

図2 Con A投与量と血中GPT値の関連

り関連

Con A (mg/kg)	GPT (KU/l)	
	雄マウス	雌マウス
0	60 ± 20 (n=5)	36 ± 7 (n=5)
10	108 ± 51 (n=9)	158 ± 37 (n=9)
20	153 ± 52 (n=10)	837 ± 229 (n=10) **
30	817 ± 487 (n=10)	2478 ± 534 (n=12, 4 died) **
40	984 ± 953 (n=5)	ND

* p<0.05, ** p<0.01

図3 Con A投与量と肝組織像の関連

Con A (mg/kg)	n	Inflammatory Activity			
		A0	A1	A2	A3
0	雄マウス	3	3		
	雌マウス	3	3		
10	雄マウス	3		3	
	雌マウス	4		4	
20	雄マウス	4		4	
	雌マウス	4		2	2
30	雄マウス	4		3	1
	雌マウス	5		1	3

図4 Con A投与後の血中TNF- α 、INF- γ 産生量における性差

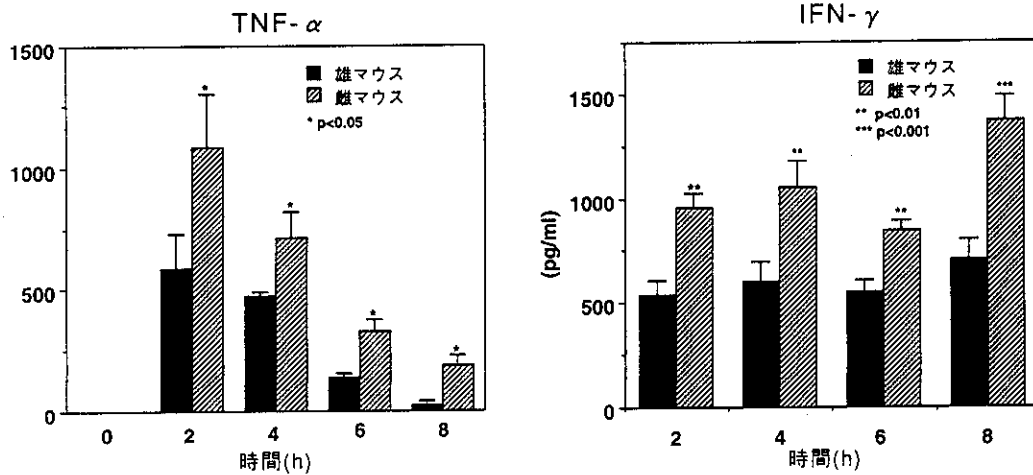
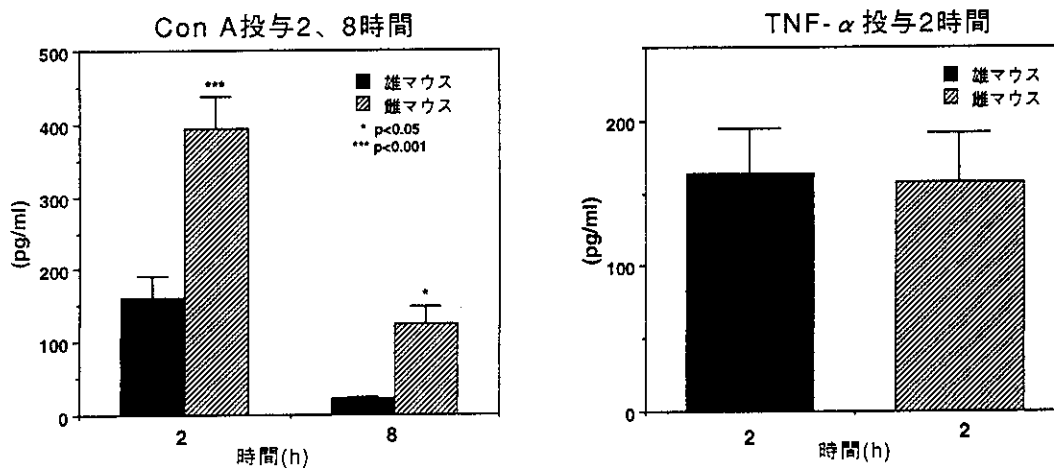


図5 Con A、TNF- α 投与後の血中MIP-2産生量における性差



Ⅲ. 劇症肝炎

平成十年度 劇症肝炎報告（総括）

佐藤 俊一

I. 全国調査

1. 全国集計：1997年度には劇症肝炎104例（急性型43例，亜急性型61例）が集計された。救命率は急性型39.5%，亜急性型17.5%，全体として25.0%であった。成因の頻度は，A型2.9%，B型31.7%，IgM HBc抗体陰性B型18.3%，非A非B型26.9%，薬剤性0.6%，成因不明9.6%であった。HCVマーカー陽性2例，HGV RNA陽性1例，TTV DNA陽性6例であった。治療法は，血漿交換が90%，ステロイドが73%，持続血液濾過透析が66%に施行された。

'93～'97年の5年間では，451例が集計され，救命率は急性型43.5%（93/214），亜急性型12.2%（29/237），全体で27.1%で，'83～'87年，'88～'92年の各5年に比し急性型の救命率が改善した。最近5年間は成因でIgM HBc陰性B型を加えたHBV関連が40%を占めることが明かになり，IgM HBc陽性のB型の45%が性行為感染で，IgM HBc陰性のB型の60%がキャリアからの発症であることが判明した。最近5年間の治療法では特殊組成アミノ酸製剤が減少し，ステロイドが増加した。

2. 急性肝炎重症型の劇症化予測に関する prospective study：1997年より重症肝炎の登録システムを開始し，劇症肝炎の予後予測と急性肝炎重症型の劇症化予測に関する prospective studyを行った。劇症肝炎が22例登録され，武藤の予後予測式の死亡予測精度は感度91%，特異度46%，正診率68%であった。急性肝炎重症型は66例が登録され，29%が劇症化した。与芝らの予測式の予測精度は感度88%，特異度27%，正診率43%であった。今回登録された症例をもとに新たに多重ロジスティックモデルを行い，有意の説明変数として年齢，血清総ビリルビン，プロトロンビン時間が選択された。この式の劇症化予測精度は，感度68.4%，特異度91.5%，正診率84.9%であった。

II. 個別研究

1. 劇症肝炎の病態：佐藤会員は血清可溶性TNF- α とそのリガンドのTNF-R1比は劇症肝炎の肝の重症度を反映し，予後判定のマーカーとして有用であることを示した。各務協力者はHBV transgenic mouseで，CTLの産生するサイトカイン量は肝障害度と関連しないが，抗ウイルス効果とは関連することを示し，CTL移入によっておこる炎症の程度がサイトカイン以外の因子に

て規定されることを示した。沖田協力者は劇症肝炎患者でTh1（TNF- α ，IL-2）は高値を，Th2（IL-10）は低値を示し，このアンバランスが免疫反応亢進を生じ，治療としてIL-10投与の理論的根拠を示した。滝口協力者はHLA-A24の結合モチーフに合致する合成ペプチドにてHBV特異的CTLの誘導を試み，C蛋白由来とP蛋白由来のそれぞれ2つのペプチドを誘導出来た。藤原協力者は劇症肝炎の広汎性肝壊死には活性化macrophageが関連するが，実験的にosteopontinの増殖がmacrophageの肝浸潤に先行して生じ，これがchemokine networkにおいて中心的役割を担っていることを示した。小原会員はHBs Ag，HBc Agの組織染色では細胞質に遺伝子が存在しているにもかかわらず，染色されない組織領域が認められ，ウイルス遺伝子の存在とタンパク質発現制御機構が劇症化の原因の一つである可能性を示した。坪内協力者は初代培養ラット肝細胞でHGFがトロンボポイエチンの調節因子であることを示した。森脇協力者はGalN/TNF- α 肝障害は，TNF- α により誘導されるアポトーシスは肝細胞がGalNによりsensitizeされることが必要であり，それにはTNF-R1の誘導およびラジカルの関与が示唆された。

2. 肝炎ウイルス：佐藤会員は，劇症肝炎36例の成因ウイルスを検討し，HBV10例，非A非B非C型20例で，GBV-Cはみられず，TTVは14例（39%）に陽性であった。TTVは新しいプライマーにて検討を要することを述べた。藤原協力者は劇症肝炎で血清TTV-DNA量が血清ALT活性と一致して変動した例を示し，TTVは劇症化の成因の可能性を示唆した。

三田村協力者は劇症肝炎56例中59%にTTVの関与をみ，他の肝疾患の24～38%に比し有意に高率であった。肝組織で18%に検出され，さらなる検討を要すると述べた。横須賀協力者はHAVの全塩基配列を決定した。また劇症肝炎などの重症肝炎と急性肝炎のヌクレオチド変異の検討からA型肝炎の重症化はHAV 5' NTR，2B領域との関連がある可能性を示した。坪内協力者は非A非B型急性肝不全7例中6例に血清中HBV-DNAが陽性で，HBV関連が高いことを示した。岡上協力者はHBV既感染者のHBV DNAの検出を行ない，肝組織，末梢血単核球，血清にも組み込まれており，HBVは組み込まれた状態と潜伏感染の状態の二つの形で存在していることを示した。林協力者は非A非B非C型劇症肝炎患者の肝組織中に10例中に6例にPCR法にてヘルペスウイルスHHV-6を検出し，肝障害への関与が考えられた。

