

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

LKM1抗体陽性患者におけるCYP2D6のエピトープ解析

主任研究者 西口修平 大阪市立大学第三内科

研究要旨：自己免疫性肝炎、C型慢性肝炎で検出される肝腎ミクロゾーム抗体（LKM1抗体）はチトクロームP4502D6（CYP2D6）の認識部位に相違があることが示唆された。

分担研究者

小島 典子²⁾、武田 正¹⁾、塩見 進¹⁾、
今岡 進²⁾、船江 良彦²⁾
所属 大阪市立大学第三内科学教室¹⁾、
同 老年医学研究部門生体化学分野²⁾

A. 研究目的

自己免疫性肝炎、C型慢性肝炎におけるLKM-1抗体陽性血清の認識するチトクロームP4502D6(CYP2D6)のエピトープを明らかにする。

B. 研究方法

1) MBLのELISAキットを用いて、患者さんより同意を得た上で採取させて頂いた、自己免疫性肝炎17例、C型慢性肝炎388例の血清を測定した。

2) 精製したヒト2D6をペプチド切断酵素(リシルエンドペプチターゼ)によって消化の後、電気泳動にかけ、分解されたペプチドを、アミノ酸シークエンサーにかけてアミノ酸配列を調べた。

2) 1)にて泳動したペプチドをニトロセルロース膜に転写した後、LKM1陽性血清を用いて免疫染色を行った。ただし、LKM1陽性血清は患者さんより同意を得た上で採取したものである。

3) 従来より報告されているCYP2D6のエピトープ部位2カ所に相当する合成ペプチドを作成し、これに対するLKM1陽性血清の反応をELISA法、slot blotを用いて調べた。

4) CYP2D6の基質であるbufuralolを用いてラット肝ミクロゾームのLKM1抗体陽性血清による活性阻害を検討した。

C. 研究結果

1) MBLのELISAキットを用いて、自己免疫性肝炎17例、C型慢性肝炎388例を測定したところ、自己免疫性肝炎1例(6%)、C型慢性肝炎6例(1.5%)にLKM1抗体が検出された。

2) bufuralolを用いた代謝活性阻害の検討では自己免疫性肝炎の1例のみに活性阻害が認められた。

3) ペプチド切断酵素処理後の精製ヒトCYP2D6を用いて免疫染色を行ったところ自己免疫性肝炎の1例とC型慢性肝炎の4例に321-351のエピトープとして報告されている部位を含んだペプチドに反応が認められた。

4) 合成ペプチド(256-271および、321-351)を用いた検討では、ラットの抗体を用いた場合は321-351

に対して抗体反応が認められたにもかかわらず、ELISA法、slot blotともにLKM1陽性ヒト血清では明らかな抗体反応は認められなかった。

D. 考察

C型慢性肝炎では一部の症例で、321-351の報告されているエピトープ部位を含んだペプチドに対する反応が認められたものの、自己免疫性肝炎でのLKM1抗体とは認識部位が異なる抗体であると考えられた。

E. 結論

自己免疫性肝炎、C型慢性肝炎で検出される肝腎ミクロゾーム抗体（LKM1抗体）はチトクロームP4502D6の認識部位に相違があることが示唆された。今後C型慢性肝炎におけるLKM1抗体の病態への関与について検討したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Wan, J., Imaoka, S., Chow, T., Hiroi, T., Yabusaki, Y. and Funae, Y: Expression of four rat CYP2D isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* and their catalytic specificity. *Arch. Biochem. Biophys.*1997; 348: 383-390

2) Hiroi, T., Imaoka, S., Chow, T. and Funae, Y: Tissue distribution of CYP2D1,2D2,2D3 and 2D4 mRNA in rats detected by RT-PCR. *Biochim. Biophys. Acta*1998; 1380: 305-312

3) Imaoka, S., Wan, J., Chow, T., Hiroi, T., Shigematsu, N. and Funae, Y: Cloning and characterization of the CYP2D1-binding protein, retinoldehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998; 353: 331-335

4) Chow, T., Imaoka, S., Hiroi, T. and Funae, Y: Development changes in the catalytic activity and expression of CYP2D isoforms in the rats. *Drug. Metab. Dispos.* 1999; Feb; 27(2): 188-192

5) Shuhei Nishiguchi, Tetsuo Kuroki et al : Detection of Hepatitis C Virus Antibody in the Absence of Viral RNA in Patients with Autoimmune Hepatitis. *Annals of Internal Medicine* 1992; 116: 21-25

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)

分担研究報告書

自己免疫性肝炎における各種Cytochrome P450蛋白の反応性

分担研究者 賀古 眞 帝京大学医学部附属溝口病院第四内科 主任教授

研究要旨：I型およびII型自己免疫性肝炎を対象とし、各種Cytochrome P450蛋白(CYP2D6,1A2,2C9,2E1,3A4) recombinant蛋白の反応性を検討した。対照として、ウイルス性慢性肝炎、健常者を用いた。I型自己免疫性肝炎患者血清中には、CYP2D6、1A2、2E1分子種に反応する自己抗体、II型自己免疫性肝炎患者血清中には、CYP2D6と共に、CYP3A4に反応する自己抗体も存在した。また、"HCV-associated autoimmunity"患者血清中には、LKM-1抗体が陰性でも、CYP2D6やCYP2C9、2E1、3A4分子種に反応する自己抗体が存在した。

以上のことから、AIHやhepatic autoimmunityの病態では各種のCYP分子種もimmunotargetとなっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

40種以上の第1相薬物代謝を担う酵素であるCytochrome P450 (CYP)の一部が自己免疫性肝炎や肝の自己免疫現象の標的であることが判明してきた。CYP2D6はII型自己免疫性肝炎(AIH)で検出されるLKM-1抗体の標的であり[Manns et al.1989, Zanger et al. 1988], CYP1A2はautoimmune polyendocrine syndrome type 1 [Clemente et al. 1974]で見られるAIHやある種の免疫誘導薬剤性肝炎の標的 [Homberg et al. 1984, Bourdi et al.1990]であることが判明してきた。しかしながら、CYP抗体とこれらの肝の自己免疫現象との詳細な検討はほとんどない。本研究は、human liver cDNA libraryから主要CYP geneをクローニングし、作成したrecombinant CYP2D6 蛋白と、AIHとウイルス性慢性肝炎患者血清との反応性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象

1990年より1999年まで当科および関連病院に入院した肝疾患患者のうち、I型AIH35例とII型AIH9例を対象とした。対照として、C型慢性肝炎85例(LKM-1抗体陽性24例、陰性61例)、B型慢性肝炎15例、健常者30例を用いた。

全例とも、CYP系に影響する薬剤歴や飲酒歴はない。

2. CYP2D6のクローニングと表出

ヒト肝cDNAライブラリー(Clontech, Palo Alto, CA, USA)から、Gonzalezら[7]によって報告されたCYP2D6 cDNAシーケンスを基に、forward primer(5'-GGAATTCCATGGGGCTAGAAGCAC TGGT-3', underlined: 1-20 nt)とreverse primer(5'-GTACATTAGAGCCTCTGGGC-3', 1545-1526 nt)を設定し、PCRで増幅させ、増幅産物(1.54 kb)をpUC18 vectorにクローニングした。さらに、pXa2 (Boehringer Mannheim, Germany)にリクローニン

グし、b-galactosidaseとの fusion protein を表出させた。

3. CYP2D6以外のCYP蛋白

4つのCYP1A2, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4 recombinant蛋白を準備した。

以上のCYP蛋白との反応性をImmunoblot法によって検索した。

(倫理面への配慮)被検血清として採血時に患者一人一人に、目的を良く理解してもらい、informed consentを得た。

C. 研究結果

1. 各種CYP蛋白のSDS-PAGE

5つのCYP蛋白のSDS-PAGEを7.5-10%ゲルを用いて行ったところ、CYP2D6蛋白は179 kDa、CYP1A2, 2C9, 2E1, 3A4蛋白は各々、52, 55, 52, 50 kDaのバンドとして観察された。

2. CYP2D6蛋白の反応性

B型慢性肝炎と健常者の合計45例では全例反応性を認めなかった。一方、II型AIH9例全例と、LKM-1抗体陽性のC型慢性肝炎24例中19例(79%)に反応性を認めた。さらに、LKM-1抗体陰性のC型慢性肝炎31例中2例にも反応性を認めた。陽性例はすべてinhibition testによって確認した。

3. CYP2D6以外のCYP蛋白の反応性

B型慢性肝炎と健常者の合計45例では全例反応性を認めなかった。I型AIHの1例のみCYP1A2と反応した。I型AIH2例とLKM-1抗体陰性のC型慢性肝炎3例でCYP2E1と反応した。また、II型AIHとLKM-1抗体陽性のC型慢性肝炎の各1例でCYP3A4と反応した。CYP2C9とは全例反応しなかった。

