

イプ1ヘルパーT細胞 (Th1) を活性化して細胞性免疫応答の選択的活性化に関与すると考えられ (5, 10)、DC2は免疫寛容の誘導に作用すると予想されている (11)。そのDC2について抗原提示に関わるHLA-DRとその成熟に関わるCD123の発現強度の低下がみられたことは、PBCにおいてDC2が正常に機能し得ていない可能性を示唆している。さらにDC2の機能異常は免疫寛容の維持に支障を来し、PBCの発症につながる可能性もあると考えられる。今後はさらにこのDC1, DC2を単離して培養し、その機能を詳細に検討することによりPBCとの病態の関わりを究明していく必要がある。

PBCをはじめ自己免疫性疾患において、免疫応答の誘導およびT細胞活性化に関わるDCは重要な役割を果たしている。しかし、DCがPBCの病態にどのように関わっているか、依然究明すべき問題は多い。PBCにおけるDCの機能異常についてさらに研究を進め、その解明および治療法の確立に結びつけていくことが重要な課題であると思われる。

#### E. 結論

PBCにおいて胆管周囲にiNOS陽性細胞を認め、HLA-DR陽性細胞あるいはCD83陽性活性化DCにもiNOSの発現が確認された。またPBC患者DC2のHLA-DR, CD123の発現強度の低下がみられ、DC2の機能異常がその病態に関わっている可能性が考えられた。

#### [参考文献]

- 1) Clup KS, Fleming CR, Duffy J, et al. Mayo Clin Proc 1982; 57; 365-370.
- 2) 阿部雅則, 舛本俊一, 山本和寿, 他: 慢性関節リウマチを合併した原発性胆汁性肝硬変の3例. 愛媛医学 1998; 17; 494-497.
- 3) Yamamoto K, Akbar SMF, Masumoto T, et al. Clin Exp Immunol 1998; 114; 94-101.
- 4) Romani N, Gruner S, Brang D et al. J Exp Med 1994; 180; 83-93.
- 5) Risoan MC, Soumelis V, Kadowaki N et al. Science 1999; 283; 1183-1186.
- 6) Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M et al. Science 1999; 284; 1835-1837.
- 7) Romani N, Reider D, Heuer M et al. J Immunol Methods 1996; 196; 137-151.
- 8) Zhou L-J, Tedder TF. J Immunol 1995; 95; 3821-3835.
- 9) Grouard G, Risoan MC, Filgueira L et al. J Exp Med 1997; 185; 1101-1111.
- 10) Banchereau J, Steinman RM. Nature 1998; 392; 245-252.
- 11) Shortman K, Caux C. Stem Cells 1997; 15; 409-419.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tanimoto K, Akbar SMF, Michitaka K et al: Immunohistochemical localization of antigen presenting cells in liver from patients with primary biliary cirrhosis; highly restricted distribution of CD83-positive activated dendritic cells. Pathol Res Prac 1999; 195; 157-162.

##### 2. 学会発表

谷本憲治, SMF Akbar, 小林史代, 他

原発性胆汁性肝硬変におけるCD83陽性樹状細胞の局在に関する検討

第10回日本樹状細胞研究会 (1999年11月14日、愛知)

岡崎彰仁, 谷本憲治, SMF Akbar, 他

原発性胆汁性肝硬変におけるHLA-DR陽性抗原提示細胞のiNOS発現に関する免疫組織学的検討

第10回日本樹状細胞研究会 (1999年11月14日、愛知)

#### 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

##### 3. その他

なし

# 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にみられる肉芽腫性病変の病理学的意義

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 主任教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）で特徴的にみられる肉芽腫性病変の形成および免疫学的機序の解明と、菌体成分が肉芽腫形成のトリガーとなっている可能性を検討した。PBC症例の37%に類上皮肉芽腫が見られ、胆管炎、門脈域の炎症が高度になるにつれ類上皮肉芽腫の出現頻度も増加していた。また、PBCの肉芽腫の周囲にオステオポンチン陽性の単核細胞や樹枝細胞様の形態を示すS-100陽性細胞が散見され、肉芽腫部にはHLA-DRおよびCD1dの発現を認めた。胆汁中および肉芽腫内に種々の腸内細菌由来の遺伝子を検出できた。肉芽腫の形成に様々な免疫応答が関与していると考えられ、免疫応答の抗原として腸内細菌由来の菌体成分である可能性が示唆された。

### 分担研究者

中沼安二

金沢大学医学部病理学講座第二 教授

### A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）で特徴的にみられる肉芽腫性病変の形成および免疫学的機序の解明と、胆汁中および肉芽腫性病変部から細菌遺伝子の検出を行い、PBCに出現する肉芽腫性病変が細菌菌体成分に対する組織球反応による可能性について考察した。

### B. 研究方法

#### 1. 組織学的検討

PBC239例を対象に、門脈域内類上皮肉芽腫をサーベイし、同時に組織学的病期と胆管消失、門脈域の炎症、胆管炎の程度との相関性を検討した。次に、肉芽腫を伴うPBC12例の組織切片を対象に、組織球遊走因子としてオステオポンチン、抗原提示細胞マーカーとしてS-100、MHC関連分子としてHLA-DR、CD1dの免疫染色を行った。

#### 2. 細菌遺伝子の分子生物学的検出

細菌16S rRNA遺伝子領域内からuniversal primerを設定し、PCRにて細菌遺伝子断片を増幅、そのPCR産物をsubcloning後、10個程度のコロニーを採取し、各コロニーに導入されたPCR産物の塩基配列をサイクルシークエンス法により決定した。まず、胆汁中における細菌16S rRNA遺伝子を検出するため、PBC15例、胆嚢結石11例の胆嚢胆汁を対象とした。これらの胆汁は、肝移植時または胆嚢摘出の際に切除された胆嚢から無菌的に採取し、DNAを抽出後、PCRのテンプレートとした。使用したuniversal primerは、10F（5'-AGTTTGATCCTGGCTC-3'）と520R（5'-ACCGCGGCTGCTGGC-3'）で、PCR産物は約510塩基対。

次に、肉芽腫部における細菌16S rRNA遺伝子を検出するため、肉芽腫が見られたPBC4例のホルマリン

固定パラフィン包埋肝組織切片のHE染色標本を対象に、マイクロダイセクションシステムを用いて肉芽腫部または門脈域周囲の肝細胞のみを選択的に採取し、DNAを抽出後、PCRのテンプレートとした。使用したuniversal primerは、1400F（5'-TGTCACACCCGC CCGT-3'）と1540R（5'-AAGGAGGTGATC CA GCC-3'）で、PCR産物は約140塩基対。

### C. 研究成果

#### 1. 組織学的検討

PBC症例の37%に門脈域内類上皮細胞が見られ、胆管炎、門脈域の炎症が高度になるにつれ類上皮肉芽腫の出現頻度も増加していた。またPBCの肉芽腫の周囲にオステオポンチン陽性の単核細胞や樹枝細胞様の形態を示すS-100陽性細胞が散見され、肉芽腫部にはHLA-DRおよびCD1dの発現を認めた。

#### 2. 細菌遺伝子の分子生物学的検出

胆汁における細菌16S rRNA遺伝子を検出したところ、PBC15例中10例(66%)、胆嚢結石11例中8例(73%)に細菌DNA由来のPCR産物が検出できた塩基配列を解析したところ、PBC胆汁からはあらゆる腸内細菌が同定され、特にグラム陽性球菌由来の遺伝子が多く検出された(表1)。胆嚢結石胆汁からも種々の腸内細菌が同定されたが、グラム陰性菌が主として検出された。

肉芽腫および肝細胞のみから抽出したDNA材料から細菌16S rRNA遺伝子を検出したところ、すべてのDNA材料から細菌DNA由来のPCR産物が検出できた。塩基配列から細菌種を同定したところ、あらゆる腸内細菌が同定された(表2)。肉芽腫と肝細胞部との間で同定菌種の相違を検討したところ、肉芽腫部ややグラム陽性桿菌の頻度が高い傾向があり、特にLactobacillus属菌は肉芽腫部のみから高頻度に検出された(表2)。