3. 診断と治療：渡辺協力者は脳浮腫の予知，早期診断に役立つ呼気中アンモニア測定装置の開発経過を述べた。箱崎協力者はHBVによる劇症肝炎でウイルスや細

胞に対する基礎免疫に係わるmannose-binding proteinが生死の予後予測に役立つことを示した。賀古協力者は特に亜急性型救命率の向上には血漿交換に血液濾過透析を加えることの有用性を示した。森脇協力者はアデノウイルスベクターを介したHNF-4遺伝子導入はスーパー肝細胞の確立に有用であり、人工肝の開発の基礎を示した。与芝会員は劇症肝炎の予知と阻止について述べたが、治療としてはHBVキャリア例では抗ウイルス剤と免疫抑制療法が有用であることを示した。

劇症肝炎およびLOHFの全国調査

岩手医科大学・第一内科 佐藤 俊一

協同研究者：鈴木一幸，滝川康裕

遠藤龍人，岩井正勝

はじめに

1997年度劇症肝炎成人例の全国調査，1993年から1997年までの最近5年間の劇症肝炎成人例および遅発性肝不全（LOHF）の集計結果を報告する。

対象と方法

日本消化器病学会および日本肝臓学会の評議員が所属する313施設に対し毎年アンケート調査を行い劇症肝炎およびLOHFの臨床データを集め，背景因子，成因，合併症，臨床検査成績，治療法，救命率について解析を行った。劇症肝炎については，本年度新たに行った1997年度の調査結果の解析および1993年から1997年までの5年間のまとめを行い，1983年から1992年の10年間と比較検討した。LOHFについては，1993年から1997年までの5年間の35例について同時期の劇症肝炎と比較検討した。

結 果

1. 1997年度劇症肝炎

104例が集計されたが，急性型43例，亜急性型61例と例年に比し亜急性型の比率が高かった。例年と同様に亜急性型が急性型に比して約10才高令で救命率が低い傾向を示した（表1）。成因はA型が2.9%と少ないのに対し，B型およびIgM anti-HBc（-）B型が多く両者を合計したHBV関連劇症肝炎は全体の50%にのぼった（表2）。HCV（HCV抗体あるいはHCV RNA陽性）は2例のみで検出され，血液製剤使用前にGBV-C/HGV RNAが陽性を示したのは1例のみであった。また，TTV DNAは非A非B型のうち6例で検出された。HBV carrierからの発症は18例あったが，6例はIgM

HBcが陽性（うち5例が亜急性型），12例が陰性（うち11例が亜急性型）であった。治療法では血漿交換が90%，ステロイドが73%，持続濾過透析が66%に施行された。

2. 1993年から1997年の劇症肝炎

1993年から1997年の5年間では451例が集計された。それ以前に比し背景因子では亜急性型の比率が高く，HBV carrierの頻度が高かった（表3）。年齢 median [25-75 percentile] は，A型47 [35-58] 才，B型45 [30-55] 才，IgM anti-HBc（-）B型52 [43-64] 才，非A非B型55 [35-64] 才，薬剤性56 [42-64] 才，成因不明55 [45-70] 才であった。A型は1983-1987年の3.9%に比し1988年以降は約10%に増加し，B型，IgM anti-HBc（-）B型はいずれもこの5年間は1988-1992年に比し増加傾向を示した。非A非B型は1988-1992年よりはやや低下したが，依然として30%以上を示した（図1）。臨床病型別の成因は，急性型ではA型およびB型が，亜急性型では非A非B型およびIgM anti-HBc（-）B型が主体で，この傾向に変化はなく，しかも亜急性型でIgM anti-HBc（-）B型の増加傾向が認められ（図2）。1995年より推定感染源の調査を行ったが，回答が得られたうちB型の45%が性行為感染（配偶者がHBV carrierなど），IgM anti-HBc（-）B型の59%がHBV carrierからの発症であった。薬剤性は46例（10.2%）で，亜急性型が多く，男女ほぼ同数，救命率は26%であった。約1/4がD-LST陽性により診断された（表4）。原因薬剤では抗生剤，消炎鎮痛剤が多かった。治療法は血漿交換がほぼ90%に施行され，近年導入された持続濾過透析はすでに55%に施行されていた。1988-1992年に一時減少したステロイドは近年は増加傾向を示した（表5）。おもな合併症（感染，腎不全，DIC，消化管出血）のうち消化管出血は近年減少傾向にあるが，腎不全は増加傾向を示した。合併症の数が増加するほど救命率が低下する傾向には変わらないが，1983-1987年に比し1988年以降は2-3合併症の救命率が改善する傾向を示した。全体の救命率は急性型が近年有意に改善したのに対し，亜急性型はむしろ低下する傾向を示した（図3）。成因別にみると，各成因で救命率に大きな変化はみられなかった（図4）。急性型の救命率は急性型に占めるA型の頻度と比較的強い相関（ $r=0.60$ ， $p=0.019$ ）を示した。

3. 1993-1997年のLOHFの集計

最近5年間にLOHF35例が集計された。女性が多く，年齢やHBV carrierの比率は劇症肝炎亜急性型にほぼ同じで救命率は極めて低かった（表6）。成因は非A非B型が37.0%と最も多く，ついでIgM anti-HBc（-）

B型20.0%であった。臨床検査成績はAST, ALT上昇の程度が低く, PT, HPTが保たれる反面, T.Bil.が高くAFPの上昇も軽度であった(表7)。死亡例の臨床経過を劇症肝炎と比較すると, 昏睡発現から死亡までの日数はLOHFが8 [4-9] (median[25-75 percentile])日, 劇症肝炎急性型が8 [4-16]日, 劇症肝炎亜急性型が12 [6-25]日と大きな差がないのに対し, 黄疸から昏睡発現までの日数はそれぞれ69 [48-101]日, 1 [0-3]日, 12 [7-19]日とLOHFが極めて長かった。

考 察

劇症肝炎の年間発生数は1989年¹⁾, 1995年²⁾ともにほぼ1000例と推定され減少傾向がみられていないが, 本年度の調査でも例年とほぼ同数の104例が集計された。本年度も含め最近の5年間の特徴として亜急性型, B型およびHBV carrierからの発症が多いことがあげられた。B型の増加の原因は明らかではないが, 感染経路としては性行為が主体と考えられており³⁾, 今回の調査でもこれを裏付ける結果となった。一方, HBV carrierからの発症の増加は亜急性型におけるIgM anti-HBc (-) B型の比率の増加に反映しており, 救命率も低く重大な問題と思われた。HBV carrierからの発症は初感染と異なり発症前から医療の管理下にあることが多いため, 劇症化を予知・予防しうる可能性があり, 発症の誘因や初期症候, 臨床検査上の特徴など詳細な検討が必要と考えられた。初感染にしろcarrier発症にしろ発症予防にはHBV carrierの管理が重要である。母子感染対策によりcarrier率は低下したものの, HBV関連劇症肝炎は今後も大きな課題である。救命率は全体としては1989-1992年が最も高く, 最近の5年間はやや低下した。その主な原因は亜急性型の増加と亜急性型そのものの救命率の低下にあると考えられ, その要因の1つとして発症年齢の高齢化が考えられた。急性型は救命率が向上したがその大きな要因の一つとして, 本来予後の良いA型の占める頻度が増加した点が考えられた。一方, 合併症の数が2-3の症例の救命率が向上している点は, 全身管理や合併症の管理など

治療法の向上の成果と考えられ, 今後この点を客観的に評価していく必要があると思われる。特殊治療ではステロイドの使用が再び増加しており, とくに1997年では73%に達した。ステロイドの有効性はいまだ明らかにされておらず^{4, 5)}, 今後は使用の有無のみならず使用方法に関しても検討が必要と考えられる。また, 血漿交換に加え持続濾過透析が急速に普及しており, その評価に当たっては救命のみならず目的とする昏睡覚醒効果, サイトカイン除去, 脳浮腫予防など広い観点から検討する必要があると思われる。LOHFに関しては, 従来いわれているように, 女性, 高齢者に多く, 非A非B型が主体で救命率が極めて低い点が再確認された。また, 臨床検査成績ではtransaminaseの上昇が軽度で凝固能が比較的保たれる反面, T.Bil.が高値を示すなど亜急性型に類似する所見を示す一方, AFPやhHGFが劇症肝炎急性型よりも低い傾向を示すなど特徴的な所見も明らかになった。また, 臨床経過では昏睡前の黄疸の時期が著しく長い特徴があり, 疾患概念や病型分類の整理も含めて今後さらに検討が必要と考えられた。

参考文献

- 1) 松下 寛: 劇症肝炎, 急性肝炎, 慢性肝炎, 肝硬変, 肝細胞癌の罹患率に関する研究昭和47年度難治性肝炎全国疫学調査成績補遺。厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究班 昭和50年度研究報告書。P23, 1975.
- 2) 森 満, ほか: 難治性の肝疾患の全国疫学調査成績。厚生省特定疾患に関する疫学研究班(班長 大野良之), 平成8年度研究業績集, 1997, p23.
- 3) Fagan EA, et al.: Fulminant hepatitis B in successive female sexual partners of two anti-HBe-positive males. *Lancet* 2:538, 1986.
- 4) 与芝 真: 多施設協同体制による劇症肝炎の治療。 *Minophagen Medical Review* 40:156, 1995.
- 5) 鈴木一幸, ほか: 劇症肝炎の予後と治療法との関連。 *日消誌*95:124, 1997.