4. 間接蛍光抗体法

CYP2D6抗体陽性の28例は間接蛍光抗体法で全例とも典型的なLKM-1抗体の染色パターンを呈した。

CYP1A2, 2E1, 3A4抗体陽性と判定された8例では、LKM-1抗体とは異なる非典型的な染色パターンを呈した。

D. 考察

CYPは第1相薬物代謝系酵素として重要であるが、最近、ある種のCYPが、AIHや肝自己免疫の標的として注目されてきた。CYP2D6はII型AIHやC型慢性肝炎の一部で検出されるLKM-1抗体の主要対応抗原で、CYP1A2はautoimmune polyendocrine syndrome type 1のAIHや各種薬剤で誘導される肝炎の対応抗原として報告されている。しかしながら、本邦のAIHやウイルス肝炎を対象とした各種CYP抗体の研究は報告されていない。そこで今回、これらの肝疾患を対象として、代表的なCYP蛋白に対する反応性を検索し、免疫学的な標的になり得るかを追及した。既報と同様に[2,3,9]、II型AIH9例全例と、LKM-1抗体陽性のC型慢性肝炎の24例中19例で、recombinant CYP2D6蛋白と反応した。残りの5例は間接蛍光抗体法によるLKM-1抗体は低力価で、非典型的な染色パターンを呈した。すなわち、C型慢性肝炎におけるLKM-1抗体の対応抗原は、II型AIHのそれよりも多様性であることが示された。このことは、LKM-1抗体陽性C型慢性肝炎血清で、ラット肝マイクロゾーム分画を抗原としたImmunoblot法で、50kDaのバンドが30%にしか検出されず、59や70kDaのバンドがみられたという他の報告と一致している。一部のLKM-1抗体陽性C型慢性肝炎では、CYP2D6のみならずCYP3A4もまた反応性があり、抗原の多様性が認められた。

CYP1A2はautoimmune polyendocrine syndrome type 1でみられるAIHの標的とされ、CYP2E1はhalothane hepatitisにおける免疫学的標的として報告されている。しかしながら、今回、これらの陽性と判定された例では、かかる内分泌疾患や薬剤歴はなかった。肝マイクロゾームは多種のCYPを産生しているため、肝マイクロゾームそれ自身が一部のAIHの免疫学的標的になっている可能性が示唆された。CYP代謝に依存するある種の薬剤や環境物質がAIH発症の引金になり得る可能性がある。

II型AIHにおけるCYP2D6抗体やtifenilic acid-induced hepatitisにおけるCYP2C9抗体の臨床的意義はほぼ確立されているが、その他のCYP抗体の意義は未だ確立されていない。今回の検討ではこれらの陽性症例数は多数でないため、明確な意義は未だ見いだされていないが、少なくとも、今回、AIHやウイルス肝炎血清中に、CYP2D6や2C9以外のCYP抗体が存在することが明らかにされた。これらの自己抗体は未だ同定されていないものである。

HBV感染と比較して、HCVではクリオグロブリン血症をはじめとする自己免疫現象がより高頻度に合併する。さらに、LKM-1抗体やGOR抗体などの自己抗体の検出頻度も高い。本研究によっても、これらの現象がB型肝炎に比較して高頻度にみられることが示さ

れた。

今後、AIHやhepatic autoimmunityにおいて、肝細胞膜上の各種CYP蛋白とCYP自己抗体の産生についての明確な関連性を示す証拠を見出すことが必要である。

E. 結論

1. AIH type I患者血清中には、CYP2D6、1A2、2E1分子種に反応する自己抗体も存在した。
2. AIH type II患者血清中には、CYP2D6と共に、CYP3A4に反応する自己抗体も存在した。
3. "HCV-associated autoimmunity"患者血清中には、IF法によるLKM-1抗体が陰性でも、CYP2D6やCYP2C9、2E1、3A4分子種に反応する自己抗体が存在した。

以上のことから、AIHやhepatic autoimmunityの病態では各種のCYP分子種もimmuno-targetとなっている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表 投稿中
2. 学会発表

Miyakawa H, Kitazawa E, Kako M: Cloning and expression of human CYP2D6 gene and immunoreactivity of sera from patients with autoimmune hepatitis type II. International Symposium on Autoimmune Hepatitis. 4th Japan-DDW, Hiroshima 1999.10.30.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝炎の病態生理 - サイトケラチン 8、18の意義 -

分担研究者 西岡 幹夫 香川医科大学医学部第三内科学講座 教授

研究要旨：Anti-soluble liver antigen antibody 陽性の自己免疫性肝炎患者においてサイトケラチン 8(CK8)とサイトケラチン 18(CK18)の自己抗体が認められることがこれまでも報告されているが、抗サイトケラチン 8(CK8)抗体と抗サイトケラチン 18(CK18)抗体を定量したものは報告されていない。今回我々はこれら自己抗体を定量し、自己免疫性肝炎における抗CK8抗体、および抗CK18抗体の意義について検討した。

自己免疫性肝炎における抗CK8抗体、および抗CK18抗体活性は他の肝疾患と比較して有意に高値を示しており、また、CK8およびCK18の欠落した肝細胞を認めることから、抗CK8抗体、および抗CK18抗体は自己免疫性肝炎の病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、肝疾患に特異的な自己抗体が同定され、それにより自己免疫性肝炎(AIH)を分類する試みがなされている。我々は、抗SLA(Soluble liver antigen)抗体陽性のAIH症例において、患者血清中に抗サイトケラチン抗体の存在することを報告してきた。サイトケラチン 8(CK8)とサイトケラチン 18(CK18)は抗SLA抗体の主な対応抗原であるともいわれ、また、最近の報告でCK8およびCK18を欠損したtransgenic mouseにおいて肝細胞障害が認められることがいわれており、今回我々はCK8及びCK18 に対する特異的な自己抗体が存在し、AIHの病態に関与している可能性を報告してきた。本研究ではAIH患者血清中における抗CK8抗体、および抗CK18抗体活性を定量するためのELISA、さらに血清中のCK8及びCK18の免疫複合体の検出法を確立した。そこで、これら抗体の臨床的意義について検討した。

B. 対象と方法

本研究は、難治性肝疾患の病因究明および治療の進歩を目的とし、全ての患者に対し、その目的、内容につき説明を行った。香川医科大学附属病院において、1990年から1998年の間にAIHと診断された患者15名、平均年齢54歳（15歳から74歳）、男性1人、女性14人である。診断は、臨床症状、血液生化学検査、組織学的検査さらにAIHスコアリングシステムに基づいて行った。

1) Recombinant cytokeratin 8、およびBovine cytokeratin18を抗原としたWestern immunoblot法によるAIH患者の血清中の抗 cytokeratin 8 及び抗 cytokeratin18抗体の存在を確認した。

2) 抗CK8及び抗CK18抗体を定量するためのELISAを確立し、ステロイド・免疫抑制剤服用前のAIH患者血清さらに対照群として正常人、慢性C型肝炎患者、PBC患者について定量を行い比較検討した。また、ステロイド療法前、投与後3ヶ月から8ヶ月および1年から2年の3点での抗CK8及び抗CK18抗

体活性の推移を比較した。

3) 抗原同定のためanti-mouse CK8 monoclonal antibodyとanti-mouse CK18 monoclonal antibodyを用い、AIHおよび慢性C型肝炎生検組織に対する免疫組織染色を実施した。

4) 血清中のCK8及びCK18の免疫複合体を測定するためのELISAを確立し、AIH患者血清さらに対照群として正常人、慢性C型肝炎患者について測定し比較検討した。

C. 研究結果

1) Western immunoblot法によるAIH患者血清中における抗CK8及び抗CK18抗体の検出AIH患者3名、正常人1名の血清についてRecombinant cytokeratin 8、およびBovine cytokeratin18に対する抗体の検出ではAIH患者血清において45kDと53kDに明瞭な発現がみられ、これらはCK8(45KD)、CK18(52.5KD)に一致しており、AIH患者血清中の抗CK8及び抗CK18抗体の存在が示された。

2) ELISAによる患者血清中の抗CK8および抗CK18抗体の定量

抗CK8および抗CK18抗体を検出するためのELISAを確立し、血清中の抗体活性を定量した。AIH患者血清中の抗CK8および抗CK18抗体活性はいずれも正常人、慢性C型肝炎患者、PBC患者と比較して有意に高値を示した。

また、抗CK8および抗CK18抗体価と血液生化学データとの相関ではIgGとg-globulinに認められた。

3) ステロイド療法前後における抗CK8抗体および抗CK18抗体価の経時的変化

ステロイド療法後、抗CK8および抗CK18抗体価はいずれも有意に低下していた。また、長期経過（1年～2年）でステロイド漸減に伴わずかに増加する傾向にあった。

4) 生検肝組織に対する免疫組織染色

慢性C型肝炎組織では抗CK8および抗CK18モノク

ロナル抗体に全例において均一に染色されるのに対し、AIH組織では、モザイク様に不均一に染色されるものが高頻度に認められ、CK8およびCK18が脱落していた。

5) 患者血清中のCK8およびCK18免疫複合体のELISAによる解析。

CK8およびCK18の免疫複合体測定のためのELISAの確立し、血清中の免疫複合体を測定した。AIH患者血清中のCK8およびCK18の免疫複合体吸光度はいずれも正常人、慢性C型肝炎患者と比較して有意に高値を示した。

また、CK8免疫複合体とCK18の免疫複合体は互いに強い相関を示しており、さらに、CK8およびCK18免疫複合体吸光度と血液生化学データとの間ではGOTに相関に認められた。