#### D. 考察

今回の検討より、門脈域内類上皮肉芽腫は37%のPBC症例に出現し、胆管炎および門脈域の炎症の程度と相関して出現頻度も高くなり、胆管及び門脈域内の炎症の原因と類上皮肉芽腫の発生との間に密接な関連性があるものと考えられた。免疫組織化学的検討により、肉芽腫内および周囲に樹状細胞類似のS-100陽性細胞が多く見られたことから、肉芽腫形成に抗原提示を介した活発な免疫応答が関与していると推測された。また、肉芽腫の周囲にオステオポンチン陽性単核細胞を認めたことより、組織球のあらたなりクルート、組織球相互の接着や食食機能の促進が持続的におこっていると推測され、肉芽腫の形成および維持に関与しているものと考えられた。このようなオステオポンチンの所見は、結核結節、珪肺結節などのその他の肉芽腫性病変でも報告されており、PBCに特異的な所見ではなく、一般的な肉芽腫形成の機序に関連した所見と考えられる。CD1dは、糖脂質成分をT細胞に抗原提示しうる唯一の分子であり、グラム陰性菌の壁成分であるlipopolysaccharide(LPS)、グラム陽性菌の壁成分であるlipoteichoic acid (LTA)などの脂質抗原も抗原提示しうる。今回の検討により、肉芽腫の類上皮細胞にHLA-DRおよびCD1dの発現を認めたことは、MHC-class II/ペプチド複合体のみならずCD1d/糖脂質複合体をも表出していると考えられ、LPSやLTAなどの菌体脂質成分が肉芽腫反応の抗原となっている可能性が挙げられる。

PBCの病態発生と細菌感染症との関連性は、多く報告されているものの、賛否両論で統一した見解は得られていない。しかし、PBC患者血清中に特異的に出現するミトコンドリア抗体 (AMA) が大腸菌などの細菌由来のミトコンドリアと交差反応を示すことやAMAの対応抗原であるピルビン酸脱水素酵素のE2成分 (PDC-E2)は種を越えてよく保存されていることから、自己反応性T細胞の活性化機序として分子相同性の可能性が想定されている。今回のuniversal primerを用いた分子生物学的手法により、胆汁および組織切片から腸内細菌由来の遺伝子が検出でき、あらゆる菌体成分が腸管から胆汁や肝組織内に流入しているものと推測された。また、PBC胆汁材料およびPBC組織切片から検出し得た菌種のなかで共通の傾向は見られなかったが、肝組織内の肉芽腫部にLactobacillus属菌が高頻度かつ特異的に検出され、このような腸内細菌の流入が肉芽異種反応の抗原となっている可能性が考えられた。

肉芽腫性病変の発生に、炎症刺激因子の特殊性と宿主の免疫反応の両者が重要な役割を果たす。今回の検討から、炎症刺激因子として何らかの菌体成分が抗原となっているものと推測された。しかし、肉芽腫形成の免疫学的機構のみならずPBCの病因を解明するためには、樹状細胞の機能障害などの宿主側免疫応答の検討も必要であり、今後さらなる検討を要する。

#### E. 結論

肉芽腫の形成に様々な免疫応答が関与していると考えられ、免疫応答の抗原として腸内細菌由来の菌体成分である可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

・Hiramatsu K, et al. Amplification and Sequence Analysis of Partial Bacterial 16S Ribosomal RNA Gene in Gallbladder Bile from Patients with Primary Biliary Cirrhosis. J Hepatol (in press)

・Tsuneyama K, et al. : Increased CD1d expression on small bile duct epithelium and epithelioid granuloma in livers in primary biliary cirrhosis. Hepatology 1998; 28: 620-623.

・Harada K, et al. Epithelioid cell granulomas in chronic hepatitis C: immunohistochemical character and histological marker of favourable response to interferon- $\alpha$  therapy. Histopathology 1998; 33: 216-221.

##### 2. 学会発表

平松活志ら、原発性胆汁性肝硬変患者の胆汁中 Bacterial 16S rRNA geneの検討、第二回日本肝臓学会大会

表1 Sequencing results of colonies

Bacterial species		PBC	GB stone
<i>Staphylococcus aureus, hemolyticus</i>	G(+), coccus	41	
<i>Enterococcus faecium, saccharolyticus</i>	G(+), coccus	20	4
<i>Streptococcus pneumoniae, mitis</i>	G(+), coccus	14	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	G(+), rod	8	
<i>Helicobacter pylori</i>	G(-), hilical	4	
<i>Propionibacterium acnes, Mycobacterium chitae</i>	G(+), rod	4	7
<i>Lactobacillus gasseri, acidophilus</i>	G(+), rod	4	
<i>Clostridium sordellii</i>	G(+), rod	1	
<i>Micrococcus luteus</i>	G(+), coccus	1	
<i>Pseudomonas aeruginosa**</i>	G(-), rod		23
<i>Esherichia coli **</i>	G(-), rod		20
<i>Clostridium perfringens</i>	G(+), rod		18
<i>Sutterella wadsworthia</i>	G(-), hilical		8
Total		97	80

表2 Sequencing results of colonies

Bacterial species		Granuloma	Hepatocyte
<i>Lactobacillus sp.</i>	G(+), rod	13	
<i>Pseudomonas / Sphingomonas sp.</i>	G(-), rod	6	5
<i>Streptococcus sp.</i>	G(+), coccus	6	2
<i>Xanthomonas / Stenotrophomonas sp.</i>	G(-), rod	3	8
<i>Staphylococcus sp.</i>	G(+), coccus	3	5
<i>Paenibacillus sp.</i>	G(+), rod		2
<i>Bacillus sp.</i>	G(+), rod		1
<i>Micrococcus sp.</i>	G(+), coccus		1
<i>Enterococcus sp.</i>	G(+), coccus		3
Others		5	6
Total		36	33

# 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におけるT細胞エピトープの解析と病因分子の推定

分担研究者 石橋大海 九州大学大学院医学系研究科病態修復内科学 助教授

研究要旨：PBCの病態形成に深く関わっていると考えられる抗ミトコンドリア抗体の対応抗原に対するT細胞のエピトープを同定し、T細胞による認識様式を解析することにより、PBCの病態理解を深め、病因を明らかにする。さらに、抗原特異的な免疫療法を開発することを目的とする。本研究では、同定したT細胞エピトープをもとにアナログペプチドを作成し、それに対するT細胞の反応性を解析することにより、①PBC患者のT細胞は大腸菌由来ペプチドのみでなく、他のいくつかの細菌由来ペプチドに対しても反応する、②自己反応性T細胞の相同ペプチドに対する多様な反応性より、PBCの免疫病態の形成にT細胞による自己抗原認識の分子相同性が関与する可能性がある、ということを明らかにした。

### A. 研究目的

本研究の目的は、PBCの病態形成に深く関わっていると考えられる抗ミトコンドリア抗体の対応抗原のT細胞のエピトープを同定し、抗原特異的T細胞による抗原認識様式を解析することにより、PBCの病態理解を深め、病因分子を明らかにし、さらにはこの情報をもとに抗原特異的な免疫療法を開発することである。

自己免疫疾患の病因、病態形成に関与する機序として、分子相同性という概念が自己反応性T細胞活性化の重要なメカニズムとして提供されてきた。この仮説に従えば、T細胞がウイルスや細菌といった外来抗原を認識することにより活性化し増殖し、その外来抗原と相同性のある自己抗原を認識するようになることにより自己免疫疾患の発症、病態形成が進展すると考えられる。分子相同性の機序の存在は既にいくつかの自己免疫疾患の動物モデルで実証されているが、いまだ自己反応性T細胞の活性化を起こす分子相同性のある外来抗原の検索の数は限られているのが現状である。

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は抗ミトコンドリア抗体の出現と細胆管の炎症を特徴とする自己免疫性の慢性胆汁うっ滞性肝疾患である。抗ミトコンドリア抗体の主要対応抗原はピルビン酸脱水素酵素E2コンポーネント(PDC-E2)であることが明らかにされている。我々は先に、PBC患者のHLA-DR53 (DRA1\*0101/DRB4\*0101) 拘束性T細胞エピトープはPDC-E2 163-176 (GDLLAEIETDKATI) であることを同定し、T細胞の認識にはこのうち、170番のグルタミン酸(E)、172番のアスパラギン酸(D)、173番のリジン(K) (ExDK配列) が重要であることを明らかにした。さらにPDC-E2 163-176特異的T細胞クローンの一部は大腸菌由来のPDC-E2抗原(EQSLITVEGDKASM)にも交差反応性を示す、いわゆる分子相同性の機序がPBCの発症や病態形成に関与している可能性を示唆してきた。

### B. 研究方法

PBC患者および健常者よりヒト PDC-E2 163-176 ペプチド特異的T細胞クローンを樹立する。ヒト PDC-E2 163-176 ペプチド上のT細胞エピトープと相同性を示す微生物等の外来抗原および自己抗原をコンピューターホモロジーサーチで検索し、合成ペプチドを作成する。T細胞クローンとこれらの合成ペプチドとの反応性を検討し、ペプチド間での交差反応性を解析する。