表1 1997年劇症肝炎の背景因子

	急性型(43)	亜急性型(61)
男:女	18:25	33:28
年齢 (mean±s.d.)	45.0±15.0	54.0±16.0
基礎疾患(%)	20.9	15.3
基礎疾患(%) (HBV carrierを含む)	25.6	34.4
救命率(%)	39.5	14.8

表2 1997年劇症肝炎の臨床病型別、成因別予後と頻度

成因	急性型		亜急性型		全体(%)		救命率(%)
	生存	死亡	生存	死亡			
A型	1	1	0	1	3	2.9	33.3
B型	10	16	0	7	33	31.7	30.3
IgM HBc (-) B型	1	2	5	11	19	18.3	31.6
非A非B型	3	6	1	18	28	26.9	14.3
薬剤性	1	0	1	9	11	10.6	18.2
不明	1	1	2	6	10	9.6	30.0
計	17	26	9	52	104	100	25.0

表3 1993-1997年の劇症肝炎の背景因子：1983-1992年との比較

	'83-'87	'88-'92	'93-'97	計
症例数	507	377	451	1335
急性型/亜急性型	272/235	198/179	214/237	684/651
基礎疾患(%)	40.6	22.7	21.2	10.4
HBV carrier (%)	7.9	9.0	13.6	10.4
救命率(%)	22.9	29.4	27.1	26.1

図1 劇症肝炎の成因の変遷

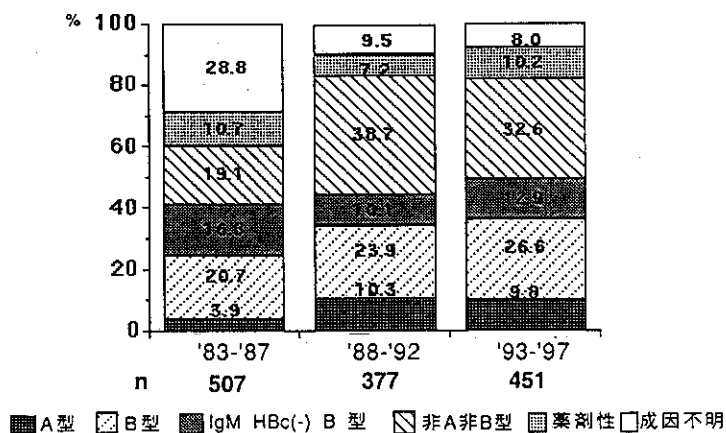


図2 劇症肝炎の臨床病型別成因の変遷

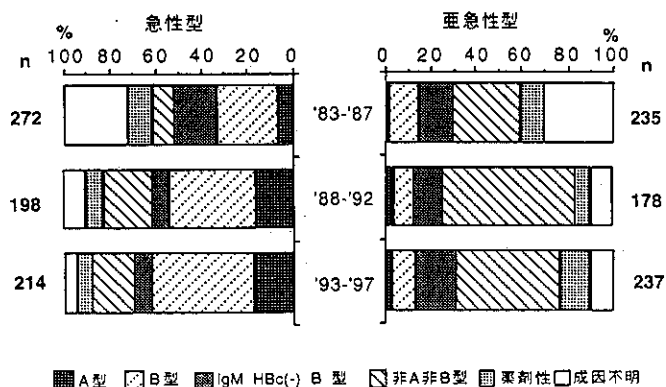


表4 1993-1997年薬剤性劇症肝炎

症例数	46
急性型/亜急性型	15/31
男/女	25/21
診断根拠: 例数 (%)	
D-LST陽性	11 (23.9)
臨床経過	14 (30.4)
偶然の再投与	1 (2.2)
不明	20 (43.5)
救命率: %	
全体	26.1
急性型	53.3
亜急性型	12.9

表5 1983-1997年の劇症肝炎の治療法の変遷

	'83-'87	'88-'92	'93-'97
ステロイド	57.2	46.5	62.6
G-I療法	84.4	84.5	70.6
特殊組成アミノ酸	83.0	89.6	75.6
血漿交換	79.9	84.5	88.5
持続濾過透析	-	-	55.8
プロスタグランディン	-	46.3	37.2
インターフェロン	4.2	14.8	15.5
サイクロスポリンA	-	8.9	15.4
抗凝固療法	56.6	75.6	67.9

図3 劇症肝炎の救命率の変遷

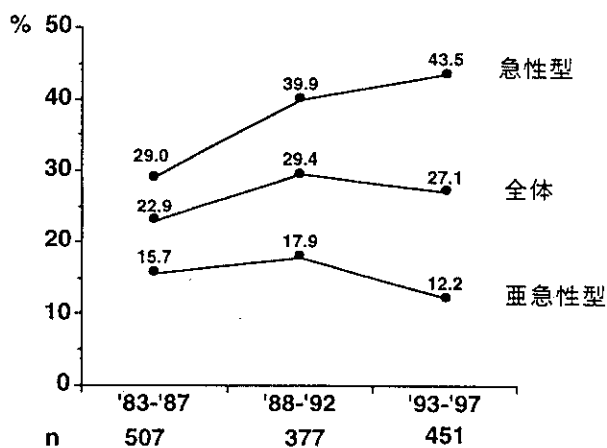


図4 劇症肝炎の成因別救命率の変遷

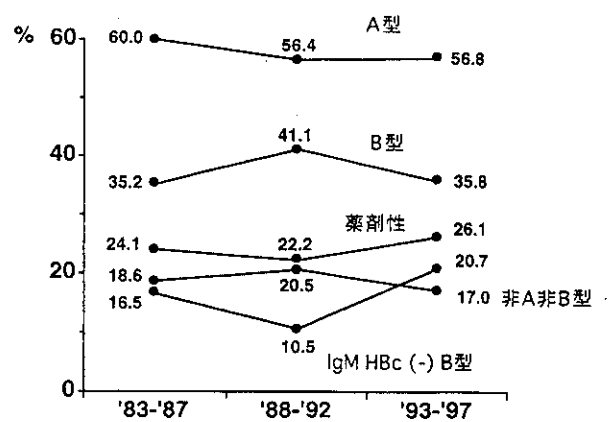


表6 1993-1997年のLOHFの臨床背景：同時期の劇症肝炎との比較

	急性型	亜急性型	LOHF
例数	214	237	35
男/女	105/109	113/124	11/24
年齢 (mean±s.d.)	46±16	52±16	52±15
基礎疾患(%)	18.8	21.2	29.4
HBV carrier (%)	8.1	18.5	18.2
救命率(%)	43.5	18.5	14.3

表7 1993-1997年のLOHFの臨床検査成績：同時期の劇症肝炎との比較

	急性型	亜急性型	LOHF
T.Bil. (mg/dl)	9.6±7.2	21.0±10.2	24.3±14.9
D/T比	0.59±0.15	0.62±0.19	0.62±0.13
AST (IU/l)	2360 [764-4609]	355 [159-839]	79 [51-157]
ALT (IU/l)	2849 [1430-5148]	392 [156-793]	74 [35-110]
albumin (g/dl)	3.3±0.5	3.0±0.5	3.0±0.6
PT (%)	17±11	26±14	30±10
HPT (%)	16±12	20±13	26±13
NH3 (μg/dl)	150 [98-219]	118 [86-172]	118 [69-156]
AFP (ng/ml)	8 [3-23]	25 [7-110]	6 [5-55]
hHGF (ng/ml)	3.1 [2.0-8.5]	2.8 [1.8-6.7]	1.8 [1.0-2.7]
白血球数 (/mm ³)	12100±12000	9600±7800	13500±9100
血小板数 (/mm ³)	122500±119500	135900±95900	90400±48800

mean±s.d.
median [25-75percentile]