D. 考察

本研究においては、ELISAを用いてAIH患者において血清中の抗サイトケラチン8抗体、および抗サイトケラチン18抗体を定量し、これら抗体活性は、健常人、およびC型肝炎患者と比較して有意に高値であることが明らかになった。またこれらの抗体はステロイド治療により低下する。さらに抗サイトケラチン8モノクローナル抗体、および抗サイトケラチン18モノクローナル抗体を用いた免疫染色により自己免疫性肝炎患者の肝細胞がheterogeneousに染色されることを示した。

肝疾患において抗サイトケラチン抗体を検討した報告はすでにいくつか散見される。またAIHにおいて抗SLA抗体の認識する抗原はおもにCK8およびCK18であることが報告されている。さらに、我々はこれまでにAIHにおいてCK8およびCK18に対する自己抗体が高頻度に見られることを報告してきた。アルコール性肝障害や原発性胆汁性肝硬変症においてもサイトケラチンフィラメントに対する抗体が検出されることが報告されている。また、抗サイトケラチン抗体は上皮細胞の傷害や死滅により反応性に出現するものだと報告も認められる。

近年、サイトケラチンの機能が明らかにされつつあり、ニッケル処理により肝細胞(T51B)において、サイトケラチンフィラメントの再構築が惹起されることが報告されている。サイトケラチンフィラメントの機能として、細胞膜と核、および小胞体や細胞質内封入体を含む細胞内小器官を接続することが重要である。また、サイトケラチンフィラメントは毛細胆管の外周に集積し、毛細胆管鞘を形成している。ニッケル治療後に、サイトケラチンフィラメントは細胞膜周囲から離れ、結果として毛細胆管が消失する。重要なことに、ニッケル治療の効果は、培養細胞内に中間フィラメントに対する抗体を注入したのと非常に似通っている。すなわち抗サイトケラチン抗体は核の周囲におけるサイトケラチンの凝集をもたらすことが示され、抗サイトケラチン抗体の病因的意義について解析が進んできた。

抗CK8抗体および抗CK18抗体が形成される機序について考察を加える。CK8やCK18フィラメントの切断により肝細胞の脆弱性が増す。すなわち、CK8やCK18フィラメント構造が完全に保たれていることが、ストレスや外的毒素からの肝細胞の保護に重要な要因となる事が示されている。我々は本研究において、免疫組織染色で、AIH組織においてCK8とCK18のheterogeneousな脱落があり、これらの変化はCH-C組織ではみられないことを示した。このことは、AIHにおいては、CK8およびCK18の機能を失った細胞が混在していることを明らかにしたという点で極めて重要であると考えられた。

CK8およびCK18は細胞のアポトーシスの際に劇的な変化をきたすこと、またCK8およびCK18にはカスパーゼ切断部位を含むことがすでに報告されている。このことから、肝障害の際にCK8およびCK18の断片と新しく表出したエピトープに対する自己抗体が形成される可能性が示唆される。このことを証明するため、患者血清が反応するこれらのサイトケラチンの抗原性のエピトープを確認することが抗体産生の機序を解明する上で今後の重要な課題と考えられる。

CK8およびCK18の免疫複合体の存在は上皮細胞の直接的障害のみならず、局所でのマクロファージの活性化により肝障害を永続化する重大な要因となっている可能性が示唆される。さらにステロイド療法により抗CK8抗体および抗CK18抗体価が有意に低下したことから、これらの抗体が自己免疫性肝炎の病因に重要な役割を果たしていることが考えられる。しかしながら、CK8およびCK18自己抗体の実態が肝障害に伴う非特異的なものであるという可能性を否定しなければならぬであろう。そのためには、動物実験による抗CK8抗体あるいは抗CK18抗体の影響についての検討、また抗体産生の機序を解明するため、患者血清に反応するCK8およびCK18の抗原性エピトープの研究を今後行っていく予定である。

さらに我々はAIH組織において一部の肝細胞にCK8あるいはCK18が脱落していることを示した。C型慢性肝炎ではCK8あるいはCK18の不均一性はみられず、AIHでのCK8あるいはCK18が染色された細胞は成熟肝細胞であり、染色されない細胞は、再生肝細胞であることも考えられる。この染色の不均一性の機序についての検討も今後の課題である。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝炎(AIH)における組織学的変化とFas-Fas L systemの解析

分担研究者 熊田 博光 虎の門病院消化器科

研究要旨：自己免疫性肝炎(Autoimmune hepatitis)は、本邦では比較的稀な疾患とされ、また診断基準がinternationalなscoring systemと本邦独自のものでは若干の違いがあるため、診断に苦慮する例がある。本疾患の長期予後に関しても未だ一定の見解が得られていない。そこで、我々は1999年に新しく提唱されたscoring system¹⁾によりdefinite AIHと診断された症例を対象とし、長期にわたる組織学的変化を検討し、また definite AIHの病態、治療反応性とHLAにつき検討した。ALT値よりみた治療反応性及び組織学的変化を検討したところ、ステロイドによる維持療法が奏功しているAIH症例では組織学的に改善がみられ、またたとえ肝硬変移行症例でも進行は遅いと考えられた。HLA-DR4およびDR15が高頻度に認められたが、治療反応性のよい症例はHLA-DR14が多い傾向が見られた。

A. 研究目的

AIHは、本邦では比較的稀な疾患とされてきたが、1993年のInternational Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG)による新しい診断基準、1996年の本邦独自の診断指針が提唱され、診断に関しては一つの方向性が見えてきた。さらに1999年に新しいscoring systemが提唱され、より臨床像が明らかとなってきた"definite"AIHの病態、治療反応性とHLAについて、長期観察例を中心に検討した。また、保存血清を用いて経過中の治療反応性により免疫応答の変化についても検討を行った。

B. 対象と方法

1979年から1999年12月までの間に当院に入院し、1999年にInternational Autoimmune Hepatitis Group(IAIHG)より提唱された新しいcriteriaによりdefinite AIHと確定診断し得た48例を対象とした。全例に、各種ウイルスマーカー、自己抗体、 γ -globulin、IgGを測定した。男女比は11:37、確定診断時年齢の中央値は50歳（範囲24歳-72歳）で観察期間の中央値は7年（範囲2年-18年）であった。この内、20例については腹腔鏡、肝生検を複数回施行し、その組織学的変化、治療反応性につき検討した。抗核抗体は間接蛍光抗体法(Hep-2細胞)、抗平滑筋抗体は間接蛍光抗体法、抗LKM1抗体は蛍光抗体法、HBs抗原はRIA法、HCV抗体はEIA(第3世代)、HCV-RNAはRT-PCR法、HLA typingは血清学的方法(判定困難な場合PCR-MPH法)を用いて測定した。今回の検討では、DR2、3、5、6については、DR11-18に分離して解析を行った。統計学的解析はカイ二乗検討を用いた。

C. 研究結果

48症例の確定診断時の血液学的検査の中央値(範囲)はそれぞれALT 85.5IU(8-1242)、 γ -glob. 2.9g/dl(1.2-5.1)、抗核抗体1:1280(1:40-1:10240)であり、3

例を除きIgG値は2500mg/dl以上であった(表1)。組織学的診断は、F₁:22例、F₂:18例、F₃:5例、F₄:3例であった。HLAを検索し得た36例中、DR4陽性例は25例 69.4%であり、DR15陽性例及びDR14陽性例はそれぞれ11例 30.6%であった(図1)。

ALT値よりみた治療反応性では48例中ステロイド治療を行った42例で、初回投与時39例に著効を示した。その後も少量の維持療法でALT値の安定化がみられたのは28例(66.7%)であり、残りの14例(33.3%)はステロイドの増減を繰り返している。また治療を行わなかった6例中3例は、一過性の上昇のみで安定している。次に組織学的変化では、2回以上の組織学的検査を行った20例が、改善12(60.0%)、不変5(25.0%)、悪化3(15.0%)であった。なお、改善不変例17例中13例はステロイド少量により維持療法に移行している症例である(図2)。

HLAのtypingを行った36例の治療反応性は、ステロイド20mg/日を越える量でなければ肝酵素の安定化が得られないものを、non-responderとし、それ以下の量で維持可能な症例をresponderとして検討を行った。DR4陽性群のなかにnon-responderが多く、DR14を持っている例では、治療反応性がよい傾向が認められた(表2)。

8例につき保存血清を用いたsoluble Fas、soluble FasL、IL-12(p70,p40&p70)の検討では、例数が少ないこともあり、有意差は出ていない。

D. 考察

自己免疫性肝炎とは、中年以降の女性に好発し、慢性に経過する肝炎であり、肝細胞障害の成立に自己免疫機序が想定される。診断にあたっては1996年に診断指針が定められ、肝炎ウイルス、アルコール、薬物による肝障害、および他の自己免疫疾患に基づく肝障害を除外し、免疫抑制剤、特にコルチコステロイドが著効を奏するといわれている。近年、自己免疫性肝炎とHLA typingの関係については報告が散見されるが

