol* 4: 603—607, 1984
- 6) Marion PL, Salazar FH, Alexander JJ, et al: Polypeptides of hepatitis B virus surface antigen produced by a hepatoma cell line. *J Virol* 32: 796—802, 1980
- 7) Chakraborty PR, Ruiz-Opazo N, Shouval D, et al: Identification of integrated hepatitis B virus DNA and expression of viral RNA in an HBsAg producing human hepatocellular carcinoma cell line. *Nature (Lond.)* 286: 531—533, 1980
- 8) Brechot C, Poucel C, Louise A, et al: Presence of intergrated hepatitis B virus sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature (Lond.)* 286: 533—535, 1980
- 9) Edman JC, Gray P, Valenzuela P, et al: Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell. *Nature (Lond.)* 286: 535—538, 1980
- 10) Summers J, Smolec JM, Werner BG, et al: Hepatitis B virus and woodchuck hepatitis virus are members of a novel class of DNA viruses. *Viruses in naturally occurring cancers. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation*, eds. Essex M, Todaro G, zur Hausen H. Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 7: 459—470, 1980
- 11) Mitamura K, Hoyer BH, Ponzetto A, et al: Woodchuck hepatitis virus DNA in woodchuck liver tissues. *Hepatol* 2: 47s—50s, 1982
- 12) Marion PL, Knight SS, Ho B-K, et al: Liver disease associated with duck hepatitis B virus infection of domestic ducks. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 898—902, 1984
- 13) Rogler CE, Summers J: Cloning and characterization of intergrated woodchuck hepatitis virus sequences from chronically infected liver tissue. *Hepatol* 3: 875, 1983

Integration of duck hepatitis B virus DNA in duck hepatocellular carcinoma —State of duck hepatitis B virus DNA in liver tissue—

Osamu YOKOSUKA*, Masao OMATA*, Fumio IMAZEKI*, Yi-Zhong ZHOU**
and Kunio OKUDA*

The state of duck hepatitis B virus (DHBV) DNA in liver and serum was studied in 23 ducks from Chi-tung county in China by the Southern blot and spot hybridization techniques. In 16 of 23 (70%), DHBV DNA was detected in serum and/or in liver tissue. One DHBV DNA seropositive duck had a large hepatocellular carcinoma. Southern blot analysis clearly demonstrated integrated DHBV DNA in neoplastic tissue, and abundant episomal DHBV DNA in non-neoplastic tissue of the liver. In one duck with a small adenoma, no viral DNA was detected in tumor or non-neoplastic tissue. These infected ducks showed a variety of pathological changes including advanced chronic disease in the liver. In contrast, none of the virus free ducks had advanced hepatic changes.

These results suggest that DHBV behave like human and woodchuck hepatitis viruses as relates to chronic liver disease and hepatocellular carcinoma.

* First Department of Medicine, Chiba University School of Medicine (Chiba)

** Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences (Shanghai)