劇症肝炎および急性肝炎重症型の子後に関するprospective study

岩手医科大学・第一内科 佐藤 俊一
協同研究者：鈴木一幸，滝川康裕
遠藤龍人，岩井正勝

はじめに

劇症肝炎の子後予測および急性肝炎重症型の劇症化の予知に関しprospectiveに検討する事を目的とした。

対象と方法

岩手医大第一内科を事務局として、1997年9月より日本消化器病学会および日本肝臓学会の評議員の所属する全国の313施設を対象として劇症肝炎あるいは急性肝炎重症型の発症時点での症例登録を開始した。登録時点での臨床データをもとに予後（劇症肝炎では死亡確率、急性肝炎重症型では劇症化確率）を予測し、追跡調査によって予測式の有効性を確認する方式でprospectiveな検討を行った。劇症肝炎の予後予測には武藤の式¹⁾、急性肝炎重症型の劇症化の予測には与芝の式²⁾および武藤の式の応用式を用いた（表1）。また、今回登録された急性肝炎重症型のデータをもとに劇症化例と非劇症化例の臨床背景や臨床検査成績の比較を行い、さらに変数選択方による多重ロジスティック解析により劇症化予測の新しい式を作成した。

結 果

1. 劇症肝炎の子後予測

1998年12月の時点で予後登録が完了し、診断基準に適合する劇症肝炎は22例（急性型例、亜急性型例、救命11例、死亡11例）であった。武藤の式による予後予測のsensitivityは90.9%、specificity45.5%、validity 36.4%、accuracy 68.2%であった。

2. 急性肝炎重症型の劇症化予測

与芝の式による劇症化予測のsensitivityは87.5%、specificity 27.3%、validity 14.1%、accuracy 43.3%であった。武藤の式の応用式による劇症化予測のsensitivityは87.5%、specificity 68.9%、validity 56.4%、accuracy 73.8%であった。

3. 急性肝炎重症型の劇症化に関する検討

急性肝炎重症型として登録された80例のうちPTの値などから適格な症例は70例であった。そのうち1998年12月の時点ですでに転帰が登録された66例について臨床背景、成因、臨床検査成績を比較した。66例中19例（29%）が劇症化し、劇症化例は有意（ $p < 0.05$ ）に年齢が高かった（表2）。劇症化した例の

PT40%以下確認から昏睡発現までの日数は2 [1-7] (median [25-75th percentile]) 日であった。成因では劇症化例では非A非B型52.6%を占め、非劇症化例では非A非B型が23.4%、HBV初感染が21.3%、HAVが19.1%であった（表3）。臨床検査成績では劇症化例でT.Bil.が高値、PTが低値以外は有意の差を認めなかった（表4）。これらの背景因子および臨床検査成績をもとに変数選択による多重ロジスティック解析を行ったところ、有意の説明変数として年齢、T.Bil.、PTが選択され（表5）、予測式は $\text{lamda} = \text{logit}(p) = 0.0914 \times \text{年齢} + 0.1255 \times \text{T.Bil.} - 0.1534 \times \text{PT} - 2.7469$ となった。この式を対象例に当てはめるとsensitivityは68.4%、specificity 91.5%、validity 59.7%、accuracy 84.9%であった。

考 察

劇症肝炎においては肝移植以外に有効な治療法が発見されていない³⁾ことから、救命が困難と考えられる症例では早期に移植を前提とした治療体制をとることが救命につながる。このためには早期にしかも的確に予後を予測する必要がある。一方、急性肝炎の段階で劇症化を予知し早期に集中治療を開始することにより劇症化を阻止することが可能であれば、劇症肝炎による死亡の減少に最も効果的な手段になりうると考えられる。これらの観点から、劇症肝炎の予後予測および急性肝炎重症型の劇症化予測のprospective studyを行った。劇症肝炎の予後予測式は全国集計をもとにすでに武藤により報告され、肝移植適応基準にも応用されているため、これを用いて検討した。その結果、90.9%という高いsensitivityが得られ、accuracyも68.2%を示したことから、移植候補を拾い上げて早期に準備を開始するという目的に合致した満足すべき成績と思われる。急性肝炎重症型の劇症化予測に関しては与芝の式および武藤の劇症肝炎の予後予測式を応用して検討した。与芝の式はsensitivityは87.5%と高かったが、specificityは27.3%と低く予後予測式としては不十分と考えられた。これに対し武藤の応用式はsensitivity 87.5%、specificity 68.9%、validity 56.4%と比較的高い有用性が得られた。全国規模で急性肝炎重症型の臨床データが得られたのは今回が初めてのため、このデータをもとに急性肝炎重症型の実体を把握するとともに、研究班独自の劇症化予測式を作成した。急性肝炎重症型の劇症化率は29%で、劇症化した例ではその75%がPT40%以下確認から1週間以内に昏睡が発現した。また、劇症化例では非劇症化例に比して高齢で、T.Bil.が高く、PTが低いことが判明した。新たに作成された予測式では年齢、T.Bil.、PTが選択され、

specificityの高い予測式が得られた。今後は、この予測式と武藤の応用式を用いてさらにprospectiveに検討を進める必要があると思われる。

究報告. p44, 1994.

2) 与芝 真, ほか: 劇症肝炎の早期診断と早期治療。厚生省特定疾患難治性の肝疾患調査研究班 平成九年度研究報告. p75, 1998.

3) Mas A, Rodes J. Fulminant hepatic failure. Lancet 1997; 349:1081-1085.

参考文献

1) 武藤泰敏, ほか: 平成四年劇症肝炎全国集計。厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究班 平成五年度研

表1 武藤の予後予測式

$$\lambda = \text{logit}(p) = -0.0649 \times \text{PT}(\%) + 0.0357 \times \text{年齢} - 2.81 \times \text{DT/TB} + 0.703 \times \ln(\text{T.Bil.}) + 1.04 \times \text{OCD}$$

DT/TB : D.Bil./T.Bil

OCD : 発症-昏睡期間 (10日以内 : 0, 11日以上 : 1)

予測死亡確率 (p) = 1 / (1 + e^{-λ})

表2 急性肝炎重症型の臨床背景：劇症化の有無による比較

	劇症化	非劇症化
例数	19(29%)	47(71%)
年齢	61[46-65]	41[28-50]*
性(M/F)	11/8	26/21
基礎疾患(%)	17.6	20.0
発症-PT<40%期間	14[4-28]	6[4-15]

表3 急性肝炎重症型の成因：劇症化の有無による比較

	劇症化	非劇症化
HAV	0 (0.0)	8 (21.1)
HBV (初感染)	3 (17.6)	5 (13.2)
HBV (キャリア)	3 (17.6)	7 (18.4)
HCV	1 (5.9)	1 (2.6)
nonA-E	7 (41.2)	7 (18.4)
薬剤	2 (11.8)	3 (7.9)
不明	1 (5.9)	7 (18.4)
計	17 (100)	38 (100)

例数 (%)

表4 急性肝炎重症型の臨床検査成績：劇症化の有無による比較

	劇症化 (19)	非劇症化 (47)	P
total bilirubin (mg/dl)	17.1 [5.3-22.4]	7.9 [4.8-14.3]	<0.05
D/T比	0.69 [0.59-0.79]	0.66 [0.58-0.75]	0.313
prothrombin time (%)	26 [20-34]	32 [25-36]	<0.05
AST (IU/l)	593 [299-2813]	875 [267-4140]	0.407
ALT (IU/l)	856 [391-3909]	960 [413-4740]	0.686
cholinesterase* (IU/l)	107 [44-150]	97 [25-163]	0.767
albumin (g/dl)	3.4 [3.0-3.4]	3.3 [2.9-3.8]	0.704
白血球数 (/ml)	7300 [5700-10600]	6700 [4800-8700]	0.295
血小板数 (×10 ⁴ /mm ³)	13.3 [8.3-17.5]	14.8 [11.0-17.1]	0.332

median[25-75 percentile]

* : 正常値 135-413 IU/l に換算した値

表5 急性肝炎重症型の劇症化予測の多重ロジスティックモデル

	b	S.E.	p	r	Exp(b)
年齢	0.0914	0.0292	0.0018	0.313	1.096
T.Bil	0.1255	0.0441	0.044	0.278	1.1337
PT	-0.1534	0.0531	0.039	-0.283	0.8578
定数	-2.7469				

当科における劇症肝炎の成因ウイルスの再検討

岩手医科大学・第一内科 佐藤 俊一
 協同研究者：鈴木一幸，滝川康裕
 石川和克，阿部弘一
 岩井正勝，遠藤龍人

はじめに

我が国における劇症肝炎（FH）の約90%は肝炎ウイルスが原因であるが，そのうち40%はいわゆる非A非B型肝炎ウイルス（NANB）によるものと考えられている¹⁾。

HCVの発見以来，HCVはNANB肝炎の原因ウイルスとして最も重要なウイルスであるが，原因不明のFHに占めるその頻度は10%以下と少ない。さらに，G型肝炎ウイルス（GBV-C/HGV）がNANB肝炎の原因ウイルスとして同定され，原因不明のFHにおいて陽性率が高いことより，注目された²⁾。しかし，GBV-C/HGV陽性例の多くは，過去に輸血歴をもつ例あるいは血漿交換の際に大量の血液製剤を投与した後にGBV-C/HGVが陽転化した例であり，さらに入院時GBV-C/HGVが陰性で治療後に陽転化した例でも，GBV-C/HGVはその後の臨床経過に影響を及ぼさないことから，FHの原因ウイルスとしての可能性は極めて低いものと考えられる³⁻⁶⁾。したがって，現時点では，NANBのFHの大部分は依然としてその原因ウイルスが不明である。