1)、本邦に於いては治療反応性と HLA typing の関係について検討した報告はない。今回、自己免疫性肝炎患者36例の HLA typing を行い、可能な限り組織学的検査を施行し、治療反応性との関係を検討した。36例中DR4またはDR15陽性者は33例(91.7%)と高率で、他報告例との差を認めないが^{2) 3)}、治療反応性の良好な症例では、DR14陽性例が多い傾向がみられ、組織学的にも改善している例が多かった。HLA-DR 抗原が自己免疫性肝炎の病態に影響を与えている可能性については、HCV陽性例、又、他の自己免疫性肝炎におけるDR抗原の特徴的なパターン⁴⁾の検索において一定の傾向が認められることより、明らかである^{5) 6)}。すなわち、本邦のAIH症例では、DR4が高頻度に陽性であり、欧米では、DR3が高頻度である。さらに欧米ではDR3陰性者ではDR4が高頻度である事より、お互いに独立した疾患感受性遺伝子であると考られている。この事はPBMC及び肝内浸潤リンパ球を用いた報告でも検討されている。肝内浸潤リンパ球が肝細胞あるいは肝細胞由来の自己抗原に感作されていること、門脈域浸潤リンパ球においても、AIHではnon-AIHに比べてCD4陽性細胞優位であるとの報告があり、病態にclass IIが関与している事を示唆しており、DR 4、DR 15が重要な因子であると考えられる⁷⁾。又さらにLKM-1抗体陽性のAIHにおいて、LKM-1特異的T細胞のcell lineを用いたcytokine産生能の検討からTh1細胞優位であるとの報告もあり、AIHの病態におけるclass IIを介したCD4細胞が重要な役割を担っていると考えられる⁸⁾。今回の我々の検討では、組織学的変化、治療の反応性とMHC-class II 抗原がどのように関わっているかについて検討を行い、DR抗原によりある程度予後の予測も可能ではないかと考えている。Fas-FasL systemに関しては、少数例の検討であり、今回有意な差がでていないが、これまで免疫応答の強い時期にはsoluble FasLが上昇することを肝臓学会でも報告してきており、今後はin vitroでの検討も加え、さらに症例数を増やし病態形成におけるDR抗原の役割について研究を続けていきたいと考える。

E. 結 論

ステロイドによる維持療法が奏功しているAIH症例では組織学的に改善がみられ、またたとえ肝硬変移行症例でも進行は遅いと考えられた。HLA-DR14陽性例では治療反応性が良好である傾向が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 鈴木義之・池田健次・斎藤聡・他. 自己免疫性肝炎(AIH)の病態とHLA-DR抗原についての解析. 消化器と免疫 No35:188-190,1998.

2. 学会発表

1) 鈴木義之・熊田博光. 第5回日本消化器免疫学会総会 1998. 自己免疫性肝炎(AIH)の病態とHLA-

DR抗原についての解析.

2) 鈴木義之・熊田博光. 第2回日本肝臓学会大会 1998. わが国における自己免疫性肝炎の予後. 一長期観察例における自己免疫性肝炎の病態と予後.一

文 献

1) International Autoimmune Hepatitis Group: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. Journal of Hepatology 1999; 31:929-938

2) Seki T, et al: Association of autoimmune hepatitis with HLA-Bw54 and DR4 in Japanese patients. Hepatology 1990 Dec; 12(6): 1300-1304

3) Zeniya M, et al: Immunogenetic background of hepatitis B virus infection and autoimmune hepatitis in Japan. Gastroenterol Jpn 1993 Mar; 28 Suppl 4:69-75

4) Zeniya M, et al: HCV-marker-positive autoimmune-type chronic active hepatitis: a possible relation between HCV infection and liver autoreaction. Liver 1994 Aug; 14(4): 206-212

5) Parveen S, et al: Antibodies to Ro/La, Cenp-B, and snRNPs antigens in autoimmune hepatitis of North America versus Asia: patterns of immunofluorescence, ELISA reactivities, and HLA association. Dig Dis Sci 1998 Jun; 43(6): 1322-1331

6) Donaldson PT, et al: Immunogenetics in liver disease. Baillieres Clin Gastroenterol 1996 Sep; 10(3): 533-549

7) Schlaak JF, et al: Analysis of the in vitro cytokine production by liver-infiltrating T cells of patients with autoimmune hepatitis. Clin Exp Immunol 1993 Oct; 94(1): 168-173

8) Lohr HF, et al: Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticlonotypic T-cell responses in LKM-1. Hepatology 1996 Dec; 24(6): 1416-1421

図1. 自己免疫性肝炎におけるHLA-DR相互の関係

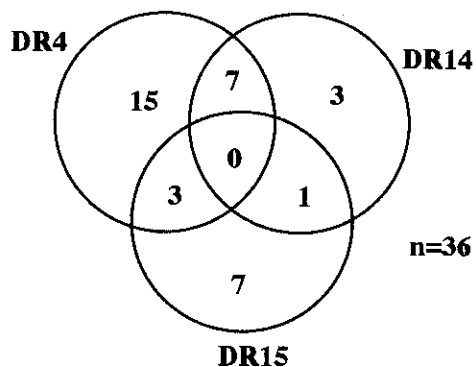


図2. AIHにおける組織学的改善度

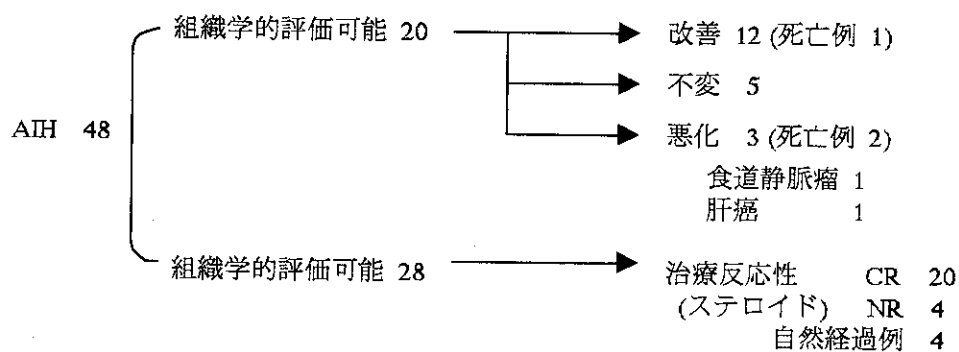


表1. 背景因子

Male : Female	11:37
Age (median, range)	50 years (24 ± 72y)
γ-glob (g/dl)	2.9 (1.2 ± 5.1)
ANA	1 : 1280 (1:40 ± 1:10240)
ALT (IU/l)	85.5 (8 ± 1242)

表2. 治療反応性

HLA-DR	CR	NR
4	17	8
8	7	2
14	11	0
15	9	2

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括研究報告書

樹状細胞を用いた自己免疫性肝炎モデルにおける肝障害発生機序の検討

主任研究者 戸田剛太郎 東京慈恵会医科大学、内科学講座第一教授

研究要旨：自己免疫性肝炎(AIH)における臓器特異的抗原の同定を目的とした病態解明をするため自己免疫性反応に立脚したAIHモデルマウスを作製し、肝細胞障害の発生機序について検討する。肝の臓器特異抗原に対し感作を成立させるために、専門的抗原提示細胞である樹状細胞(DC)と、産生産物が肝細胞に類似した高分化型肝癌細胞の融合細胞を用いて実験動物モデルを作成済み、このAIHモデルにおける肝障害発生機序について検討した。

A. 研究目的

樹状細胞を用いたAIHモデルを作製し、本モデルにおける肝障害発生機序の解明する。

B. 研究方法

C57BL/6雌性マウスの骨髄細胞をGM-CSF, IL-4 存在下に培養し、DCを誘導した。高分化型肝癌細胞は肝細胞類似の多種の血清蛋白産生能を有するHepa1-6細胞を用いた。細胞融合は50% polyethyleneglycolを使用して各々2対1の割合にて融合細胞を作製した。融合細胞をマウスの背部皮下に接種 (day1,14) 後、m-rIL-12(500ng/mouse)を腹腔内投与 (day15,17,19) し、day21に肝の組織学的変化、血清ALT値を検討した。また、この免疫されたマウスの脾細胞を、m-rIL-12 を前投与したマウスに腹腔内投与後の肝内細胞浸潤の発生する程度を検討した。

C. 研究結果

Hepa1-6とDCの融合細胞でマウスを免疫すると、肝に軽度の単核球浸潤を認めた。更に、このマウスにIL-12を投与すると、肝に著明な単核球浸潤が観察され、血清ALT値の上昇が認められた。浸潤細胞はCD3陽性Tリンパ球が主体で、肝細胞壊死像も散見された。肝内に見られた炎症細胞浸潤は、心、腎、肺、大腸には認められなかったため、肝特異的なAIHモデルとして有用と考えられた。

本モデルの脾細胞は、Hepa1-6に対してのcytotoxicityが認められ、この脾細胞をIL-12前投与したマウスにadoptive transferしたところ、同様の肝内細胞浸潤が認められたが、IL-12非投与マウスでは肝内細胞浸潤はほとんど認められなかった。

D. 考察

本モデルにおける肝障害の発現には、融合細胞によってT cellを介した免疫応答が惹起されCTLが誘導されたことが想定された。しかし、自己反応性T細胞の誘導のみでは、肝内には軽度の炎症細胞浸潤を認めたものの、肝障害の発生までには至らなかった。このモデルでは肝障害発生にはIL-12の関与した作用が必要で、肝臓内の免疫学的変化をもたらすのではないかと

