

E. 結論

多変量解析およびBayesの定理を用いた検討により、AIHに診断的な病理所見が存在した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

2000,6,6 International association for the study of the liver (IASL)

IASL Scientific Session C (June 6th, 2000, Fukuoka, Japan)

Multivariate Analysis of Histological Difference between Autoimmune Hepatitis and Chronic Viral Hepatitis

M.Shibata¹, T.Morizane², T.Uchida³, M.Nakano⁴, S.Tsunematsu², Y.Inagaki⁵, K.Sekiyama⁶, S.Takahashi⁷, Y.Onozuka, T.Yamagami⁸, M.Yoshiba⁶, Y.Ueno⁸, and K.Mitamura¹.

(Abstract: J Gastroen Hepatol 15 Suppl. 78, 2000.)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

文献

¹ Czaja AJ, Carpenter HA: Histological findings in chronic hepatitis C with autoimmune features. *Hepatology* 1997; 26 : 459-66.

² Pratt DS, Fawaz KA, Rabson A, et al: A novel histological lesion in glucocorticoid-responsive chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1997; 113: 664-8.

³ Burgart LJ, Batts KP, Ludwig J, et al: Recent-onset autoimmune hepatitis. Biopsy findings and clinical correlations. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 699-708.

⁴ Czaja AJ, Carpenter HA: Sensitivity, specificity, and predictability of biopsy interpretations in chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1993; 105: 1824-32.

⁵ Bach N, Thung SN, Schaffner F: The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. *Hepatology* 1992; 15: 572-7.

⁶ Lefkowitz JH, Apfelbaum TF, Weinberg L, et al: Acute liver biopsy lesions in early autoimmune chronic active hepatitis. *Liver* 1984; 4: 379-86.

⁷ Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB et al: International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-

38.

⁸ Degoulet P, Phister B, Fieschi M: Introduction to Clinical Informatics (Computers in Health Care). Springer Verlag, Berlin, Germany, p157, 1996.

⁹ Shibata M, Morizane T, Uchida T, et al: Irregular regeneration of hepatocytes and risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis and cirrhosis with hepatitis-C-virus infection. *Lancet* 1998; 351: 1773-7.

¹⁰ 前山史朗, 高橋泰人, 岩場晶子, 他: 自己免疫性肝炎における小葉間胆管の障害像に関する臨床病理学的検討. *消化器と免疫* 35: 178-182, 1998.

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末梢血Tリンパ球活性化マーカーCD69、CD25測定についての解析

研究協力者 渡部 幸夫 国立相模原病院 内科医長

研究要旨：自己免疫性肝炎を主として、末梢血リンパ球活性化マーカーであるCD69とCD25（IL-2R）陽性細胞率をCD3、CD4、CD8各々において検討することで自己免疫性肝炎の免疫的賦活状態を肝機能増悪前に把握出来ないか調査した。また、他肝疾患との差異を見ることにより自己免疫性肝炎の鑑別診断が可能かどうか、さらに自己免疫性肝炎に特異的な免疫的異常を表現している可能性があるかどうかについても検討した。自己免疫性肝炎におけるCD3、CD4のCD69陽性率は治療中の例を含めて他疾患に比べ有意に高値であった。CD25では高値の傾向はあるものの有意差は見出し得なかった。CD69高値陽性は必ずしも自己免疫性肝炎の炎症程度を正確には反映はしないもののある程度の免疫的特異性は認められた。

A. 研究目的

自己免疫性肝炎の治療はステロイド剤を主としているが、時に再燃増悪が見られる。ステロイド投与量の決定は臨床症状、ALT値やIgG値を参考にしているが結果的には再燃増悪を生じた後に投与量を変更したり他剤を併用することとなり肝病変は進展することとなる。今回、自己免疫性肝炎を主として、末梢血リンパ球活性化マーカーであるCD69とCD25（IL-2R）陽性細胞率をCD3、CD4、CD8各々において検討することで自己免疫性肝炎の免疫的賦活状態を肝機能増悪前に把握出来ないか同時期の肝生検組織像と対比して調査した。また、他肝疾患との差異を見ることにより自己免疫性肝炎の鑑別診断が可能かどうか、さらに自己免疫性肝炎に特異的な免疫的異常を表現している可能性があるかどうかについても検討した。