(T細胞の採取は本人の了解を得て行った。)

### C. 研究結果

HLA DR 5 3陽性のPBC患者5人、及び健常者3人の末梢血よりリンパ球を分離し、PDC-E2 163-176 ペプチド抗原をパルス刺激した自己の抗原提示細胞と継代培養を続けることで、ヒトPDC-E2 163-176ペプチド特異的T細胞クローンを樹立した。

PBC患者より計7株、健常者より計6株のヒトPDC-E2 163-176 ペプチド特異的T細胞クローンを樹立できた。全てのT細胞クローンの細胞表面マーカーはCD3、CD4、CD45RO陽性の活性型ヘルパーT細胞であった。

次にコンピューターホモロジーサーチを行いアミノ酸配列にExDK配列を持つペプチドを選び、その中から微生物をはじめとする外来抗原23種と自己抗原7種の計30種を更に選び、このExDK配列を含む合成ペプチドを計30種作成した。これらを抗原として、さきに樹立したヒト PDC-E2 163-176 ペプチド特異的T細胞クローンとの交差反応性を検討した。

ヒトPDC-E2への反応性 ( stimulation index ) は、PBC患者由来のT細胞クローンでは7.2~45.3 (平均±S.D.; 16.3±13.3)、健常者由来のT細胞クローンでは3.4~15.8 (10.5±5.4) であった。

T細胞クローンの分子相同性のある抗原との交差反応性の検討では、23種の外来抗原のうち *Neurospora crassa* PDC-E2, *E. coli* OGDC-E2, *Neisseria meningitidis* outer membrane protein P64K, *Acholeplasma laidlawii* PDC-E2, *Azotobacter*

*vinelandii* PDC-E2, *Pseudomonas putida* PDC-E2, *E. coli* PDC-E2といった細菌由来の計7種がそれぞれ1~5株のT細胞クローンと交差反応性があった。これとは対照的に、自己抗原7種に反応するT細胞クローンは存在しなかった。分子相同性を有する抗原へのT細胞クローンの反応性は、ヒトPDC-E2に対してよりも高い群と、低い群に分類された。ヒトPDC-E2に対してよりも反応性が高い群に含まれるT細胞クローンは2株存在したが、これらは健常者由来のものであった。

次に、T細胞クローンのサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4)産生を測定した。IFN- $\gamma$ 産生は0.32-14.96ng/mlと高かったが、IL-2は0.1-0.8U/ml, IL-4は0-0.6pg/mlと低かった。IFN- $\gamma$ とIL-4の産生パターンから、今回樹立したT細胞クローンは全てTh1様タイプのT細胞と考えられた。

#### D. 考察

自己反応性T細胞は様々な自己免疫性疾患の進展過程で中心的な役割を担っていると考えられているが、これら自己反応性T細胞の活性化、増殖に関わる機序の一つとして分子相同性が想定されている。

本研究で、我々はPBCの発症あるいは進展に関わる分子相同性のある抗原の役割を更に追求するために5名のPBC患者から7株、および3名の健常者から6株のヒトPDC-E2 163-176特異的T細胞クローンを樹立し、これらのT細胞クローンとExDK配列を持った分子相同性のある抗原との交差反応性を検討した。その結果は以下のように要約される。

(1)7種類の異なる細菌由来の抗原が少なくとも1株以上のT細胞クローンを活性化した。この反応に、PBC患者由来のT細胞と健常者由来のT細胞の間に差はなかった。

(2)これらの抗原のアミノ酸配列は、LXaXXaEXD KXaXXa (Xは任意のアミノ酸, XaはA, V, I, L, Mといった疎水性アミノ酸)であった。

(3)これらの分子相同性のある抗原に対するT細胞クローンの反応性はそれぞれのT細胞クローンで異なっていたことより、ヒトPDC-E2反応性T細胞クローンの抗原認識の多様性が明らかになった。

(4)ある種の相同性のある抗原は、ヒトPDC-E2抗原よりも更に高いT細胞反応性を有することが判明した。

(5)今回樹立したT細胞クローンは全て、Th1様タイプのCD4陽性細胞であり、このサイトカイン産生パターンは分子相同性のある外来抗原を用いたときと同様であった。

以上のことから、多発性硬化症など他の自己免疫疾患で提唱されている分子相同性の概念はPBCにおけるT細胞による抗原認識機構にも関与していることが示唆された。さらに、健常者由来のT細胞においても分子相同性が認められたことから、元来外来抗原のみならず、自己抗原にも反応可能なT細胞が、健常者においても準備されていることが推察された。外来抗原

に感作されることで、以前から存在していたこれらのT細胞が活性化T細胞となって増殖し、分子相同性の機序により自己抗原に反応し始める、あるいは、非活性状態にあった自己反応性T細胞が、自己抗原と分子相同性を示す外来性抗原と反応することにより活性化し増殖することが、自己免疫疾患発症と病態修飾の一因であることが推察された。

自己免疫疾患の発症因子として特定の外来抗原が特定できている疾患はないが、ある特定の抗原あるいは不特定多数の抗原で、自己抗原特異的T細胞が活性化されていく可能性が示唆された。今後は今回同定し得た外来抗原を含む感染が、実際にPBCをはじめとする自己免疫疾患の発症因子となっているのかを証明していくことが必要である。

#### E. 結論

ヒトPDC-E2 163-176に分子相同性を示す大腸菌由来ペプチドのみでなく、他のいくつかの細菌由来ペプチドに対しても反応するT細胞がPBC患者末梢血には存在する。自己反応性T細胞の相同ペプチドに対する多様な反応性より、PBCの免疫病態の形成にT細胞による自己抗原認識の分子相同性が関与する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1)Ishibashi, H., Shimoda, S., Shigematsu, H., et al. Immune pathophysiology of primary biliary cirrhosis. Progress in Hepatology Vol.5 Liver and Immunology, Yamanaka, M., Toda, G., Tanaka, T., ed., p105-115, 1999

2)Ishibashi, H., Fukuhsima, N., Matsui, M., et al. Identification of the epitope of anti-PDC-E2 antibodies and analysis of their immunoglobulin genes. - mechanism of the production of antimitochondrial antibody. Autoantibodies and Autoimmunity '99, Nagoya, 1999, 25-32.

3)Ishibashi, H., Shigematsu, H., Shimoda, S., Nakamura, M. <symposia > Antigen peptide analog: Induction of T cell anergy in primary biliary cirrhosis. Internal Medicine 38(2): 173-175, 1999

4)Quaranta, S., Van de Water, J., Ishibashi, H., Rosina, F., Coppel, R., Uibo, R., Gershwin, M. E. The immunopathogenesis of primary biliary cirrhosis. Hepato-Gastroenterol 46: 1-7, 1999

5)Kinoshita, H., Omagari, K., Whittigham, S., Kato, Y., Ishibashi, H., et al. Autoimmune cholangitis and primary biliary cirrhosis. - An autoimmune enigma. Liver, 19(1): 122-128, 1999

6)Takasaki, S., Hayashida, K., Morita, C., Ishibashi, H., Niho, Y. Elevated serum soluble CD8 level in autoimmune hepatitis and the effect of corticosteroid therapy. Hepatol Res 15(1): 52-

63, 1999

2. 学会発表

1)重松宏尚, 谷本博徳, 具嶋敏文, 一木康則, 下田慎治, 林田一洋, 中村 稔, 石橋大海, 仁保喜之, 松下 祥, 西村泰治。原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 患者におけるピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDC) 由来ペプチド反応性T細胞の修飾ペプチドによる制御, 日本消化器免疫学会, 1998.7.3, 高松

2)下田慎治, 重松宏尚, 坂本典子, 谷本博徳, 具嶋敏文, 中村 稔, 林田一洋, 石橋大海, 仁保喜之。原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における, 抗ミトコンドリア抗体の主要対応抗原肝でのT細胞レベルの反応性について, 第36回消化器免疫学会総会, 1999.7.24, 仙台

3)Ishibashi, H. Symposium: Autoimmune liver disease - its recent advance - , Primary Biliary Cirrhosis. Identification of real antigen and pathophysiology of PBC  
International Symposium, DDW-Japan 1999, 1999.10.30, Hiroshima