想定された。今回の検討では肝細胞のMHC class Iの発現がIL-12の投与によって出現していることが確認されたが、ICAM1,VCAM 1などのadhesion moleculeの関与や、その他、未同定因子の存在も肝炎発症に大きく関与していることが考えられた。高分化型肝癌細胞Hepa1-6は肝細胞と交差する抗原性を有し、Hepa1-6とDCの融合細胞により免疫されたマウスは、この抗原に対する反応性を獲得した可能性が示された。本モデルは自己免疫性肝炎の病態形成や病因責任抗原の検索に有益と考えられた。

E. 結論

樹状細胞を用いたAIHモデルを作製し、本モデルにおける肝細胞障害の発症機序について検討したところ、AIH発症にはautoreactive T lymphocyteの誘導のみならず、肝内micro environmentの変化も必要であることが示された。

F. 学会発表

第35回日本肝臓学会総会-樹状細胞と高分化型肝癌の融合細胞移入による免疫学的肝細胞障害の誘導

50th,AASLD,1999.-Liver specific injury induced by immunization with fusions of dendritic cell and hepatoma cell

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

Ⅱ型自己免疫性肝炎のマウスモデル作製の試み

分担研究者 各務 伸一 愛知医科大学第一内科 教授

研究要旨：Ⅱ型自己免疫性肝炎の対応抗原であるcytochrome P450 ⅡD6(CYP2D6)をLPSとともにマウスに免疫することにより肝障害の誘導が可能であった。Ⅱ型自己免疫性肝炎のマウスモデルとなりうるものと思われた。

A. 研究目的

Ⅱ型自己免疫性肝炎のマウスモデルを作製し、免疫学的発症機序、病態に関する詳細な検討を行う。

B. 研究方法

自己免疫性肝炎Ⅱ型に出現する肝腎マイクロソーム抗体(抗LKM-1抗体)の対応抗原であるCYP2D6とb galとの融合蛋白、b gal-CYP2D6をLPSをアジュバントとしてマウス(C57BL/6)に免疫し、肝障害の有無をALT値、組織像にて検討した。また、血清中のCYP2D6に対する抗体を測定することにより、特異的免疫応答の誘導の有無について検討した。

C. 研究結果

b gal-CYP2D6の用量依存性に肝障害の誘導が可能であった。組織像では門脈域への炎症細胞浸潤、小葉内のfocal necrosisなどが観察された。また、浸潤細胞の中には形質細胞も認められた。血清中にはCYP2D6に反応する抗体が認められ、免疫により抗原特異的免疫応答が誘導されていることが確認された。LPS単独投与のマウスにおいても軽度の肝障害、抗体産生を認めた。

D. 考察

CYP2D6に対する抗体の誘導が認められたことより、b gal-CYP2D6投与による肝障害は、CYP2D6特異的免疫応答により惹起された可能性が示された。また、LPS単独投与群においても軽度の肝障害、抗体誘導がみられたことは、このマウス(C57BL/6)においてCYP2D6に反応する前駆細胞がある程度の割合で存在することを示唆した。Ⅱ型自己免疫性肝炎のマウスにおけるモデルとして、その発症機序の解析に有用なモデルとなる可能性が示された。

E. 結論

Ⅱ型自己免疫性肝炎のマウスモデル確立の可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

当該研究に関するものはなし。

2. 学会発表

当該研究に関するものはなし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

Concanavalin A (Con A) 誘発マウス肝炎モデルを用いた免疫学的肝細胞障害発症機序と
その治療法の研究

分担研究者 牧野 勲 旭川医科大学附属病院 院長

研究要旨：Concanavalin A(以下Con A)誘発マウス肝炎モデルにおいて、免疫学的肝細胞障害の発症にTNF- α 、IFN- γ などの炎症性サイトカインとともに、白血球遊走活性化に関与するケモカインであるMacrophage inflammatory protein-2(以下MIP-2) が深く関わっていることを明らかにした。

A. 研究目的

Tリンパ球を活性化し、免疫学的機序により肝細胞障害を発症する Con A 誘発マウス肝炎モデルを用いて、肝細胞障害の発症機序における炎症性サイトカインと白血球遊走活性化に関与するケモカインである MIP-2の役割について検討する。

B. 研究方法

雌性Balb/cマウスを用い、Con A 20 mg/kg BWを尾静脈より静注し、肝障害モデルを作製した。Con A投与後の血中TNF- α 、IFN- γ 、MIP-2濃度を経時的に測定した。また、マウスTNF- α 抗体、IFN- γ 抗体、MIP-2抗体を Con A 投与30分前に静脈内投与し、投与8時間後の血中GPT、2、8時間後の血中MIP-2濃度を比較検討した。さらに、recombinant TNF- α とIFN- γ 単独投与2時間後の血中MIP-2誘導効果を検討した。

本実験にあたってはあらかじめ旭川医科大学動物実験委員会の承諾を得、さらにNIHの実験動物取り扱い規約に基づいて行った。

C. 研究結果

Con A 投与後、血中MIP-2、TNF- α は2時間後をピークに出現し、その後いずれも低下を認めた。一方、IFN- γ はCon A 投与2時間後より検出され、8時間後まで高値を維持していた。Con A投与8時間後の血中GPT値はいずれの抗体前投与によっても有意に低下した。また、Con A投与後の血中 MIP-2 濃度はTNF- α 抗体前投与により2、8時間とも有意に低下したが、IFN- γ 抗体前投与では有意な低下は認められなかった。さらに、TNF- α 投与により MIP-2は血中に誘導されたが、IFN- γ 投与では血中に検出されなかった。

D. 考 察

Con A誘発マウス肝炎モデルではTNF- α 、IFN- γ などの炎症性サイトカインが重要な役割を担っており、ヒトの自己免疫性肝炎や劇症肝炎などの研究に有用なモデルと考えられている。我々は、昨年度までの検討で、CXCケモカインに属し、白血球遊走活性化

因子であるMIP-2がCon A投与後早期に血中に出現するを見出した。今回、Con A誘発肝障害モデルにおけるMIP-2の役割をTNF- α 、IFN- γ と対比して検討した。今回の検討では、Con A投与後のMIP-2の血中動態は、TNF- α と同様に Con A 投与早期に出現し、速やかに低下し、IFN- γ とは明らかに異なる動態を呈していた。また、MIP-2中和抗体による肝障害抑制効果は、TNF- α 、IFN- γ 抗体と同等に認められ、その効果は抗体量依存性であることから、MIP-2が本モデルの肝障害発症にTNF- α 、IFN- γ と同様に強く関与していることが推測された。一方、TNF- α 、IFN- γ 抗体前投与による Con A 投与後の血中MIP-2濃度は、2、8時間ともTNF- α 抗体によるみ低下した。さらに、recombinant TNF- α 、IFN- γ 単独投与では、投与2時間後にTNF- α でのみ血中にMIP-2が誘導された。従って、Con A誘発肝障害モデルでは、Con A投与後に産生されるTNF- α によりMIP-2が誘導され、肝障害発症に深く関わっていると考えられた。

E. 結 論

Con A 誘発マウス肝炎モデルにおいて、MIP-2はTNF- α により誘導され、炎症性サイトカインとともに肝細胞障害発症に関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Effect of ursodeoxycholic acid on autoimmune-associated chronic hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol 14:413-418, 1999
- 2) Concanavalin A誘発マウス肝炎の肝細胞障害重症度とサイトカイン産生能における性差の検討. 薬理と治療 27:S831-S834, 1999
- 3) Concanavalin A誘発マウス肝炎における性差発現機序の検討. 薬理と治療 27:S1495-S1497, 1999
- 4) 難治性肝疾患診断と治療の進歩 I. 自己免疫性肝炎 4. 治療の進歩. 日内会誌 88:23-28, 1999
- 5) ウルソデオキシコール酸による自己免疫性肝疾患の治療. BIO Clinica 14:66-70, 1999

2. 学会発表

1) Antithrombin III prevents concanavalin A-induced hepatitis by reducing macrophage inflammatory protein-2 in mice. American Association for the Study of Liver Diseases Gastroenterology 116:A781, 1999

2) 原発性胆汁性肝硬変症におけるUDCA投与早期の肝機能改善効果と血中胆汁酸代謝への影響.第85回日本消化器病学会総会 日消誌 96 : Suppl A133, 1999

3) Concanavalin A 誘発マウス肝炎モデルに対するAntithrombin IIIの効果と作用機序の検討. 第35回日本肝臓学会総会 肝臓40:Suppl(1) 282, 1999

4) ワークショップ2 ー肝疾患における自己抗体とその意義

C型肝炎における自己抗体出現と年齢、性差の関連. 第3回日本肝臓学会大会 肝臓40:Suppl(2) 137, 1999

5) 自己免疫性肝炎に対する長期UDCA療法 日内会誌 88:臨時増刊号223, 1999

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝炎類似GVHRモデルにおける肝浸潤リンパ球サイトカインの変動

分担研究者 田中 直見 筑波大学臨床医学系消化器内科 教授

研究要旨：マウスでgraft-versus-host reaction(GVHR)を導入し、PBC類似の肝病変を解析してきたが、Concanavalin Aを加えることで、自己免疫性肝炎類似の病態が観察され、その病態の進展にIFN-g、TGF- β 1、TNF- α の関与が示唆された。