B. 研究方法

健常者および自己免疫性肝炎、他肝疾患各症例の末梢血リンパ球のCD3、CD4、CD8それぞれに対するCD69とCD25の陽性率を解析した。末梢血30mlへパリン採血後、Ficoll-paque比重遠心法にて末梢血単核細胞（Peripheral blood mononuclear cells：PBMC）を分離し、CD69およびCD25（IL-2レセプター）の発現をFITCラベルの抗CD3、CD4、CD8抗体で二重染色し、FACScanを用いてCellQuestにて解析した。対象は自己免疫性肝炎7例中（全例AIH Type 1、女性）ステロイド未治療2例、維持量投与中5例。未治療1例は治療前と開始後2週、6週で検索した。治療中の患者5例のうち3例にはリンパ球検索とほぼ同時期に肝組織検査を施行し、炎症の程度と対比した。他1例は非代償性肝硬変進展例であった。健常者5例のほか、対照疾患としてB型とC型ウイルス慢性肝炎4例、薬剤性肝障害2例、原発性胆汁性肝硬変1例、胆石1例について検討した。統計処理については2群の有意差検定はMann-WhitneyのU検定を用いた。

（倫理面の配慮）

肝疾患の病態解明のために採血をすることに對し、各患者に同意を得た。当院の倫理委員会の承諾を得ての研究とした。

C. 研究結果

ステロイド剤投与前から経過を追えた自己免疫性肝炎の1例は肝機能の改善とともにCD3、CD4、CD8各分画のCD69陽性率は高値から正常化した（図1）。CD3、CD4、CD8各分画のCD25陽性率は治療前より治療2週後にさらに高値となり、6週で正常化した。自己免疫性肝炎患者7例のCD69/CD3は $12.1 \pm 7.2\%$ で、健常者の $4.9 \pm 1.2\%$ より有意に高値であった。CD69/CD4については $8.3 \pm 7.0\%$ で、健常者 $2.8 \pm 0.2\%$ や他肝疾患の $2.8 \pm 1.3\%$ と比べて有意に高値であった。CD69/CD8陽性率は健常者や他肝疾患との間に有意差がなかった。CD25は自己免疫性肝炎で高値の傾向があるものの有意差は見出し得なかった（表1）。

治療中の自己免疫性肝炎で経過を追って肝組織像が得られた3例と肝硬変進展1例のCD69陽性率は肝機能不安定例や進展例に高値を示す傾向があるものの、炎症の乏しい寛解期例でも高値を呈する場合があり、必ずしも炎症程度を反映しておらず、CD25も同様で治療薬の多寡や中止を決定できるだけの指標にはなり難いと思われた（表2）。なお、CD69やCD25陽性率とALT値やIgG値とは関連しなかった。

D. 考察

自己免疫性肝炎は稀な肝疾患であり、時に診断困難な症例も存在する。適切な診断や治療がなされない症例では肝病態は進展し予後不良となるが、的確な診断を得るための検査項目はまだ不十分である。一方、診断後のステロイド剤投与量が適量であるかどうかは肝機能の推移やIgG値などで判断しているが、肝炎再燃後に遅れて治療薬を増量する事が多く、繰り返す再燃で進展する例がある。肝組織検査は参考になるが頻回