最近，新しいDNAウイルスであるTTウイルス（TTV）が原因不明の輸血後急性肝炎例の血清中から見いだされた⁷⁾。TTVは献血者でも比較的高い陽性率を示すが，原因不明の急性肝炎，慢性肝炎および肝硬変例などでは約半数に陽性を示すことより，TTVは新たな肝炎ウイルスとして注目されている⁸⁾。さらに最近，新たなprimerを用いてTTV-DNAを検討すると，極めて高率に陽性を示すことが報告され，TTVについても再検討が求められている⁹⁾。

そこで今回，当科で経験したFHについて成因が明らかかな例を含めてGBV-C/HGVとTTVを測定しその感染頻度を検討した。なお，今回TTV-DNAの検出に用いたprimer

は岡本らの方法によった⁸⁾。

対象と方法

対象は，1988年1月から1998年12月までに当科で入院加療を受けたFH36例である。FHの成因は血清学的に診断した。すなわち，HAVはIgM-HA抗体が陽性のもの，HBVはIgM-HBc抗体が陽性またはHBs抗原またはHBV-DNAが陽性のもの，HCVはHCV-RNAが陽性のものとした。薬剤が否定されこれらいずれもが陰性のものをNANBNCとした。なお，GBV-C/HGVおよびTTVの測定には，血液製剤が投与されていない入院時の血清を用いて行った。

結 果

FH36例の成因は，HAV 2例，HBV10例，HCV 1例，NANBNC20例，薬剤性3例であった。GBV-C/HGVは全例陰性であり，TTVは14例（39%）に陽性であった（表1）。TTVの陽性はNANBNCで最も多く（9例；45%），HBVの3例（30%），薬剤性の2例（67%）にみられ，これらTTV陽性例のうち3例（NANB 1例，HBV 2例）は輸血の関与が考えられた（表2）。

FHの経過とTTV-DNA量（半定量）の関係については，FHの死亡2例ではいずれも持続的にTTV-DNAが陽性を示し，かつ末期にはその量が増加していた。一方，生存3例では1例は肝機能の改善と共にTTV-DNA量は低下し陰性化した。他の2例は肝機能が正常化した後もTTVは持続的に陽性を示したが，TTV-DNA量は不変であった。いずれの例も発症前のTTV-DNAが不明であるため，持続陽性例については初感染なのか否かについての判断は難しいものと考えられる。

考 案

最近，FHでは血清学的にウイルスマーカーが陰性でも，PCR法によって血清または肝組織中を検索すると，肝炎ウイルスの存在を証明出来る例が少なからず報告されている¹⁰⁾。とくにHBV感染では宿主の過剰な免疫反応によって急激に広汎な肝細胞壊死が生じてウイルスが急速に排除されるため，血清中のウイルス量は微量であり，通常の測定法ではその抗原あるいは抗体を捉えることが出

来ないためと考えられている。われわれの症例では、HBVによるFHは10例（初感染が8例，キャリアからの発症2例）であったが，全例血清学的にHBVの診断が可能であった。また，今回，NANBNCと診断された20例ではHBV-DNA（S領域のプライマーを用いたPCRにより測定）はいずれも陰性であった。肝組織中でのRCRによるHBVの検索は行っていないが，現時点ではB型である可能性は少ないものと考えている。

TTVの感染経路は，岡本ら⁸⁾によれば，献血者の12%にTTV-DNAが陽性を示すことから，B型，C型あるいはG型と同じように輸血などの血液を介した感染経路が第一に考えられる。さらに，TTV-DNA陽性者の糞便中にもTTV-DNAを同定できることから，A型あるいはE型と同じように経口感染による経路も考えられる。我々の症例で輸血による感染経路が考えられたのは3例であり，残りの11例は感染経路は不明であった。

最近，我々はTTVが陽性を示す非A-非G型FH例の発生地域が陰性の非A-非G型FH例に比べてある地域に偏っている可能性があることを指摘した¹⁰⁾。一般住民においてもTTV陽性率は日本のみならず世界的に地域差がみられる^{11) 12)}ことから，疫学的にTTV感染の既往を示すTTV抗体の測定を行って各地域におけるTTV感染率を調べるとともにTTV-DNA陽性のFH例についての詳細な感染経路を検索することが必要と考えられる。

肝細胞障害の成立には宿主の免疫反応とともにウイルス側の要因が密接に関連している。最近，HBVの変異と重症な肝障害の発生機序との関連が指摘されている。とくにプレコア領域，コア領域あるいはコアプロモータ領域の変異がFHではしばしば認められ，一方，通常の経過を辿る急性肝炎ではほとんどこれらの変異が認めないことが明らかにされてきている^{13) 14)}。これらの変異はウイルスの抗原性を変化させ，過剰な免疫反応を惹起し，その結果として高度の肝障害を生じせしむるものと考えられる。GVC-C/HGVにおいてFHではある特定の塩基配列に変異を認める可能性が高いことが指摘されている¹⁵⁾が，この点については未だ確定していない。一方，TTV-DNAの遺伝子解析より，TTVは二つのジェノタイプに分類され，また少なくとも4つのサブタイプに分かれるものと考えられている⁸⁾。これらの違いがウイルスの生物学的反応性を変えるか否かについては明らかでないが，TTV-DNAの陽性率は非A-非G型急性肝炎とFH例では同程度であることより，急性肝炎とFHにおけるTTVのジェノタイプおよびサブタイプの違いについて検討することが必要と考えられる。

これまでの検討では，TTV陽性と陰性のFHでは臨床的特徴ならびに予後に差異を認めていない。しかし，検討した症例数が少なく，TTVによるFHの予後が他の肝炎ウ

イルスと異なるか否かについては今後多数例での検討が必要であろう。

参考文献

- 1) 佐藤俊一，鈴木一幸，滝川康裕，他：過去12年間（昭和58年～平成6年）における劇症肝炎の全国実態調査報告 厚生省特定疾患難治性の肝疾患調査研究班，平成7年度研究報告書1996：85-88。
- 2) Yoshida M, Okamoto H, Mishihiro S, et al: Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown aetiology. *Lancet* 1995; 346:1131-1132.
- 3) Kuroki T, Nishiguchi S, Tanaka M, et al: Does GBV-C cause fulminant hepatitis in Japan? *Lancet* 1996; 347: 908.
- 4) Miyakawa Y, Mayumi M: Hepatitis G virus-A true hepatitis virus or an accidental tourist? *New Engl J Med* 1997; 336:795-796.
- 5) Kanda T, Yokosuka O, Ehata T, et al: Detection of GBV-C RNA in patients with non-A-E fulminant hepatitis by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Hepatology* 1997; 25:1261-1265.
- 6) 佐藤俊一，鈴木一幸，石川和克，他：劇症肝炎におけるGBV-C/HGVの関与 第20回犬山シンポジウムG型肝炎，肝炎ウイルス重感染，B型およびC型肝炎 中外医学社 東京1998：31-36。
- 7) Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al: A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241:92-97.
- 8) Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, et al: Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology* 1998; 10:1-16.
- 9) Takahashi K, Hoshino H, Ohta Y, et al: Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepatology* 1998; 12:233-239.
- 10) 鈴木一幸，岡本宏明，小野寺 誠，他：TTV-DNA陽性および陰性劇症肝炎例における発生地域の差異 肝臓 1998; 39:410-411.
- 11) Charlton M, Adjei P, Poterucha J, et al: TT-virus infection in north america blood donors, patients with full 626-1629. minant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 1998; 28:839-842.
- 12) Simmonds P, Davidson F, Lycett C, et al: Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood

products. Lancet 1998; 352:191-195.

- 13) Omata M, Ehata T, Yokosuka O, et al: Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. N Engl J med 1991; 324:1699-1704.
- 14) Sato S, Suzuki K, Akahane Y, et al: Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. Ann Intern Med 1995; 122:241-248.
- 15) Heringlake S, Osterkamp S, Trautwein C, et al: Association between fulminant hepatic failure and a strain of GBV virus C. Lancet 1996; 348:1616-1629.