# 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におけるT細胞の解析および抗セントロメア抗体の意義

分担研究者 辻 孝夫

岡山大学医学部第一内科教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変(PBC)3例を対象とし、病因と関わるTリンパ球を解明する目的で肝組織中および末梢血中のT細胞レパトアにつき検討した。またPBC93例について、抗セントロメア抗体(ACA)の臨床的意義につき検討を行った。2カ所からの生検において、共通のT細胞クローンが認められ、PBCの病因に関わるT細胞クローンの可能性が示唆され、また同一のクローンが末梢血においても検出された。抗原認識に関わるCDR3領域のアミノ酸配列より共通のアミノ酸配列が観察された。またステロイド治療前後で、クローン数が明らかに減少した。一方ACA陽性群では自己免疫性疾患の合併が多く認められ、予後の検討から予後良好の傾向がみとめられた。以上より、肝組織中および末梢血中にPBCの病因に関わるT細胞クローンの存在が示唆された。またACA陽性群は予後が良好である可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

PBCの病因と関わるT細胞クローンにつき肝組織中および末梢血中のT細胞レパトアを解析した。一方、ACAは限局性の強皮症に出現するが、PBCにおいてもしばしば出現する。そこでACA陽性のPBC症例につき臨床的に検討した。

#### B. 対象と方法

PBC 3例を対象に生検肝組織および治療前後の末梢血単核球(PBMC)からT細胞レセプターのb鎖(TCR Vb)についてRT-PCR, SSCPにて解析した。特定のバンドについては、direct sequenceによりCDR3領域の塩基配列を決定した。一方、胆道系酵素の上昇を認め、腹腔鏡、肝生検よりPBCと診断された93名を対象に、ACAの有無による臨床的背景因子、生化学的所見、肝病理所見および予後につき検討した。

#### C. 研究結果

TCR VbのSSCP法による解析では、ほとんどのVbファミリーにおいて、T細胞のクローナルな増殖が示された。2カ所の組織に共通のクローンが存在していた。末梢血中にも同一のクローンが存在することが示された。同一の症例ではCDR3のアミノ酸配列に一部共通性が認められ、対応する抗原ペプチドが限定されている可能性が示唆された。またVb16CD4 T細胞クローンが3例に共通に認められた。さらに治療後クローナルな集積は減少していた。

PBCでは93例中29例31%にACAが認められ、他の肝疾患ではほとんど検出されなかった。ACAの有無では、肝組織像でScheuer I期の症例が有意に多く認められ、IgG, IgM値はACA陽性群が有意に低値であった。また自己免疫性肝疾患の合併率はACA陽性群で有意に高率に認められCREST症候群、強皮症、レイノー現象の合併頻度が高率であった。

ACA陽性群では黄疸出現例1例、肝不全・移植例1例であったが、ACA陰性例では黄疸出現例3例、

肝不全・移植例8例で、ACA陰性例において進行例が多い傾向にあった。Kaplan-Meyer法による予後の検討では、ACA陰性群において累積生存率が低い傾向があったが、有意差は認められなかった。

#### D. 考案

今回の検討では、異なる2カ所からの肝組織中に共通のクローンが存在すること、同一患者の末梢血中CD4またはCD8の分画に同一のクローンが存在することを明らかにした。さらにこれらのクローンについて、CDR3領域のアミノ酸配列の解析より、共通のアミノ酸配列が存在することから、特定の抗原に反応しているT細胞の可能性が推察される。またプレドニゾン治療後、クローン数は治療前に比較して減少していた。プレドニゾンによる治療により、病因と関わるクローンが減少・消失した可能性が示唆される。一方、ACAは強皮症、特に限局性のものに高頻度に出現するが、肝疾患ではPBCに特異的に出現する。我々はPBCにおけるACAの意義について検討したところ、ACA陽性群は不全型のCREST症候群を合併する頻度が高く、免疫グロブリンが低値であった。また肝組織学的所見および予後の検討からACA陽性群は進行の軽い症例、また進行が遅い傾向が示唆された。症例数の点から有意差は認められていない。今後多数例での検討が必要である。

#### F. 研究発表

##### 2. 学会発表

第3回肝臓学会大会, 1999, 10

50th annual meeting of AASLD, 1999, 11

# 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) の bezafibrate による治療

分担研究者 大西 三朗 高知医科大学 第一内科 教授

研究要旨：bezafibrateが非硬変PBCの症状、生化学的検査を改善することが明らかとなり、長期投与で肝の組織学的改善も期待されることが示唆された。

### A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)の内科的治療にはもっぱらウルソデオキシコール酸(UDCA)が用いられているが、その効果は必ずしも十分とは言えず、進行し肝移植の適応になる症例も少なくない。コルヒチンやアザチオプリンなど種々の治療薬が試みられたが、いずれも効果が十分でなく使用されるにはいたらなかった。Bezafibrateは高脂血症にひろく用いられている薬剤であるが、遺伝性胆汁うっ滞症で変異が認められるMDR3遺伝子の転写を促進し、それを介してリン脂質の胆汁中への排泄を促すことで、細胞障害性胆汁酸の不活化作用を発揮していることが明らかになった。本研究の目的は主にUDCA無効症例でのbezafibrateの効果を検討することにある。既に報告した12ヶ月投与を行った11症例全例で生化学検査の改善をみており、症例を逐次追加して長期投与での生化学的検査、組織学的変化を検討する。

### B. 研究方法

対象症例は非硬変PBC14例(男性4例、女性10例、平均年齢60.7才)。12例は先行するUDCA投与(平均34ヶ月)でalkaline phosphatase値が正常の1.5倍以上にとどまった症例である。このうち10例はbezafibrateを追加、UDCAと併用投与を行った。2例はUDCA中止後にbezafibrateの単独投与を行っている。残り2例は始めからbezafibrateの単独投与を行った。Bezafibrateは400mg/day経口投与、UDCAは600mgまたは900mg/dayで観察期間は4ヶ月から31ヶ月、平均20ヶ月であった。4例が症候性であった。3例でbezafibrate投与開始1年後に肝生検施行、そのうち1例は31ヶ月後に再度肝生検を施行した。なお、すべての患者でインフォームドコンセントを得ている。

### C. 研究結果

胆道系酵素は全例において有意に低下した。11例で投与開始1年後においてALPは15.6%~72.9%、平均51.9%、g-GTPは22.3%~67.1%、平均44.5%の低下を示した。いずれの症例においても投与開始後2ヶ月で急速に低下しその後は緩やかに低下していく傾向がみられた。トランスアミナーゼも有意に低下した。一例投与開始直後に一過性のトランスアミナーゼ上昇をみたがその後次第に低下し6ヶ月以内に前値に復し

た。その他の症例ではFenofibrateでみられる一過性のトランスアミナーゼ上昇は認めていない。また、IgM値も投与前高値を示したものでは胆道系酵素の低下にやや遅れて低下している。全身倦怠感あるいは搔痒感をともなった症候性患者4例では投与開始約2ヶ月で症状の消失が認められた。組織学的所見は3例でbezafibrate投与開始12ヶ月後に施行されたが、炎症性変化、線維化の明らかな変化を認めなかった。このうち1例ではbezafibrate投与開始後31ヶ月で肝組織の再評価が行われ、門脈域の炎症の鎮静化とともに線維化の改善が認められた。この症例では線維化のマーカーであるヒアルロン酸、IV型コラーゲン7Sドメインの低下が20ヶ月以降で認められた。

### D. 考察

1. bezafibrateは症候性PBCの症状を消失させた。2. bezafibrateはUDCAで効果不十分なPBC症例において肝胆道系酵素を持続的に低下させうる。3. bezafibrate単独投与でも同様の作用が期待される。4. bezafibrateによりIgM値の低下が認められ、免疫系への関与が示唆された。5. bezafibrateは安全に投与が可能で、長期投与により組織学的改善が期待される。

### E. 結論

bezafibrateは非硬変PBCの症状、生化学的検査を改善し、長期投与で肝の組織学的改善も期待されることが示唆された。

### F. 研究発表

Iwasaki S, Tsuda K, Ono M, et al; Bezafibrate may have a beneficial effect in pre-cirrhotic primary biliary cirrhosis. *Hepatology Research* 1999;16:12-18.