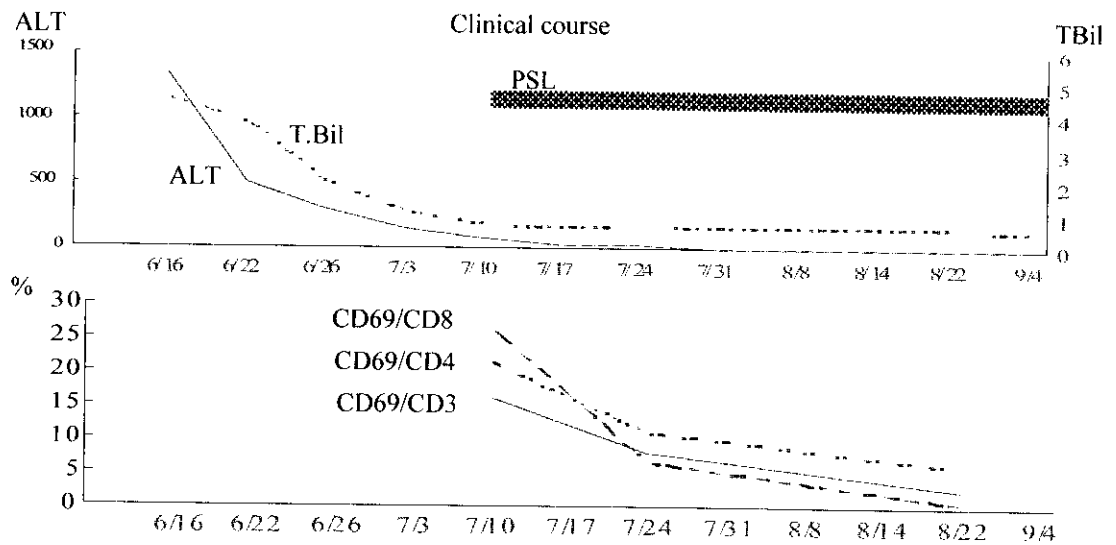


図1. 自己免疫性肝炎の経過とCD69/CD3,CD69/CD4,CD69/CD8の推移

	n	CD69/CD3	CD69/CD4	CD69/CD8
健常者	5	4.9±1.2 *	2.8±0.2 *	13.6±2.8
AIH	7	12.1±7.2 *	8.3±7.0 *	23.9±12.5
他の肝疾患	8	6.7±3.4	2.8±1.3 *	17.2±15.0

	n	CD25/CD3	CD25/CD4	CD25/CD8
健常者	5	12.6±5.4	22.7±8.6	1.3±1.2
AIH	7	17.4±6.1	24.6±5.0	5.3±5.2
他の肝疾患	8	10.8±5.9	16.9±9.9	2.3±1.8

Mann-Whitney検定 * P<0.05

表1. 自己免疫性肝炎と他の肝疾患におけるCD69,CD25陽性率(%)

歳	性	年	ALT	T.Bil	IgG	Patho	PSL 経過	CD69/CD3	CD69/CD4	CD69/CD8
52	F	1978	559	4.9	3420	F2A3	30 後に再燃			
		2000	19	0.7	1380	F1A0	2.5 安定	17.6	7.9	34.6
51	F	1995	1182	2.5	3424	F1A2	40 後に再燃			
		2000	36	0.4	1310	F1A0	5 安定	3.9	2.6	4.9
40	F	1991	548	0.7	4792	F1A2	40 後に再燃			
		2000	40	0.5	2100	F2A2	10 やや不安定	10.6	2.8	27.9
52	F	1978	559	4.9	3420	F2A3	30 後に再燃			
		2000	19	0.7	1380	(LC)	2.5 進展	24.2	13.3	39.6

表2. 自己免疫性肝炎の経過とCD69/CD3,CD69/CD4,CD69/CD8陽性率(%)