A. 研究目的

我々は、マウスに移植片対宿主反応(graft-versus-host reaction, GVHR)を惹起させるF1 hybrid diseaseの系を用いて原発性胆汁性肝硬変(PBC)類似の肝病変について報告してきた。つまり、C57BL/6(B6)とB6のMHC class IIの3つのアミノ酸の異なるB6.C-H-2^{bm12} (bm12) を交配した (bm12×B6) F1マウスに親のB6 spleen T cellsを移入し肝病変を解析した。その結果、T cell 移入後5日頃より胆管周囲にCD4⁺T cellsを主とした細胞浸潤を認め、肝内浸潤CD4⁺T cellsの解析から早期よりIFN-gのmRNAの発現の上昇、遅れてIL-10 mRNAの発現の上昇を認めた。しかしながら、このGVHRモデルは実際のPBCと異なり、granulomaの形成や線維化はみられない。そこで、近年マウスでT cellが関与して急性の肝障害をおこすとされるConcanavalin A(Con A)に着目した。ともに CD4⁺ T cells が病変の形成に重要な働きをしていると考えられるGVHRの肝病変に Con A を投与することで、病変の進展の有無を検討し、肝内浸潤CD4⁺ T cells のサイトカインプロファイルを明らかにし病態への関与を検討した。

B. 研究方法

(bm12×B6)F1マウスに、ナイロンウールカラムを用いて分離したB6 spleen T cellsを 1×10^7 個静注しGVHRを導入(group1)。GVHR導入5日後に Con A 15mg/Kgを静注(group2)。GVHR導入群は14日目に、normal control群(group3)とともに屠殺し、門脈灌流後肝臓を摘出。摘出した肝臓はH.E.染色、マッソントリクローム染色、鍍銀染色施行し、組織学的に検討。またGVHR群、GVHR+Con A群、control群において肝浸潤単核球は、摘出した肝臓をステンレススチールメッシュを通した後Percollにて肝細胞と分離。溶血後FITC-conjugated Thy1.2 mAb、PE-conjugated CD4⁺ mAbにて標識し、FACSVantageを用いてThy1.2⁺CD4⁺T細胞を 5×10^4 個sortingした。これよりmRNAをAGPC法にて抽出し、各サイトカインのプライマーを用いてRT-PCRを施行。この際内部標準としてb-actinを使用し、PCR産物は2%アガロースゲルにて泳動後、紫外線をあてバンドを検出した。各サンプルのmRNAを希釈し同時にPCRを行い、バンドの強度を比較した。

(倫理面への配慮)

すべてのマウスは筑波大学動物実験取扱規定に基づき飼育管理された。また、実験の際は頸椎脱臼にて安楽死させたため、倫理面に問題がないと判断した。

C. 研究結果

肝組織のHE染色では、group1では小葉間胆管周囲にリンパ球浸潤を認めたが、group2ではgroup1よりも著しいリンパ球浸潤を小葉間胆管周囲に認め門脈域の拡大が見られた。また、group2ではこれまでのGVHRでは認められなかったpiecemeal necrosisも認められた。肝実質内の変化としては、group2で肝小葉内のnecrosis、bridging necrosisを認めた。一方 Con A のみを同量(15mg/Kg)静注し9日目に肝組織を検討したところ門脈域には炎症細胞浸潤をほとんど認めなかった。各群の肝内CD4⁺T細胞をFACSにてsortingした後、RT-PCRにて各cytokineのmRNAを比較した。内部標準として用いたb-actinのバンドが各group間でほぼ同程度なのに対し、group1に比しgroup2においてはIFN- γ 、TGF- β 1、TNF- α の mRNAの発現が上昇していた。一方IL-10に関してはgroup1とgroup2では同程度の発現を認めた。

D. 考察

疾患の病因や病態を解析するためには、適切な動物モデルが有用と思われるが、われわれはマウスでGVHRを導入し、PBC類似の肝病変を解析してきた。しかし、このGVHRモデルは実際のPBCと異なり、granulomaの形成や線維化はみられず、自己免疫機序の関与で進展した病態を解析するには不十分と思われた。そこで、近年マウスでCD4⁺ T cellが重要な働きをして急性の肝障害をおこすとされるConcanavalin A(Con A)に着目した。Con Aによる肝障害の中心的サイトカインについてはIFN- γ 、TNF- α が報告されている。ともにCD4⁺ T cellsが病変の形成に重要な働きをしていると考えられるマウスのGVHRの肝病変に Con Aを投与したところ、肝病変の進展を認めた。すなわち、門脈域の炎症細胞浸潤の悪化、piecemeal necrosis、肝実質内のnecrosisが認められた。これらの所見はPBCやAutoimmune hepatitisに典型的ではないが、自己免疫的機序が関

与した肝炎の動物モデルとなる可能性が示唆された。そこで、肝内浸潤CD4⁺ T cellsのサイトカインプロフィールを明らかにし病態への関与を検討した。従来のGVHR群に比べて、GVHR+Con A群ではIFN- γ 、TGF- β 1、TNF- α の mRNAの発現が上昇しており、このモデルにおいてこれらのサイトカインが、肝病変の進展に関与した可能性が示唆された。

E. 結論

従来のマウス GVHRモデルにCon Aを加えることで、自己免疫性肝炎類似の病態が観察され、その病態の進展にIFN- γ 、TGF- β 1、TNF- α の関与が示唆された。本モデルは自己免疫性肝障害の病態解析や薬剤効果判定に有用と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Itoh S, Matsuzaki Y, Kimura T, Ikegami T, Shoda J, Fujiwara M, Tanaka N. Cytokine profile of liver-Infiltrating CD4⁺ T cells separated from murine primary biliary cirrhosis-like hepatic lesions induced by graft-versus-host reaction. *J. Gastroen.Hepatol.* (in press) Itoh S, Matsuzaki Y, Kimura T, Unno R, Ikegami T, Shoda J, Doy M, Fujiwara M, Tanaka N. Suppression of hepatic lesions in murine graft-versus-host reaction by antibodies against adhesion molecules. *J.Hepatol.* (in press)

2. 学会発表

海野理恵; Novel murine autoimmune-like hepatitis model induced by graft-versus-host reaction and Concanavalin A.
(American Gastroenterological Association 1999.5.17. in Orlando)

伊藤進一; Con A 投与における自己免疫性肝炎類似のGVHR動物モデル肝病変の進展-サイトカインの変動との関連(第35回 日本肝臓学会総会 1999.6.25. in 東京)

b. 原發性胆汁性肝硬變

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括研究報告書

原発性胆汁性肝硬変研究分科会総括報告書

分担研究者 井上 恭一 関西医科大学 第三内科 教授

原発性胆汁性肝硬変（PBC）分科会の研究課題は①PBCの疫学調査、②疫学調査のデータに基づく病態と自然史の解明、③PBCの病因の解明、④治療の開発などである。これらの点についての平成11年度の研究成果は以下のごとくなる。

PBCの全国調査は、一貫して本分科会が担当して来たが、今年度（第20報）は無症候性PBC（a-PBC）の予後の判別に有用な因子を見出すため、第1回から第10回迄の全国調査の全登録症例4,361例を対象にロジスティック回帰分析法による多変量解析を行った。その結果a-PBCの予後判別には診断時の血清ビリルビン値、アルブミン値、総コレステロール値、組織学的病期、ウルソデオキシコール酸（UDCA）の投与の有無が有意の因子であることが明らかになった。

研究課題については6施設より報告があり、そのうち4題は病因、病態に関する課題で他の2題は治療法に関するものであった。病因に関しては全ての自己免疫性疾患に共通する現象として抗原提示細胞の役割が重要と考えられているが、恩地研究協力者はPBC症例における樹状細胞（DC）の機能異常および一酸化窒素（NO）と病態の関わりについて検索し、PBC患者ではDCのうちリンパ球系DC（DC2）のHLA-DR、CD123の発現低下がみられ、DC2の機能障害が推測され、また小葉内および門脈域にiNOS陽性細胞を認めることから、NO産生ひいては胆管障害との関連性を示唆する所見を得た。中沼研究協力者はPBC症例の肝における肉芽腫性病変の解析により、細菌感染がPBCの肉芽腫形成に関与している可能性を検討した。その結果PBC症例の約37%に肉芽腫の形成が認められ、肉芽腫部分および胆汁成分の中から細菌遺伝子を検索した所、PBC15例中10例に細菌DNA由来のPCR産物が認められ、これらは腸内細菌由来と考えられ、細菌の菌体の脂質成分が肉芽腫形成の一因となっていることが推定された。

PBCの病因を検索する上で重要と考えられる項目は肝組織内での胆管破壊を惹起するリンパ球の種類同定で、以前より多くの報告がなされている。石橋研究協力者は抗ミトコンドリア抗体の対応抗原のT細胞エピトープの同定を行い、抗原特異的T細胞による抗原認識様式の解析によりPBCの成因の解明を試みた。その結果抗ミトコンドリア抗体の対応抗原とされるピルビン酸脱水酵素E2コンポーネント（PDC-E2）と大腸菌由来のPDC-E2間に分子相同性が認められ、大腸菌以外の外来抗原、特に細菌由来のペプチドとの間にも分子相同性を確認し、これらのペプチド

と特異的T細胞間の反応がPBCの成立に関与している可能性を示唆した。一方辻研究協力者はステロイド治療前後のPBC患者肝組織から得られた肝組織中リンパ球の解析を行い、PBCの成因に拘わるT細胞クローンの存在を示唆する所見を得た。