# 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症におけるbezafibrate投与の有効性に関する検討

分担研究者 井上 恭一 関西医科大学 第三内科 教授

研究要旨：非硬変期の原発性肝硬変患者にbezafibrate (BF)を投与するとmultidrug resistant3 (MDR3) mRNAの発現誘導を介して血液生化学的所見を改善させることが明らかになり、BF投与前後でMDR3 mRNA発現量を比較することで治療効果が推測できることが示唆された。

#### A. 研究目的

BFを投与することにより発現誘導されるMDR3 P-glycoproteinがPBCに与える影響を血液生化学的検査ならびに分子生物学的手法を用いて検討する。

#### B. 研究方法

非硬変PBCのBF投与群(8例)を対象とし、BF投与前と投与2ヶ月後の血液生化学検査を比較検討した。さらに、非硬変PBCのBF投与群(4例)、非投与群(3例)と正常コントロール群(各2例)の計9例を対象に、全血から精製したヒト白血球中のtotal RNAを用いてRT-PCR法によりMDR3 mRNAの発現を観察し、BF投与によるMDR3 mRNAの発現増強の有無を検討した。

#### (倫理面への配慮)

対象患者に研究内容を説明し、採血の同意を得た。

#### C. 研究結果

PBCのBF投与群は非投与群に比較して有意に胆道系酵素が改善していた。BF投与群はBF非投与群や正常コントロール群に比してMDR3 mRNAの発現増強が明らかであった。また、MDR3 mRNA発現量が多いものほど肝機能検査値の改善がみられる傾向があった。

#### D. 考察

非硬変PBCではBF投与によりMDR3 の発現を介して胆道系酵素の改善が得られており、MDR3 mRNA発現量の測定により治療効果が推測できることが示唆された。

#### E. 結論

BF投与はMDR3 mRNA発現誘導を介して非硬変PBCの血液生化学的所見を改善させることが明らかになり、BFがPBCの治療薬になり得るものと考えられた。また、BF投与前後で白血球中のMDR3 mRNA発現量を比較することで治療効果が推測できる可能性

## c. 国立病院ネットワーク

# 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

初発時に急性肝炎（非A～C型）と診断された自己免疫性肝炎症例について

分担研究者 矢野 右人 国立長崎中央病院 病院長

研究要旨：非A-C型急性肝炎と診断された急性肝障害症例232例の経過追跡により、そのうちの約3%（7例/232例）が急性肝炎様発症形式を呈した自己免疫性肝炎であることが明らかになり、いずれもステロイド製剤による治療が著効した。

### A. 研究目的

初診時に非A-C型急性肝炎と診断された症例の中には、急性肝炎様の臨床像を呈した発症早期の自己免疫性肝炎が混在している可能性がある。これらを早期に正確に診断することは適切な治療を行う上で非常に重要であるため、我々は非A-C型散発性急性肝炎症例の経過追跡を行い、自己免疫性肝炎への移行の有無と、移行例の臨床像を解析した。

### B. 研究方法

1991年から1998年までの間に国立病院急性肝炎共同研究班で登録された散発性急性肝炎831例（薬剤性肝障害とアルコール性肝障害は除外）を対象とし、非A-C型急性肝炎と診断された症例の経過観察中に自己免疫性肝炎へと移行した症例の有無を調査した。自己免疫性肝炎診断基準には、International autoimmune hepatitis group が提唱したrevised scoring system (1999年)を用いた。また、既知の肝炎ウイルス（A、B、C型）による急性肝炎罹患後の自己免疫性肝炎の併発の有無についても併せて検討した。

### C. 研究結果

急性肝炎831症例の内訳は、A型371例（44.6%）、B型158例（19.0%）、C型70例（8.4%）、非A-C型は232例（27.9%）であった。非A-C型肝炎232例のうち7例（3.02%）が経過観察中に自己免疫性肝炎（疑診も含む）へ移行した。この内、初診時に肝生検が可能であった4例の肝繊維化所見は全例F0であった。また、既知の肝炎ウイルス感染を契機に発症したと思われる自己免疫性肝炎例は、A型肝炎罹患後に2例（0.54%）認められたが、B、C型肝炎後には認められなかった。

### D. 考察

非A-C型急性肝炎と発症初期の自己免疫性肝炎の臨床像には大差は見られず、後者の発症に未知のウイルス感染が関与している可能性は低いと考えられる。

### E. 結論

非A-C型急性肝炎症例の約3%が急性肝炎様発症を呈した初期自己免疫性肝炎症例であった。

### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
第74回日本消化器病学会九州支部例会シンポジウム（非A非B非C型肝炎障害の病態と臨床）

### 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
3. その他  
特になし。

# 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

国立病院・療養所における原発性胆汁性肝硬変症例のデータベース構築の試み

分担研究者 酒井 浩徳 国立病院九州医療センター 消化器科医長

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変症について、国立医療施設の情報ネットワーク(HOSP-NET)を活用したデータベースの構築を目的として、国立病院・療養所における調査および統計解析を行なった。今後の充実と実際の運用に関しては、検査所見の統一化、HOSP-NET上での利用のためのプロトコル確立やデータ収集の方法と情報開示(HOSP-NET上での統計解析結果の提示)、登録症例の管理(追跡調査など)などのさらなる検討が必要である。

### A. はじめに

原発性胆汁性肝硬変症(PBC)は自己免疫性肝炎とともに代表的自己免疫性肝疾患である。その臨床像や病態はきわめて特徴的であり、疾患概念が確立して50年近く経過した今日においても未だほとんど病因が解明されていないこともあって、多くの研究者の心を引きつけている。しかし、PBCに関する知識が医師の間に浸透するにつれてPBCと診断される症例は増加してきているものの、ウイルス性肝疾患に比べて発生頻度は低い。従ってその研究の第一歩はきちんとした症例の集積にあると思われる。

今回、国立医療施設の情報ネットワーク(HOSP-NET)を活用し、国立病院・療養所における全国横断的な調査と継続的な症例の追跡、さらにはその情報の集積・処理・管理を行なうための作業環境を整え、将来の「インターネットを用いた臨床試験導入」候補症例として、また、疫学調査、予後調査、病因解明の一助としての利用を念頭に置いたデータベースの構築を行なった。

### B. 対象と方法

PBCおよびその類縁疾患(自己免疫性胆管炎、原発性硬化性胆管炎など)で、調査期間(平成10年4月8日から4月24日まで)の間に入院または外来診療を行った症例を調査対象とした。国立病院・療養所肝疾患ネットワーク症例研究班施設および班友施設を調査対象施設として、1症例1調査用紙記入方式を用い、郵送またはFAXによる回収という調査方法で調査を行なった。調査項目は、調査日・患者氏名・性別・生年月日・患者属性(既往歴・飲酒歴・輸血歴・家族歴・薬剤服用歴・手術歴・合併症)・臨床診断および診断根拠(肝生検組織所見・抗ミトコンドリア抗体・抗M2抗体・免疫グロブリン分画定量)・臨床検査成績・肝炎ウイルスマーカー・各種自己抗体・治療歴・転帰とした。以上の項目について各施設での調査結果をもとに統計解析及びデータベース作製を行なった。

### C. 結果

調査回答施設は国際医療センター・東京病院・横浜病院・横浜東病院・習志野病院・霞ヶ浦病院・西埼玉

病院・相模原病院・金沢病院・福山病院・大阪病院・呉病院・小倉病院・大分病院・九州医療センター・長崎中央病院の16施設であった。北海道、東北地方、四国地方の参加がなく調査施設の分布に地域の偏りが認められた。集積症例はPBC 245例(確診例 195例、疑診例47例)および自己免疫性胆管炎 3例であった。症例の男女比は28:217(男性:女性)と多くの自己免疫性疾患と同様に圧倒的に女性が多く、平均年齢は61.5±10.4歳(男性 65.2±11.4歳、女性 60.9±10.9歳)と中高年が主体を占めた。84例(34.4%)に合併症を認め、慢性関節リウマチ(6.7%)、シェーグレン症候群(9.2%)、橋本病(6.3%)など自己免疫性疾患の合併頻度が高率であった。診断確定のために肝生検を施行した症例は202例(83.5%)であった。PBCではその診断のために自己抗体測定が重要な意味を持つが、各自己抗体の陽性率は抗核抗体陽性率 45.9%(112/244)、抗ミトコンドリア抗体陽性率83.2%(203/244)、抗M2抗体陽性率83.6%(87/101)、抗平滑筋抗体陽性率4.9%、抗LKM1抗体陽性率0%であった。抗ミトコンドリア抗体と抗M2抗体の陽性率には差は認めなかった。また、約半分の症例では抗核抗体陽性を認めた。免疫グロブリン分画定量をみると、IgG1970.8±606.8mg/dl、IgA360.4±149.7mg/dl、IgM577.3±525.1mg/dlとPBCに特徴的であるIgM高値を認めた。肝炎ウイルスマーカー陽性例は、HBs抗原陽性1.22%、HCV抗体陽性 2.45%であり、わが国における同年齢の平均的ウイルスマーカー陽性率とほぼ同じであり、PBCにおいて肝炎ウイルスマーカー陽性率に違いは認められなかった。診断時の主な臨床検査成績は以下のとうりであった。Alb 4.15±0.48 g/dl、 $\gamma$ -glob 1.74±0.60 g/dl、T.Bil 0.95±1.10 mg/dl、AST 70.1±78.5 IU/L、ALT 83.2±139.4 IU/L、 $\gamma$ GTP241.9±229.4IU/L、ALP535.7±430.5 IU/L、LAP233.7±179.7U/L、総胆汁酸18.8±32.1  $\mu$ mol/L。大部分の症例が治療としてUDCA(80.4%)の処方を受けており、副作用もなく良好な治療成績が得られている。その他の治療法としてステロイド(4.9%)、免疫抑制剤(0.4%)、SNMC(0.4%)などが用いられている。治療の結果、6.9%の症例が寛解、50.0%が軽快と判断され良好な経過が認め