表1. 当科における劇症肝炎の成因別頻度とGBV-CおよびTTVの陽性率

成因(例数)	GBV-C	TTV(%)
HAV(2)	0	0(0)
HBV(10)	0	3(30)
HCV(1)	0	0(0)
NANBNC(20)	0	9(45)
Drug(3)	0	2(67)
計	0	14(39)

表2. TTV陽性例の内訳

症例	性	年齢	臨床病型	成因	輸血歴	転帰
1	M	56	FHa	HBV	+	D
2	M	57	FHa	HBV	-	D
3	M	29	FHa	HBV	+	A
4	M	62	FHs	Drug	-	D
5	F	12	FHa	Drug	-	A
6	M	34	FHa	NANBNC	-	D
7	F	49	FHs	NANBNC	-	D
8	F	37	FHs	NANBNC	-	D
9	F	39	FHa	NANBNC	-	A
10	F	66	FHs	NANBNC	+	D
11	M	61	FHa	NANBNC	-	D
12	F	55	FHs	NANBNC	-	D
13	F	56	FHa	NANBNC	+	A
14	M	63	FHa	NANBNC	-	A

+ FH発症前6カ月以内

劇症肝炎における血清TNF α およびTNF受容体-1の動態：重症度および予後との関連

岩手医科大学・第一内科 佐藤 俊一
協同研究者：鈴木一幸，滝川康裕
遠藤龍人，岩井正勝

はじめに

肝炎に劇症化の機序に種々の炎症性サイトカインが直接的あるいは間接的に関与していることが知られ、とくにTNF α は最も重要な因子であることが多くの基礎的検討より明らかにされている¹⁻³⁾。しかし、肝炎の経過において血清TNF α の上昇時期が肝炎発症の極めて早期に限られるため、臨床例でその上昇を的確に捉えることが難しい場合が多い。TNF α はそのレセプターであるTNF受容体(TNFR)との結合を介してアポトーシスから細胞死に至るシグナルを伝達する⁵⁾。TNFRにはtype1(TNFR1)とtype2(TNFR2)の2種類があるが、細胞内領域にdeath domainをもつTNFR1がより重要な役割を果たしていることが指摘されている⁴⁾。臨床的に、劇症肝炎(FH)の病態下ではTNF α とTNFRとの不均衡が生じていると考えられるが、実際に両者の動態を詳細に検討した報告は少ない⁵⁾。我々もこれまでに血清TNF α とTNFRの動態について検討してきたが⁶⁾⁷⁾、今回、両者の血中動態の観察がFHの病態把握とくに重症度の判定および予後の判定に有用か否かを検討した。

対象と方法

当科で経験した急性肝炎(AH)24例、急性肝炎重症型(AHS)24例およびFH16例を対象とした。入院時と治療後に血清可溶性TNF α およびTNFR1を経時的に測定(ELISA)してTNF α /TNFR1比を求め、各臨床病型別および成因別の差異、予後との関連を検討した。さらに肝機能および血液生化学検査との関連を検討した。

結 果

1. 入院時の血清可溶性TNF α およびTNFR1およびTNF α /TNFR1比 [median (25-75percentile)]
各臨床病型別に検討すると、血清TNF α は各臨床病型で差はないが、血清TNFR1はFHでAHに比し有意の増加がみられた。またFHの急性型(FHa)と亜急性型(FHs)の比較では、血清TNF α はFHaで、血清TNFR1はFHsで高値を示した。入院時のTNF α /TNFR1比はFHでの低下がAHに比し有意であった。またFHの臨床病型別ではFHsでFHaに比し低下傾向を示した(表1)。
2. 成因との関連

AH, AHSおよびFHの成因別に血清TNF α およびTNFR1を比較すると、血清TNF α はHAVで最も高値を示し、次いでHBV, NANB (HCVを含む)、薬剤であった(HAVは他の成因と有意差あり)。また血清TNFR1も同様の傾向を示したが、各成因間では明らかな有意差は認めなかった(表2)。

3. 肝機能および血液生化学検査との関連

血清TNF α はALT, AST, CRPと有意の正の相関、血清TNFR1はALT, AST, WBC, CRP, HGFと有意の正の相関を、Albumin, PT, HPTと有意の負の相関を示した(表3)。

4. 予後との関連

FHでは救命例、死亡例とも血清TNF α , TNFR1は入院後に低下したが、血清TNFR1が高値持続あるいは再上昇を示す例は死亡した。

考案・結論

肝炎の重症化に伴って入院時に血清TNF α およびTNFR1の上昇を認めることを確認した。とくに血清TNFR1は肝細胞障害の一指標として極めて有効であり、予後の推定にも役立つことが明らかとなった。今回の成績はTNF α とTNFR1の動的バランスの破綻が肝炎の重症化に関連することを支持するものである。さらに、TNF α の増加が成因によって異なることは肝細胞障害の機序を考える上で興味深い成績と考えられる。血清TNFR1の動態を観察することは、FHの薬物療法として注目されているステロイドパルス療法や免疫抑制療法の評価を行う上でも役立つ可能性がある。

参考文献

- 1) Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, et al: Enhanced tumor necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1988; ii:72-74.
- 2) Tiegies G, Wolter M and Wendel A: Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/ endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem Pharm* 1989; 38:627-631.
- 3) Nagakawa J, Hishimura I, Hirota K, et al: Involvement of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of activated macrophage-mediated hepatitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 99:758-765.
- 4) Kimberly J, Zee V, Kohno T, et al: Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89:4845-4849.
- 5) Keane HM, Sheron N, Goka J, et al: Plasma inhibitory

activity against tumor necrosis factor in fulminant hepatic failure. Clin Sci 1990; 90:77-80.

- 6) 中館一郎, 阿部弘一, 下遠野秀文, 他: 急性肝炎, 劇症肝炎における血清可溶性tnfレセプターの測定 肝臓 1995; 36:58-59.

- 7) 中館一郎, 阿部弘一, 滝川康裕, 他: 急性ウイルス性重症肝炎における血清tnf-A, 可溶性TNFレセプターおよびICAM-1の動態とその臨床的意義 肝臓 1995; 36:649-656.

表1 各肝疾患の入院時血清sTNF α , sTNFR1, sTNF α /sTNFR1比

臨床病型	sTNF α (pg/ml)	sTNFR1(pg/ml)	TNF α /TNFR1
A H (24)	29.5 [22.0-44.5]	1457.0 [1232.5-1905.0]	1.98 [1.62-3.21]
AHS (24)	35.0 [21.5-64.5]	1908.0 [1447.0-2942.5]a	1.70 [1.20-2.33]
F H (16)	35.0 [27.5-41.5]	2716.5 [1877.5-6385.5]c	1.15 [0.62-1.83]b

a:P<0.05, b:P<0.001, c:P<0.0001 (compared with AH)

表2 成因別にみた血清TNF α , sTNFR1, TNF α /sTNFR1比

Etiology	sTNF α (pg/ml)	sTNFR1 (pg/ml)	sTNF α /sTNFR1
HAV (13)	49.0 [43.8-67.8]a,b	2046.0 [1552.0-2679.3]	2.47 [1.66-3.00]c,e
HBV (15)	32.0 [25.0-54.8]	1623.0 [1385.8-2759.0]	1.75 [1.56-2.79]d
NANB (22)	29.0 [19.0-39.0]	1976.0 [1421.0-3205.0]	1.28 [0.92-1.92]
Drug (12)	25.0 [14.0-32.5]	1741.0[1241.5-1951.5]	1.60 [1.06-1.90]
Autoimmune (2)	25.0, 24.0	1167.0, 1066.0	2.14, 2.39

a: P<0.05 (compared with HBV)

b: P<0.001 (compared with NANB and Drug)

c: P<0.05 (compared with Drug)

d: P<0.05 (compared with NANB)

e: P<0.001 (compared with NANB)

表3 血清sTNF α , sTNFR1と他の生化学マーカーとの相関

Biochemical markers	sTNF α		sTNFR1	
	Correlation coefficient	Significance (P value)	Correlation coefficient	Significance (P value)
T.Bil. (64)	0.18	NS	0.15	NS
AST (64)	0.52	0.001	0.29	0.001
ALT (64)	0.45	0.001	0.17	0.05
Alb. (64)	-0.07	NS	-0.29	0.05
HPT (62)	-0.14	NS	-0.45	0.001
PT (64)	-0.17	NS	-0.53	0.001
hHGF (53)	0.16	NS	0.46	0.001
WBC (63)	0.08	NS	0.41	0.001
CRP (60)	0.62	0.001	0.5	0.001

NS: not statistically significant

肝炎の重症度に關与する免疫学的因子の解析と免疫学的治療について

愛知医科大学・第一内科 各務 伸一

協同研究者：石川哲也

はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV), C型肝炎ウイルス (HCV) ともウイルス自体の細胞障害性はあまりなく, その肝障害は, 主に宿主免疫機構による感染細胞排除の過程で引き起こされるとされている¹⁾。その中でも, ヒトやマウス肝炎モデルにおける解析により, 肝炎ウイルス関連蛋白に対する特異的な免疫反応, 特に抗原特異的細胞障害性Tリンパ球 (CTL) が主要な役割を果たすことが示唆されている¹⁾⁻⁷⁾。ChisariらのHBVトランスジェニックマウス (TgM) を用いた肝炎モデルでは, HBs抗原特異的CTLにより惹起された炎症が, さらに非特異的な免疫反応を誘導することによって波及し, 最終的に急性肝炎, 劇症肝炎まで至ることが示されている⁸⁾。また, これらの一連の免疫反応は, TgMの肝組織中よりHBV関連抗原, 及びHBV mRNA, HBV DNAなどを排除する働きも果たしていることが示されている^{9), 10)}。このように, HBV関連抗原特異的CTLは, 炎症の成立機構, ウイルス排除機構に重要な役割を果たしており, その詳細な解析は過度の炎症の抑制, 効率よいウイルス排除などの治療に向けた示唆を与えるものと思われる。2つの機構は共にCTLの産生するサイトカインが作用することにより成立することがわかっているが^{8), 9), 10)}, サイトカインの量, あるいはサイトカインの産生パターンにより2つの機構がそれぞれどのような影響を受けるかは, 詳細には解析されていない。今回, サイトカイン産生パターン, TCR beta gene usageとも異なる8つのHBs抗原特異的CTL, 及び同一のTCRを持ちサイトカイン産生パターンも同様の6つCTL (一つのクローンのサブクローン) を用いることにより, 2つの機構の成立機序につき詳細な検討を行うことを試みた。また, これらのCTLのエピトープペプチド中に様々な変異を挿入したAPLを作製し, それらがアンタゴニストとして, 重症肝炎の治療に応用可能かについて基礎的な検討を行った。