治療法の開発についてはウルソデオキシコール酸（UDCA）のPBC治療における有用性は十分立証されているが、PBC症例の中にはUDCAが奏功しない症例も存在し、かかる例ではUDCAに代わる新しい治療法が開発が求められている。最近ベザフィブラート（BF）がPBCに有効との報告があり、大西研究協力者は12例にBFの投与を行い、掻痒感の軽減、胆道系酵素の低下などを認めた。アルカリフォスファターゼ値は平均51.9%、 γ -GTP値は44.5%低下し、その低下は多くの症例で投与開始2ヶ月以内であった。BFが効果を発揮する樹序について、井上班員はmultidrug resistant3 P-glycoprotein（MDR3 Pgp）との関連を検討し、PBC患者8例にBFを投与し、投与前後における末梢血白血球中のMDR3mRNAの発現増強を検索した。その結果BF投与群では非投与群や正常コントロール群に比較し、MDR3mRNAの発現増強が認められた。リン脂質が肝細胞から胆汁中へ移送される機序にMDR3が関与していることが明らかにされており、リン脂質の胆汁中への汲み出しの障害が、PBCの胆管病変の成立に関係し、BFの投与はこれを改善することにより病態の改善に結びついているのではないかと考えられる。

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)

分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 全国調査結果 (第20報)

分担研究者 井上 恭一 関西医科大学 第三内科

研究要旨：本研究の目的は原発性胆汁性肝硬変(PBC)全国調査のデータを基に、本邦におけるPBCの病態と予後を明らかにすることにある。第1～10回調査までの全登録症例4361例(416施設)を対象として検討し(調査期間：1968年1月～1998年12月)、生存率はKaplan-Meier法にて求めた。またa-PBCの予後因子の多変量解析にはロジスティック回帰分析法を用いた。本邦における臨床像はこれまでの報告と大きな差異は認められなかった。5年生存率は診断時臨床病期a-PBC；97%、s1-PBC；88%、s2-PBC；53%程度であった。診断時a-PBCであった症例のうち、最終確認時s2-PBCに進展した群(8%)の生存率は、無症候性のまま推移した群(81%)およびs1-PBCに進展した群(11%)に比較して、明らかに予後不良であった。a-PBCの予後判別における多変量解析の結果、診断時血清総ビリルビン値(T-Bil)・アルブミン値(Alb)・総コレステロール値(T-Cho)・組織学的病期・ウルソデオキシコール酸(UDCA)使用の有無が有意因子として選択された($p<0.00001$)。

A. 研究目的

本邦における原発性胆汁性肝硬変(PBC)の全国調査は1980年より行われ、その集計・解析を著者らが担当してきた。本邦では、肝疾患に基づく症状を伴わない、いわゆる無症候性PBC (asymptomatic PBC : a-PBC)の段階で診断される症例が多く、大部分は長期にわたり発黄せず、予後が良い。一方、診断時a-PBCのうち早期に黄疸(血清総ビリルビン値：T-Bil 2.0mg/dl以上)を伴う症候性PBC(symptomatic PBC: s2-PBC)に進展する予後不良な群も存在することをこれまでに報告した(本会第18報)。今回は、1998年12月末に実施した第10回全国調査の集計結果を報告するとともに、これら予後の異なる両群を診断時に判別するために、多変量解析を試みた。

B. 方法

対象は1980年の第1回調査から1998年12月末に行われた第10回調査までに、全国416施設よりアンケート調査に寄せられた計4361例である。これら臨床像(対象4361例)および予後(対象3778例：年齢・診断日・予後・診断時最終観察時臨床病期データの有効例・観察期間1ヶ月以上)について解析した。生存率はKaplan-Meier法を用い、 $p<0.05$ を有意とした。また、a-PBCにおける予後判別のための検討では、有効なデータの備わる診断時 a-PBC 1955 例を対象として、ロジスティック回帰分析法を用いて多変量解析を行った。まず、従属変数として最終観察時s2-PBCを、説明変数としてこれまでPBCの予後解析に用いられてきた主な予後因子：性別・年齢・T-Bil・アルブミン値(Alb)・総コレステロール値(T-Cho)・組織学的病期・自己免疫疾患合併の有無・ウルソデオキシコール酸(ursodeoxycholic acid: UDCA)投与の有無について、単変量解析の後、多変量解析にて変数選択を行った。使用した解析用コンピュータソフトはStat Flex Ver. 4.2である。

なお、研究対象とした登録症例の個人的プライバシーに関わる情報の漏洩については十分な配慮を行った。

C. 研究結果

本邦におけるPBCの臨床的病像については従来の報告と大きな差異は認められない。しかし、1990年以降発生数は横ばいであるが、有病者数は漸増しており、最近の死亡数は減少傾向にある。診断時における臨床病期別にみた5年生存率は、a-PBC 97%、s1-PBC 88%、s2-PBC 53%であった。また臨床病期の推移別にみた生存率の検討の結果、a-PBCには、明らかに予後の異なる2群が存在した。診断時a-PBCであった症例のうち、無症候性のまま推移した群(88%)およびs1-PBCに進展した群(11%)は観察期間中ほとんど生存しており、最終確認時s2-PBCに進展した群(8%)は明らかに予後不良であった。a-PBCの予後判別を目的としたロジスティック回帰法を用いた多変量解析の結果、予後因子のうち、診断時血清T-Bil・Alb・T-Cho・組織学的病期・UDCA使用の有無が有意となった($p<0.00001$)。

D. 考察

1990年以降の発生数、有病者数、死亡数をあわせた疫学的動向は、最近の予後の変化によるものと考えられる。事実、診断時における臨床病期別にみた5年生存率では、2年前の報告(第1～9回全国調査：1968年1月～1996年12月)と比較して、a-PBC 95%が97%、s1-PBC 87%が88%、s2-PBC 48%が53%と、s2-PBCの生存率が若干改善しており、1990年以降の症例なかでも軽度-中等度のs2-PBCの予後が改善しているという前回の報告(本会第19報)を裏付ける結果となった。長期間生存する予後の良い群と、早期にs2-PBCへと進展する予後不良の群をa-PBCの段階で識別することは、治療や経過観察の必要性を含めた臨床医学的課題

であり、医療経済効率的にも関心のあるところである。しかし、これまでに識別に有用な指標は示されていない。今回、a-PBCの予後判別にロジスティック回帰法を用いた多変量解析を試み、診断時血清T-Bil・Alb・T-Cho・組織学的病期・UDCA使用の有無が両群の判別に有用と考えられた。今後、この結果の適合性をさらに検討するとともに、診断時に予後の異なるa-PBCの患者群を判別するためのモデル式の作成を試みる予定である。

E. 結論

a-PBCには、明らかに予後の異なる2群が存在した。多変量解析の結果、a-PBCの予後判別において、診断時血清T-Bil・Alb・T-Cho・組織学的病期・UDCA使用の有無が有用と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 井上恭一、廣原淳子、仲野俊成：原発性胆汁性肝硬変、発生の疫学.日本内科学会雑誌88；29-34, 1999

2) 井上恭一、廣原淳子：原発性胆汁性肝硬変.慢性肝炎 肝硬変 肝癌 新しい展開と診療の実際(藤原研司編)永井書店、大阪、1999, p334-348

3) 井上恭一、廣原淳子、仲野俊成：原発性胆汁性肝硬変.非肝炎ウイルス性肝疾患 肝と自己免疫、薬物、アルコール(戸田剛太郎編)メジカルレビュー社、東京、1999, p105-108

4) 廣原淳子、仲野俊成、井上恭一：原発性胆汁性肝硬変の長期予後. 総合臨床、2000(印刷中)

2. 学会発表

1) Hirohara J, Nakano T, Inoue K : Clinical profile and prognosis of primary biliary cirrhosis in Japan based on the national surveys: 第7回日本消化器関連学会週間DDW-Japan 1999 Hiroshima 国際シンポジウム、1999.10.30

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

PBCにおける樹状細胞機能異常

分担研究者 恩地 森一 愛媛大学医学部 第三内科 教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変(PBC)において樹状細胞(DC)の機能異常の有無および一酸化窒素(NO)と病態との関わりについて解析した。PBC 11例の肝の針生検組織を対象にiNOSを染色したところ、胆管周囲にiNOS陽性シグナルを認めた。またHLA-DR, CD83とiNOSの二重染色で、HLA-DR, CD83陽性細胞の一部にiNOSの発現を認めた。さらに、PBC 14例、自己免疫性肝炎(AIH) 7例、C型慢性肝炎(CH-C) 9例、健常者(NC) 12例の末梢血リンパ球よりフローサイトメトリー(FACScan)によりDC1とDC2を分画し、各々の細胞比およびその表面抗原の発現強度を比較検討したところDC1/DC2の分画比は各疾患群において差を認めなかったが、PBCにおいてDC2のHLA-DR, CD123の発現強度の低下がみられた ($p<0.01$)。以上より、PBCにおいてCD83陽性活性化DCにiNOSが発現していることが確認され、またDC2の機能異常がその病態に関わっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は肝内微小胆管が選択的に障害、破壊、消失に至る慢性肝疾患である。過去に様々な自己免疫性疾患との関連が報告されており(1,2)、その発症には自己免疫的な機序が関与しているものと思われる。これまでに、我々は免疫の要である抗原提示細胞、とりわけ樹状細胞(DC)に注目し、PBCの病態との関わりについて検討してきた。その結果、PBC患者末梢血から採取したDCは健常者に比べT細胞幼若化補助能が低下しており、さらにそのPBC患者より単離したDCの一酸化窒素(NO)産生量が約5倍と著明に増加していることを観察した(3)。このDCにNO synthetase inhibitorsを添加して同種混合培養試験をおこなうとPBC患者由来DCによるT細胞刺激能が回復することより、PBCではDCの機能異常があつて、その異常にNOが関与していると考えられた。これらの解析は、PBC患者の末梢血よりサイトカインを用いて誘導し単離したDC(4)の結果であり、実際にPBC患者の肝組織において肝内DCの病態との関わりおよびNO産生と病態との関わりについては不明である。