には検査不可能である。また、寛解期を維持していても肝病態の進展例がある。そのため患者末梢血リンパ球の活性化を把握することは肝機能では判断しがたい自己免疫性肝炎の免疫学的診断法および治療効果判定手段の1つとして活用できる可能性が示唆される。CD69は初期活性化抗原として定義され、in vitroでのT細胞、NK細胞、B細胞などの活性化においてもっとも早期に発現する細胞表面抗原で、休止期の細胞ではほとんど発現しないとされている。T細胞ではTCR/CD3複合体刺激により刺激後1~2時間以内のもっとも早い段階で細胞表面に検出され、刺激がなくなると24時間以内に半減する。CD69抗原は共通のcore proteinを有するが、異なる糖鎖付加のため分子量の異なる2分子の糖蛋白(34/28kDa)から構成される60kDaのホモ二量体である。チロシン残基にリン酸化が認められ、CD69抗体を用いた架橋反応により細胞内カルシウム濃度の上昇が認められることから、細胞内シグナル伝達との関係が指摘されている。まだ詳細は明らかではない。同様にCD25はIL-2レセプターであり、活性化したリンパ球で発現が認められる。CD69などを検索することは、生体内におけるリンパ球の分布率ではなく、リンパ球の活性化状態を把握し、種々の抗原刺激に対する機能を知ることとなる。今まで、自己免疫性肝炎患者の末梢血リンパ球の早期活性化抗原を検索した報告はなく、自己免疫性肝炎患者の免疫的病態解明とともに治療の効果についての解析は意義があると思われたため今回の解析を行った。

治療前から経過を追えた自己免疫性肝炎症例では末梢血リンパ球T細胞CD3、CD4、CD8における活性化マーカーCD69やCD25陽性率は肝炎治療と共に高値陽性より正常化していた。この陽性率が高いことは、生体内でのリンパ球が活性化がされ、自己免疫性肝炎が活動期にある可能性を示唆する。さらに自己免疫性肝炎全体のCD69やCD25活性化マーカー陽性率も健常者や他肝疾患に比べ高値を呈する傾向が強く、自己免疫性肝炎の免疫学的活性化病態を反映していた。しかし陽性率の高低は必ずしも肝組織像などの臨床病態と一致せず、一時点での測定のみでは診断や治療の指標にはなり難いと思われる。

E. 結論

今回の検討でCD69やCD25における自己免疫性肝炎急性期治療前後の推移や、治療中の自己免疫性肝炎における陽性率の多寡は、ウイルス性慢性肝炎などの他疾患からみても、またALT値と相関していないことから、単なる一般的な肝炎増悪や沈静化の結果としての変化ではなく、自己免疫性肝炎患者が持つ個体の免疫的異常の特異性を表現しているとも考えられる。今回の結果に関する解析は容易ではない。更なる症例の追跡と、肝組織中の検索が必要と考えられる。

F. 研究発表

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） 「難治性の肝疾患に関する研究班」

平成12年度個別研究報告書

自己免疫性肝炎の予後

研究協力者 森實 敏夫 神奈川歯科大学付属病院内科

研究要旨：自己免疫性肝炎53例を対象とし、Non-concurrent cohort studyにより、生命予後と死亡を規定している因子をKaplan-Meier法およびCox' s proportional modelを用いた多変量解析で検討した。5年生存率は89%であり、死亡を規定している因子は、診断時の血清アルブミン値と肝生検組織で認められる肝実質の高度な虚脱であった。これら2つの因子によりリスクスコアを算出し、生存確率を個々の症例で計算することが可能であった。予測生存率と実測生存率はよく一致し、生存予測式で生存確率0.5以下で死亡という判定と、個々の症例での実際の死亡との関係を見ると、感度100%、特異度98%で死亡を判定することが可能であった。

共同研究者

柴田 実¹⁾、内田俊和²⁾、中野雅行³⁾、小野塚 靖⁴⁾、高橋正一郎⁵⁾、稲垣恭孝⁶⁾、関山和彦、与芝 眞⁷⁾、上野幸久⁸⁾、三田村圭二¹⁾

1) 昭和大学第二内科、2) 昭和大学第二病理、3) 国立水戸病院病理、4) 川崎社会保険病院検査部、5) 富士吉田市立病院内科、6) 日本鋼管病院内科、7) 昭和大学藤が丘病院消化器内科、8) 川崎社会保険病院内科