対象と方法

HBVトランスジェニックマウス (TgM) は, 炎症の程度とサイトカイン産生パターンの関係をみるモデルとして, HBs抗原を肝細胞内に蓄積する107-5Dというストレインを, ウイルス排除とサイトカイン産生パターンの関係をみるモデルとして, HBV全遺伝子を組み込まれ, ウイルスを複製することがわかっている1.3.32というスト

レインを用いた。HBs抗原特異的CTLの移入により, 107-5Dは劇症肝炎様の重症肝炎を, 1.3.32は急性肝炎様の病態を呈することがわかっている。HBs抗原特異的CTLクローンは, TgMと同じバックグラウンドを持つB10D2 (H-2^d) をHBs抗原遺伝子組換えワクシニアウイルスにて免疫し, その後に回収した脾細胞をin vitroにて抗原特異的に刺激, さらにlimiting dilutionを施行することによって確立した。それぞれのCTLクローンのサイトカインの産生パターンは, in vitroにて 1×10^6 個のCTLを抗原特異的刺激後の培養上清中 (1ml) の各サイトカイン量 (IFN-gamma, TNF alpha, IL-2, IL-4, IL-10) をELISA法にて測定することにより検討した。HBs抗原特異的CTLのin vivoにおける効果については, 炎症の程度は 1×10^7 個 (サブクローンの場合は 5×10^6 個) のCTL静注後のマウス血中のALT値をモニターすることにより, 抗ウイルス効果はCTL投与後, 5日目のマウス肝組織中のHBV mRNA, HBV DNAを測定することにより判定した。in vivoの実験は全てtriplicateにて行った。サイトカイン産生パターンの解析に用いたCTLとマウスに投与したCTLは, 同時期に刺激をした最終刺激後5日目のものを用いた。CTLクローンの認識するエピトープ (HBs抗原の28-39番目のアミノ酸よりなるペプチド, HBs28-39, IPQSLDSWWTSL) 中に様々な変異を挿入したAPLを作製し, CTLのそれぞれに対する認識効率を通常のCTLアッセイにより検討した。また, それらのMHC(L^d)分子へのaffinityを, TAPを欠如し, L^d分子を表面に発現するRMA-S.Ld細胞を用いることにより解析した。実際のAPLのaffinityはAPLとの結合により細胞表面上で安定化されたL^d分子をfluorescenceを用いて標識し, FACSにて蛍光強度を測定することにより, 半定量した。

結 果

1. HBs抗原特異的CTLの誘導

3匹のB10D2より8個のHBs抗原特異的CTLクローン (6C2, 11B5, 11B10, 13F6, 14F7, SWB1, SWD10, B6D) を得た。それぞれのCTLクローンについてfine specificity, MHC拘束性についての検討を行い, これらのCTLクローンはすべてHBs28-39をL^d分子拘束性に認識することがわかった。また, 上記ペプチドのdose titrationにて検討した抗原の認識効率はクローン間であまり差がないことが確認された。しかし, T細胞レセプター (TCR) beta遺伝子の解析では, 異なる6種類のTCR beta遺伝子が使用されており, 誘導されたCTLクローンは単一のpopulationではないことが確認された¹¹⁾ (表-1)。また, 代表的なクローンである6C2についてはさらにリクローニングを行い, 6つのサブクローンを得た。

2. CTLクローンのサイトカイン産生と抗ウイルス効果との関係

誘導した8個のHBs抗原特異的CTLクローンはすべて、*in vitro*での特異的抗原刺激でIFN-gamma, TNF alpha, IL-10を産生したが、その産生量は各クローン間でかなりの差を認めた。IFN-gammaは、最小の14F7で60pg/ml, 最大のSWD10で16000pg/mlであった。TNF alphaは最小の11B10, 14F7で150pg/ml, 最大のSWD10で13000pg/ml, IL-10は最小の11B10で85pg/ml, 最大の6C2で28000pg/mlであった(表-2)。これら、サイトカイン産生量測定に用いたものと同時に継代したCTLを1.3.32に 1×10^7 個静注し5日目のマウス肝組織中のHBV mRNA, HBV DNAを検定した(11B5, 11B10, 14F7, SWB1, B6D)。HBV DNAはCTLクローンを静注したすべてのマウスにおいて、コントロールに比し95%以上破壊されていた。これに対し、HBV mRNAは14F7, B6Dで30%破壊されたのみで最小であったが、11B5では92%と最大であった。サイトカイン産生量の多いクローンほど抗ウイルス効果は強い傾向がみられた(図-1)。

3. CTLクローンのサイトカイン産生と炎症の程度との関係

上記と同様のCTLクローンを107-5Dに 1×10^7 個静注し、血清中ALT値をモニターすることにより炎症の程度を評価した。ほとんどのマウスで静注後2~3日目にALT値は最高値となった。最も高値をとったのはSWB1で9125IU/ml, 最低値はSWD10で795IU/mlであった。SWD10はIFN-gamma, TNF alphaの産生量では全クローン中最大であり、炎症の程度はこれらのサイトカイン産生量とは相関しないことが示された(図-2)。

6C2のサブクローンにおいても同様の解析を行った。これらは、同一のTCRを持ち、IFN-gamma, TNF alpha, IL-10の産生パターンも類似していたが、それぞれ 5×10^6 個を107-5Dに静注すると、ALT値は最高で19670IU/ml(6C2-6), 最低で1110IU/ml(6C2-5)と、かなりの差を認め、やはり、炎症の程度とサイトカイン産生量とは相関しないことが示された。また、同時に炎症の程度を規定する因子がTCRによって規定されるものでないことも示された。

4. アンタゴニストペプチドに関する検討

HBs28-39のすべてのpositionをAla(A), Tyr(Y), Glu(E), Arg(R)にて置換した48種類のペプチド、HBs28-39中のdominantなTCR認識部位である31S(position 4), 33D(position 6)をそれぞれすべての可能なアミノ酸にて置換した38種類のペプチド(一部重複)について、アンタゴニズムの検討を行った。これらの中には野生株のペプチドより L^d 分子への

のaffinityが強く、しかもCTLからは認識されないというようなアンタゴニストの候補の存在が確認された。

考案・結論

近年、B型肝炎における劇症肝炎、及び重症肝炎はウイルスの変異と関連して発症するとの報告がなされている^{12, 13}。そして、最近、劇症肝炎との関連が示唆されている、HBe抗原を産生できない変異ウイルスは、*in vitro*で野生株のウイルスに比し増殖速度が速い可能性が示された¹⁴。また、米国におけるB型劇症肝炎の肝移植の症例では、摘出肝において肝組織中にHBs抗原の蓄積がみられており⁸、これらはウイルスの増殖速度など、何らかのウイルス側の因子が肝炎劇症化に関与している可能性を示唆している。しかし、実際に炎症を引き起こすのは、宿主の免疫反応であることより、肝炎の重症度も個々の宿主の免疫反応の程度によって規定されている可能性は依然として高い。HBV TgMの肝炎モデルを用いた当実験系では、CTLの炎症の波及に対する効果、抗ウイルス効果とも、IFN-gamma, TNF alphaを媒介することが既に明らかになっており、2つの効果に関与する免疫反応の中でも、それらのサイトカイン産生量が両方の効果の発現の程度を規定していることが予想されたが、当実験での結果は当初の予測に反するものであった。

抗ウイルス効果の詳細に関しては現時点でも不明の点が多いが、HBV mRNAの一部にIFN-gammaなどで誘導される細胞内蛋白質の結合する部位があり、それによりHBV mRNAの破壊が促進されるとされている。ウイルスDNA, 他のHBV関連抗原の排除については、その機構は解明されていない。これらの機構は、CTLによる直接の肝細胞障害、あるいは二次的な炎症波及による肝細胞障害により引き起こされるものではなく、noncytolyticな機構により、つまり細胞障害の及ばない肝細胞において起こりうる現象であることが証明されている。また、今回の実験でサイトカインの産生量によりウイルスの排除の効率が規定される傾向を示したことは、今までのデータとも整合性があるものと考えられる。