られる。一方、悪化(6.5%)や死亡(0.8%)症例もあり、24.3%の症例が不変であった。

#### D. 考察

今回の調査・データベース作成において、参加施設の地域的偏り、検査基準値の相違、検査所見の統一化(組織所見など)が問題点として挙げられた。PBCの有病率や発症率に地域的な偏りはないと思われるが、全国横断的な調査とするためには、さらに多くの施設に調査協力を求めていくことが必要であると思われる。1999年後半から政策医療ネットワーク(肝ネット)が徐々に軌道に乗りつつあることから、これら肝ネットの施設に協力を求めていく予定である。次回調査から全地域にわたる32施設に協力依頼の予定である。将来的には、HOSP-NETを利用し全国立医療施設の参加を求めていくことが望ましい。しかし、その場合には診断の信頼性などの問題が新たに生じてくるとと思われる。多施設での検査データを扱うにあたり、一つのデータベースに基準値の異なる検査値が混在する結果となった(ALPや肝組織検査結果など)。データベースとしての一貫性を保つためには、施設毎の基準値の参照提示、組織所見においては個々の病理所見に加えてScheuerなどの病期分類を併記するなどの対応が必要と考えられた。今後はHOSP-NET上での登録システムに移行していく予定である。追加項目や記載不十分な項目の調査はインターネットを用いて情報収集を行うことになるが、今後累積される膨大な症例数について再調査を行うことは時間的、人的に多大な労力を要する。今後の研究の発展に伴って、病因・病態の解明につながる新たな検査の必要性が出現することは容易に予想されるため、これに対応するべくすでに国立病院・療養所肝症例研究グループにおいて急性肝炎症例登録で確立された血清一括保存の経験を活かし、症例登録時、追跡調査時の血清保存や肝組織ブロックの保存などのシステムの確立が必要であると思われる。今後の運用に関しては、データ収集方法と情報開示(HOSP-NET上での統計解析結果の提示)、登録症例の管理(追跡調査など)などのさらなる検討が必要となる。今回、国立医療施設間のclosed-networkシステムであるHOSP-NETを利用した多施設間情報収集、データベース活用を念頭に置いたデータベース構築の試みであるが、すべての国立医療施設においてHOSP-NETへのアプローチが可能な端末が十分に設置されているわけではない現状をみるにつけ、更なるシステムの整備を期待する所である。HOSP-NETというclosed-systemによる個人情報機密保持の安全性は、一般回線を利用したインターネットによる情報収集の窓口の拡がりに勝ると考えられる。従って環境整備の必要性はあるもののHOSP-NETを用いた情報収集システムを活用していく予定である。今後の計画としては、HOSP-NETを用いた随時の症例登録と定時的(年一回など)な追跡調査というシステムにより症例の集積と追跡を行い、定期的な統計解析とその結果のネット上における提示を目標とする。データベースに

要求される基本的条件は①使用目的に合致したデータベース設計、②正確なデータ入力、③自在な解析、とされている。データ入力や解析は別として基本であるデータベース構築の目的をどこにおくかは大きな問題である。すでにわが国には①厚生省特定疾患登録患者約7000名(1996)、②厚生省特定疾患疫学研究班約3000名(1996)、③難治性肝疾患調査研究班約3600名(1996)というデータベースが存在する。今回構築するデータベースは症例数的にはこれらよりも小さくなることが予測される。しかし最大の特徴は、参加施設間において緊密な連携が可能であること、登録患者はclose-follow up中の症例であるという点である。これらの利点により、長期の追跡の結果、詳細な経過の解析が可能であること、保存血清などの利用により病因・病態の解明へつながるアプローチを提供できる可能性があること、新たな診断法・治療法の開発や治験に不可欠の症例の登録などにその目的を設定する事が可能であろう。

#### E. 結論

原発性胆汁性肝硬変についてデータベースの構築を目的として、国立病院・療養所における調査および統計解析を行なった。今後の運用・管理について、検査所見の統一化、HOSP-NET上で利用するためのプロトコル確立、将来の「肝疾患」統合的データベースとしての活用を念頭に置いた、他の調査プロジェクトとの整合性のある設計等について検討が必要である。

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

国立病院肝臓病ネットワークにおける自己免疫性肝炎調査

分担研究者 渡部 幸夫 国立相模原病院 内科医長

研究要旨：国立病院肝臓病ネットワーク関連施設における自己免疫性肝炎症例の調査を行い実態把握と自己免疫性肝炎の臨床像や治療効果、発症形態が明らかとなった。

A. 研究目的

国立病院療養所における自己免疫性肝炎の症例を全国調査し、国立病院療養所での自己免疫性肝炎の症例数の把握とともに臨床像や病態、治療状況や治療効果、発症形態を調べることで、病態を解明しさらに的確な診断や治療が行えるようにする。

B. 研究方法

国立病院肝臓病ネットワークを利用して、全国の国立病院療養所に自己免疫性肝炎症例のアンケート調査を行った。第1回調査は18施設を対象に1997年1年間に通院もしくは入院した自己免疫性肝炎例について行った。第2回調査は上記18施設においては1998年と1999年の2年間の追加症例の調査と、さらに新規調査14施設には1997年から1999年の3年間に診断された症例を調査した。調査項目は診断時の背景因子や既往歴、肝機能検査成績、自己抗体検査成績、肝組織所見、治療内容と治療効果、予後であった。

(倫理面への配慮)

各施設の診断や治療状況の実態を調べるアンケート調査であるため、診療面への影響や制約、強制はない。しかし、第1回調査は実名での登録であったため、診療情報漏洩の問題が生じないとも限らず、第2回調査は患者個人名をイニシャルに変更し、さらに個人情報外部に伝わらないよう注意した。

C. 研究成果

第1回調査18施設から自己免疫性肝炎184例、第2回調査32施設から113例の合計297例が集計された。男女比は1：8.6と女性に多く、平均年齢は54.6歳。確診例57.5%で、残りが疑診例。抗核抗体陽性は高率。肝機能成績の平均はAST 368IU/l、ALT 388IU/l、T.Bil 3.6mg/dlであった。自己免疫性肝炎の発症様式は急性型が127例(50.8%)で非急性型・潜行型が123例であった。急性型と非急性型の年齢やIgG値には差がなく、肝機能検査成績のみ有意差があった。両者の肝組織の比較では急性型で軽度な進展例が多い傾向はあるものの両者とも肝硬変を含めた各進展段階が認められた。急性型には急性肝炎組織像が16例集計され、自己免疫性肝炎と急性非ABC型ウイルス肝炎の鑑別が困難な症例も少なからずあり、発症時には診断困難で経過中に自己免疫性肝炎の診断に

至る症例があった。治療はステロイド剤が289例中199例に使用され、181例に有効で(91%)、130例が(65.3%)が寛解となった。

D. 考察

自己免疫性肝炎の発症には急性型と非急性型・潜行型があり、急性型で急性肝炎様発症を呈すると診断が容易ではない。経過中に診断される例もありより慎重な対応が望まれる。

E. 結論

よりの確な診断基準の確立と治療が望まれる。

F. 研究発表

第53回国立病院療養所総合医学会 1998年国立病院肝疾患共同研究報告会 1998年

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

#### d. 劇症肝炎

# 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

## 劇症肝炎研究分科会総括報告

分担研究者 藤原 研司 埼玉医科大学 第三内科

### 研究要旨：

劇症肝炎分科会における研究課題は、

1. 劇症肝炎、LOHFの患者背景、成因、臨床所見及び予後の実態把握
2. HBVに対するlamivudine投与や肝移植などの新たな治療法の評価
3. 肝炎劇症化を予知する方法の確立
4. 肝炎劇症化の機序解明