A. 研究目的

自己免疫性肝炎autoimmune hepatitis (以下AIH) 患者の大部分は適切な診断を受け、適切な治療を受ければ、予後は良好と考えられている。しかし、一部に予後不良の症例が存在し、死亡する例も認められる。これら予後不良の症例の特徴を明らかにすることは、AIHの診療において必要と考えられる。とくに生存あるいは死亡を規定している因子を明らかにすることは、AIHの治療開始とその程度を決定する上で有用と思われる。

そこで、本研究はわが国のAIH患者の予後を明らかにし、予後特に生存あるいは死亡を規定している因子を明らかにすることを目的として行なった。さらに、予後規定因子から、予後予測式を作成し、死亡をどの程度予測できるかを検討した

B. 研究方法

1) 対象および研究デザイン

対象は1980年から1997年までに7施設において経過を観察し、肝組織検査がなされたAIH53例である。内訳は男性10例、女性43例、年齢は19歳から80歳で、平均(±標準偏差)は51(±15)歳であった。いずれも、AIH国際研究グループの診断基準による確診例である。

研究デザインはNon-concurrent Cohort Studyであり、多施設共同研究である。

2) 統計学的方法

生存はKaplan-Meier法で解析し、生存に及ぼす因子の解析はCox' s Proportional Hazard Modelによる多変量解析で行なった。さらに、予後予測式をPBCのMayoモデルと同じ方法で作成し、Risk Scoreを算出して、予測値を実際の予後とを比較した。

説明変数としては、性、年齢、発症様式(急性発症、慢性発症)、血清アルブミン値、ビリルビン値、プロトロンビン時間、血小板数、ALT、ALP、IgG、抗核抗体、抗核抗体価、HLA DR4、腹水、食道静脈瘤、肝組織所見および治療(有無、CS初期投与量、維持量)と肝組織所見である。

肝組織所見は壊死炎症反応、架橋壊死、虚脱、線維化、門脈周囲破壊、門脈域リンパ球反応、形質細胞浸潤、胆管変性・胆管消失、肝細胞ロゼット形成、胆汁うっ滞、多核肝細胞について0~5または0~3にスコア化した。

統計解析は JMP 3.2.5 (SAS Institute Inc., NC, USA) を使用して行った

C. 研究結果

1) 生存分析と多変量解析

経過観察期間は0.5から15年で、平均3.6年であった。経過観察期間中に4例が死亡し、5年生存率は89%であった。死亡に寄与する独立因子は、血清アルブミン値(ハザード比0.0028, 95%信頼区間1.3e-8, 0.11, P<0.0001)、肝組織所見における、高度なParenchymal Collapse 肝実質虚脱(ハザード比67.3, 95%信頼区間8, 88246889, P=0.013)であった。その他の因子は有意ではなかった。

2) リスクスコアと生存予測

患者全体の平均生存率をKaplan-Meier法で求め、それをベースライン生存率S0として、それぞれの症例の血清アルブミン値と虚脱のスコアから係数をかけ合わせて求めたリスクスコアRの値から、t年後の生存確率を計算することが可能である。

$$S(t, X) = \{S_0(t)\} \exp^{(R-R_0)}$$

回帰係数： $\beta_1 = -5.8637898$, $\beta_2 = 8.4171804$

虚脱 = 無～中等度 0, 高度 1

リスク・スコア $R = \text{Alb}(\text{g/dl}) \times \beta_1 + \text{虚脱} \times \beta_2$

$R0 = -21.85204962$

ベースライン生存率 $S_0(t)$ は $t = 0$ 年0.99999997, 1年0.9999677, 2年9999677, 3年0.9996648, 4年0.9992603である。