HBV TgMを用いた肝炎モデルにおいては、肝炎は3つのステップを経て進展するとされている⁸。ステップ1は、抗原特異的CTLによる抗原表出肝細胞の直接障害であり、障害肝細胞はapoptosisに陥る。ステップ2は多核白血球、非特異的Tリンパ球など、非特異的炎症細胞浸潤を特徴とし、focal necrosisの形態をとる。ステップ3はステップ1により活性化されたCTLより産生されたIFN-gamma, TNF alphaなどにより活性化状態となったマクロファージにより引き起こされ、組織所見上はmassive necrosisの形態をとる。このうちステップ3は、HBs抗原を肝細胞内に蓄積する107-5Dにおいてのみ起こ

ることから、このHBs抗原を蓄積する肝細胞はこれらのサイトカインに対し、あるいは活性化されたマクロファージからの最終刺激物質に対して、脆弱性を有するものと考えられている(図-3)。抗IFN-gamma抗体、抗TNF alpha抗体のin vivo投与による肝炎の阻害試験を行うと、肝炎の程度はかなり軽減されるため、これらのサイトカインが107-5Dにおける肝炎の重症化のプロセスに関しては必須と思われる。しかし、当研究において示されたように、それらのサイトカインの量は肝炎の程度と相関関係にはなかった。これは、HBs抗原を肝細胞内に蓄積しない1.3.32においては抗IFN-gamma抗体、抗TNF alpha抗体の投与によっても炎症の程度は変わらないことと関連して、肝炎重症化に関してはサイトカインの作用以外に他の因子が重要であることを示唆する。また、CTLのTCR beta gene usageにより引き起こされる炎症の程度が異なる傾向がみられたが、同じTCR、同様のサイトカイン産生パターンを持つサブクローンを用いた実験でも惹起される炎症の程度に差がみられた。このことより、肝炎の程度はそれぞれのTCRの抗原へのaffinityによって規定されるものでもないと考えられた。以上より、肝炎の重症度はCTLの活性化の程度など、機能面の違いによって規定されていることが考えられた。その候補として、CTLの活性化状態を反映するTCR/CD3, CD8, DNAM-1, LFA-1, CD2, CD69, VLA-4などの分子の発現の程度、あるいはCD28, FasL, CD44などの表面抗原の発現の程度、膜型サイトカイン、perforin/granzymeなどの細胞内分子の発現の程度、細胞周期などに関する解析が必要と思われる。

また、アンタゴニストに関する検討より、これらが重症肝炎の治療に応用できる可能性も示された。今後、in vitroでの実際のアンタゴニズムアッセイ、TgM肝炎モデルへの投与などの検討が必要と思われる。また、アンタゴニストで刺激した場合のCTLのサイトカイン産生パターンの解析も必要と思われる。

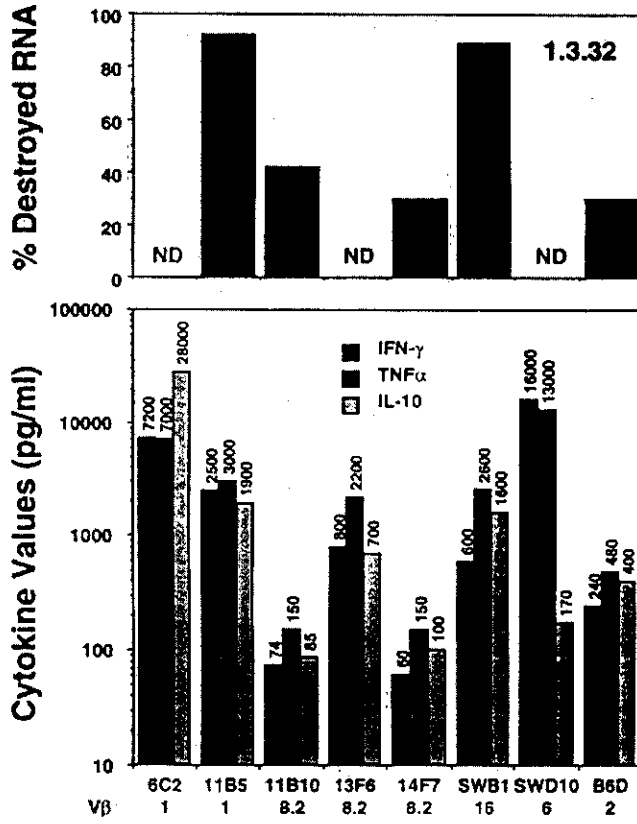
これらの検討により、CTLあるいは免疫機構による抗ウイルス作用を損なわない特異的炎症抑制療法などに向けて示唆が得られるものと考えられる。

参考文献

- 1) Chisari FV, Ferrari C: Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:29-60.
- 2) Guidotti LG, Chisari FV: To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* 1996; 8:478-483.
- 3) Chisari FV: Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease. *Hepatology* 1996; 22: 1316-1325.

- 4) Penna A, Chisari FV, Bertolotti A, et al: Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 1991; 174:1565-1570.
- 5) Missale G, Redeker A, Person J, et al: HLA-A31- and HLA-Aw68 restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis. *J Exp Med* 1993; 177:751-762.
- 6) Nayersina R, Fowler P, Guilhot S, et al: HLA A2-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1993; 150:4659-4671.
- 7) Rehmann B, Fowler P, Sidney J, et al: The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 1995; 181:1047-1058.
- 8) Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, et al: Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 1993; 178:1541-1554.
- 9) Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, et al: Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3764-3768.
- 10) Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, et al: Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4:25-36.
- 11) Ishikawa T, Kono D, Fowler P, et al: Polyclonality and multispecificity of the cytotoxic T lymphocyte response to a single viral epitope. *J Immunol* 1998; 161: 5842-5850.
- 12) Omata M, Ehata T, Yokosuka O, et al: Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med* 1991; 324:1699-1704.
- 13) Ehata T, Omata M, Chuang WL, et al: Mutations in core nucleotide sequence of hepatitis B virus correlate with fulminant and severe hepatitis. *J Clin Invest* 1993; 91:1206-1213.
- 14) Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR: Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus by the precore protein. *J Virol* 1997; 71:345-353.

☒ 1 Cytokine Profiles and Anti-Viral Effect



☒ 2 Cytokine Profiles and Disease Severity

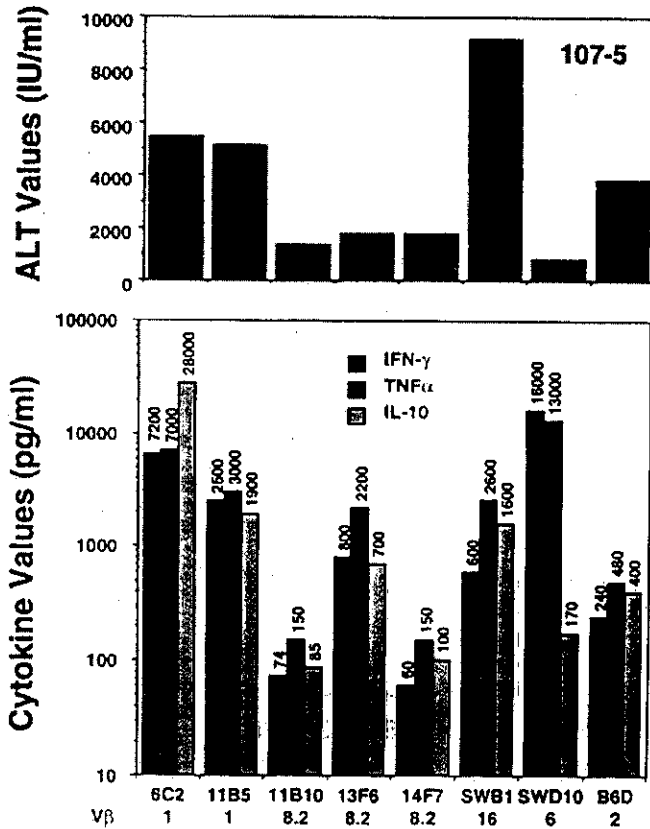


表1 TCR analysis, HBsAg-specific CTLs

Clone	V β	D β	J β
6C2	1	2.1	2.5
11B5	1	2.1	2.5
11B10	8.2	2.1	2.2
13F6	8.2	1.1	2.6
14F7	8.2	1.1	2.6
SWB1	16	2.1	2.6
SWD10	6	1.1	2.1
B6D	2	1.1	1.1

表2 Cytokine Profiles of HBsAg-Specific CTLs

CTL	V β	IFN- γ	TNF α	IL-2	IL-4	IL-10
6C2	1	7200	7000	30	<20	28000
11B5	1	2500	3000	74	<20	1900
11B10	8.2	74	150	<15	<20	85
13F6	8.2	800	2200	<15	<20	700
14F7	8.2	60	150	<15	<20	100
SWB1	16	600	2600	100	<20	1600
SWD10	6	16000	13000	100	<20	170
B6D	2	240	480	<15	<20	400

Cytokine values are expressed as pg/ml.

图3 Multistep Process of Inflammatory Liver Disease in HBV-TgM Model