の4点である。これらを目指して、1998年に発症した症例の全国調査を実施、また協力者による個別研究を行った。

### 1. 劇症肝炎、LOHFの実態（全国調査）

劇症肝炎93例（急性型46例、亜急性型47例）、LOHF 11例が登録された。急性型の20.9%、亜急性型の23.9%はHBVキャリアであった。また、急性型の28.9%、亜急性型の41.3%及びLOHFの63.6%は基礎疾患を有しており、その大部分で薬剤歴が認められた。HBVキャリアや基礎疾患を有する患者の頻度は、従来の調査に比して高値であり、患者背景には明らかな変化が認められた。HBVなどのウイルスの増殖に、基礎疾患や薬剤が及ぼす影響に関する検討が今後の課題であろう。

成因に関しては、HBV感染が関与する症例が44.4%を占めていたことが注目された。急性感染例とキャリア例の比率は全体では1：1であったが、前者は急性型、後者は亜急性型の頻度が有意に高率であった。非A非B型も40.7%と高率に認められ、特に亜急性型、LOHFで多かった。なお、非A非B型には自己免疫性肝炎など自己免疫疾患が疑われる症例が7例存在した。

肝移植非実施症例における救命率は、急性型51.1%、亜急性型25.6%、LOHF 0%であり、従来の調査に比して、特に亜急性型で予後が向上する傾向が認められた。なお、自己免疫疾患が疑われた非A非B型は、特に予後が不良であったことから、これら症例の病態解析及び治療法の再検討が重要と考えられた。

### 2. 劇症肝炎、LOHFの治療（全国調査、個別研究）

全国調査では、インターフェロン、サイクロスポリンAによる治療が増加する一方で、GI療法や特殊組成アミノ酸を投与頻度が減少する傾向が認められた。また、HBVに対するlamivudine及び生体部分肝移植が、新たな治療法として登場した。

#### 1) Lamivudine

全国集計では、HBV感染例の20.4%、キャリアに限定すると30.4%に投与された。5例でHBV-DNA量の減少など治療効果が認められた。しかし、肝性脳症出現1ヶ月前より投与されたが、劇症化して死亡した症例も認められた。坪内協力者もB型慢性肝炎が急性

増悪した4例に対する投与経験を報告したが、効果が得られたのは2例であり、HBV-DNA量が高値の症例や肝不全が高度になってから投与を開始した症例では無効であった。Lamivudine投与の至適時期や量及びHBVの反応性に関して、全国調査を介して明らかにする必要がある。

#### 2) 生体部分肝移植

全国調査では、肝移植は急性型の23.9%、亜急性型の38.3%及びLOHFの63.6%で検討されたが、移植に至った症例は急性型1例、亜急性型4例、LOHF 1例に過ぎなかった。肝移植非実施例を対象に適応基準（日本急性肝不全研究会、1996年）の正診率を検討したところ、亜急性型では90.0%と高率であったが、急性型は78.0%と低かった。急性型とLOHFには肝性脳症出現5日以内に死亡し、予後の再予測が行えない症例が多かった。また、LOHFでは脳症出現前より肝移植の適応を考慮せざるを得ない場合があり、適応基準の有用性が低かった。辻協力者も劇症肝炎に対する肝移植の自験例を報告したが、急性型では適応基準の有用性が低いという、同様の成績が得られた。彼らは「肝萎縮の有無」を適応基準に加えることを提唱したが、全国集計では急性型救命例でも肝萎縮が50%以上と高率に観察されており、これのみで正診率を向上させるのは困難と考えられる。全国集計を基に、新たな観点から急性型及びLOHFに対する適応基準を確立することが、今後の課題であろう。

### 3. 肝炎劇症化の予知（全国集計：継続、個別研究）

鈴木協力者は、前年までの全体研究の継続で、急性肝炎重症型の予後に関するprospective studyの成績を報告した。劇症肝炎重症型の劇症化する頻度は約30%であった。劇症化予知に際して、与芝の式はspecificityが低く有用性が低いが、武藤の式や新たに作成した岩手医科大学の予測式は、sensitivity、specificityとも良好であった。更に、症例を重ねて両式の有用性を検証する必要がある。なお、治療と劇症化の関連では、抗凝固療法やプロスタグランジンにより治療した症例で劇症化の頻度が低率であったが、有

意差には至らなかった。

劇症肝炎，特に急性型に特徴的な広汎肝壊死は，活性化肝マクロファージが類洞内凝固を惹起することにより生じている可能性がある。藤原分担研究者は，マクロファージの肝浸潤に関与するChemokineであるオステオポンチンの血漿濃度が，劇症肝炎急性型で特に高値を示し，この病態を早期に予知する目的で有用な指標になる可能性を報告した。各種chemokineやcytokineの血中動態から，劇症化の機序との関連で予知する試みも，今後の研究課題と言えよう。

#### 4. 肝炎劇症化の機序（個別研究）

Th1及びTh2系の免疫応答は，それぞれ炎症性，抗炎症性cytokineの産生に関与する。肝炎の劇症化は，両サイトカインの平衡破綻で生じるとの想定からの検討が3協力者より報告された。沖田協力者は，劇症肝炎患者ではTh1系のIFN- $\gamma$ やIL-2を産生するリンパ球数が増加しているが，Th2系のIL-10産生リンパ球が減少していることを見出した。しかし，劇症肝炎でもIL-10を産生する単球やマクロファージ数は保たれていたと報告している。また，鈴木協力者も同様の検討を行なったが，Th1，Th2リンパ球比率は，急性肝炎と劇症肝炎で明らかな差異が認められなかった。今後は，肝に浸潤したリンパ球を対象に，Th1，Th2の平衡を検討することが重要であろう。一方，渡辺協力者はTh2系の反応が低下しているコンカナバリンA誘発マウス肝障害モデルでは，IL-10投与で肝障害が軽減することを報告した。更に，林協力者は抗Fas抗体で誘発するマウス肝障害では，IL-1 $\beta$ を投与するとcaspase-3 like proteaseの活性化が抑制され，apoptosisによる肝細胞死が抑制されることを見出した。これらは，劇症肝炎に対する新たなcytokine療法の端緒となる可能性があり注目される。

石井協力者は，ラット腸管の虚血再灌流に起因する肝類洞の障害は，高濃度のアルコール投与で増悪することを報告した。HBVキャリアでも大量飲酒を契機に劇症化する可能性を示唆する基礎検討であり，今後の全国集計においても飲酒歴の詳細を調査する必要があると考えられた。

劇症肝炎における肝再生に関しては，坪内協力者がHGFの細胞内情報伝達について，cyclin D1遺伝子の転写調節機構との関連で行った基礎実験の成績を報告した。

# 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

劇症肝炎，遅発性肝不全（LOHF：late onset hepatic failure）の全国集計（1998年）

分担研究者 藤原 研司 埼玉医科大学 第三内科

研究要旨：全国311施設を対象としたアンケート調査により，1998年に発症した劇症肝炎93例（急性型46例，亜急性型47例），LOHF 11例を集計し，その患者背景，臨床像，予後および治療法を解析した。また，肝移植適応ガイドライン（日本急性肝不全研究会，1996年）を再評価した。[成績] ①患者背景：急性型の20.9%，亜急性型の23.9%はHBVキャリアであった。また，急性型の28.9%，亜急性型の41.3%及びLOHFの63.6%は糖尿病，悪性腫瘍，精神疾患などの基礎疾患を有しており，その大部分で薬剤歴が認められた。②成因：A型の4例は全て急性型であった。HBV感染が関与する症例は48例（44.4%）認められた。うち23例は急性感染例，23例はキャリア例，2例は何れかの判別が不能であった。急性感染例は急性型，キャリア例は亜急性型の頻度が有意に高率であった。非A非B型は42例（40.7%）で認められ，急性型9例，亜急性型25例，LOHF 8例であった。なお，非A非B型には自己免疫性肝炎など自己免疫疾患が疑われる症例が7例存在した。③予後：肝移植非実施症例における救命率は，急性型51.1%，亜急性型25.6%，LOHF 0%であり，急性型が他病型に比して有意に高率であった。A型は全例が救命された。一方，自己免疫疾患が疑われる非A非B型は1例を除き死亡し，予後不良であった。④治療：HBV関連症例のうち10例でラミブジンが投与され，うち5例で有効性が確認された。肝移植の適応は，急性型11例（23.9%），亜急性型18例（38.3%），LOHF 7例（63.6%）で検討されたが，移植に至った症例は急性型1例，亜急性型4例，LOHF 1例に過ぎなかった。肝移植非実施例を対象に適応基準の正診率を検討したところ，亜急性型では90.0%と高率であったが，急性型は78.0%と低かった。急性型とLOHFには肝性脳症出現5日以内に死亡し，予後の再予測が行えない症例が多かった。また，LOHFでは脳症出現前より肝移植の適応を考慮せざるを得ない場合があり，適応基準の有用性が低かった。[考案と結語] 以上の成績を昨年までの全国集計と比較すると，HBVキャリアや基礎疾患を有する症例が多くなる傾向があること，また，特に亜急性型で予後が向上していることが明らかになった。また，成因としてはHBV感染の関与する症例が40%以上を占めること及び非A非B型には自己免疫性肝炎例が含まれている可能性があることが注目された。肝移植はまだ少数例で実施されているに過ぎない。その普及に努めるとともに，急性型およびLOHFに有用性の高い適応基準を作成することが重要と考えられた。