個々の症例で、予測生存率を計算し、実測生存率と比較するとほぼ一致した(図1)。

生存予測式で生存確率0.5以下で死亡という判定と、個々の症例での実際の死亡との関係を見ると、感度100%,特異度98%で死亡を判定することが可能であった。

D. 考察

古くから、自己免疫性肝炎(AIH)の予後は良好とされてきた。HBsAg陰性の重篤な慢性肝炎として診断されていた時代でも、肝硬変診断後の5年生存率が93%という報告⁴があり、コルチコステロイドへの反応率も56%⁵とされ、治療中断後の再発率は約50%と報告されていたが、死亡率は寛解後は0%、そうでない場合でも17%と報告されている⁶。

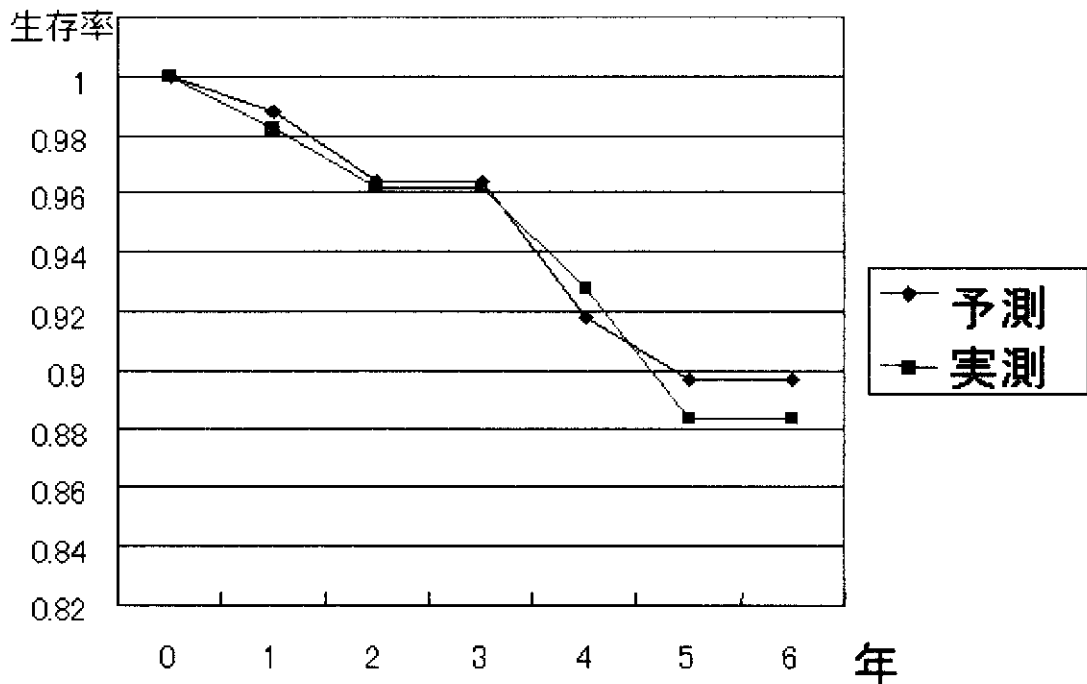


図1. 予測生存率と実測生存率。

AIHをグローバルに共通の基準で取り扱えるよう、診断基準が1993年に提案⁷された後の研究でも肝硬変を伴うAIHの10年生存率は89%、肝硬変を伴わないAIHのそれは90%であることが報告⁸されている。また、中央値62歳のAIH患者を対象とした研究⁹では、5年生存率が64%と報告されている。わが国でも、3年生存率が90%という報告¹⁰がある。したがって、AIHの予後は良好というのが一般的な考え方である。

一方、AIHの死亡あるいは生存を規定している因子は何かについては、明確な結果は得られていない。たとえば、急性発症型と慢性型を比較した報告¹¹では、生存に差が認められていない。自己抗体の出現パターンも予後とは関連のないことが示されている¹²。最近、Tumor necrosis factor (TNF) 遺伝子の308番目の塩基がグアニンからアデニンに置換されている、遺伝