また、最近ヒトDCはミエロイド系のCD11c陽性であるDC1とリンパ球系のCD11c陰性でCD123 (anti-IL-3 receptor α chain)陽性であるDC2の二つのサブセットが同定されている(5,6)。PBCにおいていずれのDCがいかに病態に関わっているのかは不明である。さらにNO産生についてもいずれのDCがより関わっているのか明らかではない。

今年度の研究において、まずPBC患者の肝組織においてNO産生に関与するiNOS (inducible nitric oxide synthase)を染色し、その陽性細胞の分布および細胞の種類について同定を試みた。また、PBC患者のDCサブタイプについて、末梢血DCのフローサイトメトリーの多重染色による解析によりそのバランスおよび表面抗原の変化について解析し、その病態との

関わりを検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. PBC患者肝生検組織のiNOS染色

当科において肝生検によりPBCと診断された11例の針生検組織(1.5-2.0×1.5-2.0mm)を用いてiNOSの染色検討を行った。この11例の年齢は51±14歳で男性2例、女性9例である。Scheuer I, II期が6例、III, IV期が5例であった。

これらの肝組織をホルマリン固定、パラフィン包埋、薄切切片作成後、各染色に使用した。HLA-DRの染色はマウス抗ヒトHLA-DR抗体(Zymed社)、ビオチン化抗マウスイムノグロブリン、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用い、Diaminobenzidine solution (DAB)で発色して行った。またiNOSの染色は、標本を10 mMクエン酸緩衝液を用いてオートクレーブをかけることにより抗原賦活化を行い、マウス抗ヒトiNOS抗体(Santa Cruz社)、ビオチン化抗マウスイムノグロブリン、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンおよびTrue Blueで発色して染色した。CD83の染色は標本をペプシン含有液(0.05% in 0.01N HCL, Wako社)で抗原賦活化したのちマウス抗ヒトCD83抗体(Immunotech社)、ビオチン化抗マウスイムノグロブリン、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンおよびNew Fuchsinで発色して染色した。核染色には Nuclear Fast Red を用いた。二重染色はHLA-DRあるいはCD83の染色をはじめに行い、次にiNOSの染色を行った。

2. PBC患者末梢血DCサブセットのフローサイトメトリーによる解析

当科において肝生検によりPBCと診断された14例のほか、対照として自己免疫性肝炎(AIH)と診断された7例、C型慢性肝炎(CH-C)と診断された9例および健常者(NC) 12例を対象とした。年齢、性別は、PBCが57±11歳、男5例、女9例、AIHが63±3歳、男0例、女7

例、CH-Cが55±8歳、男4例：女5例、NCが49±13歳、男2例：女10例であった。

これらの症例より採取した末梢血からPBMC (peripheral blood mononuclear cell)をFicoll-Conray液 ($r=1.077$)を用いた比重遠心分離により単離し、これにFITC標識抗ヒトlineage cocktail 1抗体(抗ヒトCD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56のカクテル抗体液) (Becton Dickinson社)、Per-CP標識抗ヒトHLA-DR抗体 (Becton Dickinson社)を加え、さらにPE標識抗ヒトCD11c抗体 (Pharmingen社)あるいはPE標識抗ヒトCD123 (Becton Dickinson社)を加えて三重染色をした後、FACS calibur (Becton Dickinson社)で解析した。方法としては、まずFITCとPer-CPのドットプロットによりlineage-HLA-DR+細胞にgateをかけて細胞を選択し、さらにその細胞にPer-CPとPEのドットプロットにおいてHLA-DR+CD11c+細胞あるいはHLA-DR+CD123+細胞にgateをかけて各々のDCサブセットを選択して解析を行った。

統計による検討はstudent-t testを用いて行い、 $p < 0.05$ を有意とした。なお、検討した症例はすべてインフォームドコンセントを獲得した後に検討を行った。

C. 研究結果

1. PBC患者肝組織におけるiNOS陽性細胞の検討

PBC患者肝組織においてiNOSの染色を行ったところ、iNOS陽性細胞は肝小葉内においては比較的円形に近い大型の細胞として散在してみられ、門脈域においては多様な形態をとってみられた。また、特に胆管周囲に注目して観察したところ、一部の胆管において胆管周囲および胆管内にiNOS陽性細胞がみられた。

さらにPBC肝組織中のiNOS陽性細胞数がPBCの病期により変化するかどうかを検討するため、症例をScheuer I, II期とIII, IV期の二群に分けて各々の組織中のiNOS陽性細胞数をカウントして検討した。検討した症例の肝組織はすべて針生検にて得られたものであり、組織の大きさにばらつきが少ないため、肝組織1切片あたりのiNOS陽性細胞数をカウントした。その結果、iNOS陽性細胞数はPBCのScheuer I, II期にやや多いものの、Scheuer III, IV期の組織に比べて有意差は認めなかった。

2. HLA-DRあるいはCD83とiNOSの二重染色による検討

HLA-DRとiNOSの二重染色を行った結果、HLA-DR陽性細胞の一部にiNOS陽性シグナルがみられ、PBCの肝組織においてHLA-DR陽性抗原提示細胞にiNOSの発現を認めた。さらにヒト活性化樹状細胞に比較的特異的に発現しているCD83 (4,7,8) と、iNOSの二重染色を行ったところ、CD83陽性細胞の一部にiNOS陽性シグナルを認め、PBC肝組織においてCD83陽性活性化樹状細胞にもiNOSが発現していることが確認された。

3. PBC患者におけるDCサブセットの検討

PBC患者の末梢血より単離したPBMCを多重染色してFACS caliburでCD11c陽性のミエロイド系樹状細胞(DC1)とCD123(IL-3R)陽性のリンパ球系樹状細胞(DC2)の2つのサブセットを選択し各々のPBMCにおける比率について検討した。その結果、PBC, AIH, CH-C, NCの各群においてDC1のPBMCにおける比率は有意差を認めなかった。また、DC2の比率およびDC1/DC2の比も有意差を認めなかった。さらに各疾患群におけるDC1, DC2の表面抗原の発現強度をFACSscanのデータのGeo Mean値で比較検討した。その結果、DC1においてHLA-DRの発現強度はPBCと他の疾患群との間に有意差は認めなかったものの、AIHとNCとの間で有意な差を認め、AIHではDC1のHLA-DR発現がNCに比べ低下していた($p < 0.05$)。CD11cの発現には各群共に差を認めなかった。また、DC2についてはHLA-DR, CD123ともにその発現強度はPBC, AIHにおいてNCに比べて有意に低下していた($p < 0.01$)。PBC, AIHでは樹状細胞、とりわけDC2の機能が障害されている可能性が示唆された。

D. 考察

末梢血からDCを単離する方法の開発(4)によりヒト末梢血DCの解析は急速に進みつつある。しかし、肝内のDCについての解析はマウスにおいては散見されるものの、ヒトについてはその特異抗体がないこともあり、その性状や機能についての解析は緒についたばかりである。今回我々は、ヒトPBC肝組織について検討し、小葉内および門脈域にiNOS陽性細胞を認め、門脈域では胆管周辺および胆管内にもiNOS陽性細胞を認めた。また、HLA-DR陽性細胞、およびCD83陽性細胞の一部にもiNOS陽性シグナルが確認でき、これらの細胞がNO産生に関わり、さらに病態と関わっている可能性が示唆された。DCあるいはそれに類すると思われる抗原提示細胞がiNOSを発現し、門脈域の胆管周囲に存在することを発見したことは、PBCとDCおよびNOとの関係を調べていく上でその意義は大きい。しかしながらこれらのDCのサブタイプは何か、またそのNO産生による機能変化については不明である。今回の検討において、我々はHLA-DR+iNOS-細胞およびHLA-DR-iNOS+細胞あるいは、CD83+iNOS-細胞、CD83-iNOS+細胞も同定しており、iNOSがどのようなDCに発現しているのかさらに詰めていく必要がある。DCには分化経路が異なるサブセットが存在することが明らかとなってきたおり、CD11c陽性のミエロイド系DC(DC1)とCD11c陰性でCD123陽性でありIL-3とCD40Lにより機能的に成熟するリンパ球系DC(DC2)が提唱されている(5, 6, 9)。PBCの患者においてこのDC1, DC2のサブタイプがいかに病態に関与しているのかは不明であった。今回の検討でフローサイトメトリーによりPBCのDC1, DC2のサブタイプを同定し検討した結果、とりわけDC2のHLA-DRおよびCD123の発現強度の低下を認めた。これまでの報告では、DC1はタ