### A. 研究目的

劇症肝炎及びLOHFの予後は不良であり，内科的集学治療によっても救命できない場合が多い。生体部分肝移植が定着し，脳死肝移植も実施可能となった今日では，肝移植をも視野に入れた治療選択が必須となる。そこで，劇症肝炎，LOHF症例の全国集計を行い，その臨床像，予後及び治療法を解析し，かつ肝移植適応ガイドライン<sup>1)</sup>（日本急性肝不全研究会，1996年）も再評価した。

### B. 対象と方法

日本消化器病学会及び日本肝臓学会の評議員が所属する311施設を対象に1次アンケート調査を行い，1998年に発症した劇症肝炎及びLOHFの症例数を調査した。299施設（96.1%）より123症例の報告があり，これらに対して2次アンケート調査を実施して，臨床データを集計した。114症例（92.7%）が登録されたが，第12回犬山シンポジウムの基準を満たす劇症肝炎<sup>2)</sup>，Williamsらの基準によるLOHFは<sup>3)</sup>，計104例（91.2%）であった。これら症例につき，患者

背景，成因，合併症，臨床検査成績，治療法及び予後に関する解析を行った。また，肝移植非実施例を対象に肝移植適応ガイドライン<sup>1)</sup>を用いた生存予測を行い，実際の予後と比較することにより，ガイドラインの有用性と問題点も検討した。

### C. 研究成果

#### 1. 患者背景と予後

104例のうち，劇症肝炎は93例（急性型46例，亜急性型47例），LOHFは11例であった。急性型は男性が，亜急性型とLOHFでは女性が多かったが，この差は有意でなかった。患者年齢はLOHFが急性型に比して有意に高かった。

劇症肝炎は急性型の20.9%，亜急性型の23.9%がHBVキャリアであり，LOHFの9.1%に比して高率であった。糖尿病，悪性腫瘍，精神疾患などの基礎疾患を有する患者数は，急性型では28.9%であったが，亜急性型は41.3%，LOHFは63.9%と高率であり，急性型とLOHFとの間には有意差であった。なお，基礎疾患を有する患者の多くは薬剤が投与されており，薬剤歴

はLOHFで63.6%と高率であった。

肝移植非実施例における救命率は、劇症肝炎全体では39.1%であり、急性型(51.1%)は亜急性型(25.6%)に比して有意に高率であった。LOHF症例は内科治療では全例が死亡した。肝移植は、急性型1例、亜急性型4例、LOHF 1例に実施され、亜急性型の1例を除くと全例生存中である。肝移植実施例を含めた救命率は劇症肝炎40.9%(急性型52.2%、亜急性型29.8%)、LOHF 9.1%であった。

## 2. 成因と予後

A型は4例で、全例が急性型、内科治療のみで救命された。

B型は、IgM-HBc抗体陽性が29例、陰性が9例、未測定が5例であり、全症例の41.3%を占めていた。他の成因例におけるHBVキャリアまたはその疑い症例も含めると、48例(44.4%)でHBV感染が認められた。IgM-HBc抗体陽性例のうち6例、陰性例の全例及び未測定例の3例はHBVキャリアであった。従って、B型は急性感染が18例、キャリア発症が23例であり、前者は急性型、後者は亜急性型の頻度が有意に多かった。

非A非B型は42例で、全体の40.4%に相当した。特に、亜急性型とLOHFでその頻度が高く、各病型の53.9%、72.7%を占めていた。HBV-DNA陽性でHBVキャリアが疑われる症例が3例、また、コア抗体の変動等からC型と考えられる症例が4例認められた。また、自己免疫性疾患が疑われる症例も7例存在し、6例は血清IgG高値、抗核抗体高力価から自己免疫性肝炎が、1例は成人性スティル病が、肝障害の原因であると考えられた。自己免疫性疾患の疑われる症例は予後不良で、6例(85.7%)が死亡した。

A型と自己免疫性疾患の疑われる非A非B型を除くと、救命率は成因によって差異がなく、何れも急性型が44~67%、亜急性型が25~30%であった。

## 3. 肝性脳症出現時の身体所見、画像所見及び血液検査成績

昏睡Ⅱ度出現時に急性型の95.7%、亜急性型の全例で黄疸が認められた。羽ばたき振戦は約75%、発熱、腹水、頻脈、肝濁音界消失及び肝性口臭は約50%、呼吸促迫と下腿浮腫は約25%で観察されたが、呼吸促迫は急性型で、腹水と下腿浮腫は亜急性型で高率であった。LOHFは全例が黄疸、腹水を有しており、肝濁音界消失及び下腿浮腫を劇症肝炎より高頻度に認めた。また、身体所見と予後との関連性をみると、肝移植非実施救命例に比して死亡例で高率に観察される所見が存在した。急性型における肝濁音界消失、亜急性型における腹水と頻脈、また、劇症肝炎全体では下腿浮腫において有意差が認められた。

腹部超音波またはCT検査における肝萎縮は、急性型の56.5%、亜急性型の81.4%で観察され、亜急性型の頻度は急性型に比して高かった( $p<0.05$ )。また、劇症肝炎全体では、肝移植非実施救命例

(47.1%)に比して死亡例(80.4%)で高率に肝萎縮( $p<0.05$ )が認められた。

急性型は血清トランスアミナーゼが高値で、プロトロンビン時間が高度に延長していた。一方、亜急性型とLOHFでは、血清トランスアミナーゼ値の上昇は軽度であったが、血清ビリルビン濃度上昇とアルブミン濃度低下が顕著であった。また、急性型では肝移植非実施救命例に比して死亡例で血清hHGF濃度が有意に高値であった。

## 4. 合併症

劇症肝炎における合併症の頻度は、感染症40.2%、脳浮腫37.5%、消化管出血26.7%、腎不全37.0%、DIC 47.7%、心不全14.8%であった。急性型と亜急性型では各合併症の頻度に差がなく、LOHFでもほぼ同頻度で各合併症を認めた。肝移植非実施生存例は死亡例に比して、感染症を除く各合併症の頻度が有意に低率であった。また、合併症の認められない劇症肝炎では救命率が94.7%と高率であったが、合併症数が増加するに従い救命率は低下し、合併症数が5の症例は全例が死亡した。

## 5. 内科的治療法

劇症肝炎では、血漿交換(89.2%)、副腎皮質ステロイド投与(65.6%)、GI療法(61.3%)、抗凝固療法(60.2%)、血液濾過透析(58.1%)などの治療法が、高頻度実施された(e2606106(表-6))。各治療法が施行された頻度は急性型と亜急性型で差がなく、また、LOHFでも同程度であった。肝移植非実施生存例と死亡例の間にも治療法の差異は認められなかった。

B型の43例のうち、10例でlamivudineが投与された。急性感染3例(急性型1例、亜急性型2例)、キャリア7例(急性型2例、亜急性型5例)であり、キャリア例では30.4%で投与されたことになる。5例でHBV-DNA量の減少や肝機能の改善が認められ、有効と判定された。しかし、肝性脳症発症1ヶ月前より投与されたが、劇症化して死亡した症例も存在した。副作用としては、1例で肺炎が出現した。

## 6. 肝移植の実態と適応ガイドラインの有用性

肝移植の適応は、急性型の23.9%、亜急性型の38.8%及びLOHFの63.6%の症例で検討され、LOHFにおける頻度は急性型に比して有意に高かった。特に、急性型の死亡例では、適応が検討されたのは2例(9.1%)に過ぎなかった。肝移植の適応を検討した時期は、急性型、亜急性型とも肝性脳症出現時から5日後までの間が多く、その大部分では適応ガイドラインが利用された。一方、LOHFでは3例で肝性脳症が出現する2週間以上前より適応が検討されており、これらでは適応ガイドラインを利用することができなかった。

肝移植の適応が検討されなかった死亡例には、60歳以上の高齢患者が急性型で8例(36.4%)、亜急性