子多型が1型のAIHに頻度が高く、この多型性を有するAIHはコルチコステロイドに対する応答性が悪いことが報告¹³されているが、予後との関連についてはいまだ不明である。したがって、今回の研究がAIH患者の生存を規定している因子を明らかにした初めての研究である。

AIH症例の大部分はコルチコステロイド^{14,15}、あるいはアザチオプリン¹⁶に反応し、肝機能の大幅な改善が得られる。わが国のAIH症例でもコルチコステロイドは90%の症例で有効である¹⁷。今回の研究結果は今後、検証研究によりその妥当性が、他施設の症例でも証明される必要がある。そして、死亡と推測される例についてコルチコステロイド投与量の増加で対処することにより、よりよい治療成績が得られるかどうかを明らかにする必要がある。

E. 結論

- 1) 自己免疫性肝炎の5年生存率は89%であった。
- 2) 自己免疫性肝炎患者の死亡を規定する因子は診断時の血清アルブミン値と肝生検組織で認められる肝実質の高度な虚脱であり、これら2つの因子によって、生存を正確に予測可能である。
- 3) 今後プロスペクティブな検証研究により、自己免疫性肝炎患者の予後予測式の妥当性を検討すべきであろう。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1999,6/25 第35回日本肝臓学会総会（東京）
一般演題：自己免疫性肝炎の予後予測式の作成
柴田 実¹⁾、森實敏夫²⁾、内田俊和³⁾、小野塚 靖⁴⁾、常松 令²⁾、高橋正一郎⁵⁾、稲垣恭孝⁶⁾、関山和彦、与芝 眞⁷⁾、上野幸久⁸⁾、三田村圭二¹⁾（昭和大学第二内科¹⁾、神奈川歯科大学内科²⁾、前日大病理³⁾、川崎中央病院検査部⁴⁾、富士吉田市立病院内科⁵⁾、日本鋼管病院内科⁶⁾、昭和大学藤が丘病院消化器内科⁷⁾、川崎中央病院内科⁸⁾）
抄録：肝臓 40 supplement (1): 383, 1999.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

文献

- ¹ Kaplan EL and Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-481.
- ² Cox DR. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc B* 1972; 34: 187-220.
- ³ Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, Fisher LD and Langworthy A: Prognosis in primary biliary cirrhosis: model for decision making [see comments]. *Hepatology* 1989; 10:1-7.
- ⁴ Davis GL, Czaja AJ and Ludwig J: Development and prognosis of histologic cirrhosis in corticosteroid-treated hepatitis B surface antigen-negative chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1984; 87:1222-7.
- ⁵ Czaja AJ, Ammon HV and Summerskill WH: Clinical features and prognosis of severe chronic active liver disease (CALD) after corticosteroid-induced remission. *Gastroenterology* 1980; 78:518-23.
- ⁶ Czaja AJ, Davis GL, Ludwig J and Taswell HF: Complete resolution of inflammatory activity following corticosteroid treatment of HBsAg-negative chronic active hepatitis. *Hepatology* 1984; 4:622-7.
- ⁷ Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993; 18: 998-1005
- ⁸ Roberts SK, Therneau TM and Czaja AJ: Prognosis of histological cirrhosis in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1996; 110:848-57.
- ⁹ Parker DR and Kingham JG: Type I autoimmune hepatitis is primarily a disease of later life. *Qjm* 1997; 90:289-96.
- ¹⁰ Omagari K, Kinoshita H, Kato Y, Nakata K, Kanematsu T, Kusumoto Y, Mori I, Furukawa R, Tanioka H, Tajima H, Koga M, Yano M and Kohno S: Clinical features of 89 patients with autoimmune hepatitis in Nagasaki Prefecture, Japan. *J Gastroenterol* 1999; 34:221-6.
- ¹¹ Nikias GA, Batts KP and Czaja AJ: The nature and prognostic implications of autoimmune hepatitis with an acute presentation. *J Hepatol* 1994; 21:866-71.
- ¹² Czaja AJ: Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 30:394-401.
- ¹³ Czaja AJ, Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA and Donaldson PT: Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis [see comments]. *Gastroenterology* 1999; 117:645-52.
- ¹⁴ Krawitt EL: Autoimmune hepatitis [see comments]. *N Engl J Med* 1996; 334:897-903.
- ¹⁵ Czaja AJ: Drug therapy in the management of type 1 autoimmune hepatitis. *Drugs* 1999; 57:49-68.
- ¹⁶ Johnson PJ, McFarlane IG and Williams R: Azathioprine for long-term maintenance of remission in autoimmune hepatitis [see comments]. *N Engl J Med* 1995; 333:958-63.
- ¹⁷ Toda G, Zeniya M, Watanabe F, Imawari M, Kiyosawa K, Nishioka M, Tsuji T and Omata M: Present status of autoimmune hepatitis in Japan-correlating the characteristics with international criteria in an area with a high rate of HCV infection. Japanese National Study Group of Autoimmune Hepatitis. *J Hepatol* 1997; 26:1207-12.

III-3. 原發性胆汁性肝硬

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の病因分子の推定

研究協力者 石橋 大海 九州大学大学院医学研究院病態修復内科学 助教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の病態形成に深く関わっていると考えられる免疫応答の実態を明らかにし、自己抗体の産生機序、自己反応性 T 細胞による対応抗原の認識機構・反応機構を解析することにより、PBC の病因を明らかにすることを目的とする。

本年度は、1) AMA の産生は他の外来抗原に対する抗体同様抗原刺激誘導による選択過程によるものであり、抗原特異的自己抗体を産生する同一 B 細胞クローンの長期にわたる存在が示唆された。2) T 細胞が分子相同性機構や細菌との交差認識機構を通じて PBC の発症や自己抗体の産生に中心的な役割を果たしている可能性および大腸菌が PBC の発症と免疫病態の維持に関与している可能性を明らかにした。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)の病態形成に深く関わっていると考えられる免疫応答の対応抗原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病因分子を明らかにし、最終的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。本年度は、

1) AMA の一つである抗 PDC-E2 抗体を産生する B 細胞クローンの抗体遺伝子の可変領域の構造解析を行うことにより、AMA 産生機構のメカニズムを解明し、抗体産生機構の面から対応抗原の性質を推定する。

2) AMA の主要対応抗原 (PDC-E2) 特異的 T 細胞クローンのペプチド認識情報をもとに、蛋白質学的に処理した修飾ペプチド (アナログペプチド) を作成して T 細胞反応様式を解析し、病因となり得る分子の検索を行うこと、を目標とした。

AMA 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 (¹⁶³GDLLAEIETDKA¹⁷⁶) であることを同定し、T 細胞の認識にはこのうち、¹⁷⁰glutamic acid (E), ¹⁷²aspartic acid (D), ¹⁷³lysine (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

分子相同性の概念は他の自己免疫性疾患においても自己反応性 T 細胞活性化の重要なメカニズムとして提唱されており、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・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ている。

B. 研究方法

1. 抗 PDC-E2 抗体産生 B 細胞クローンの抗体遺伝子可変領域の構造解析

一人の PBC 患者末梢血より抗 PDC-E2 モノクローナル IgG 抗体産生 B 細胞株 3 株を樹立し、これら 3 クローンより抽出した total RNA を用い cDNA を合成した。特異的プライマーを用いて PCR を行い、H 鎖及び L 鎖の可変領域を増幅した後、クローニング及びその塩基配列を決定した。同様に、同一患者の顆粒球 genomic DNA より、一つの抗 PDC-E2 抗体の V gene に対する counterpart segment を同定した。

2. PDC-E2 特異的 T 細胞のエピトープ・ペプチドあるいはアナログペプチドに対する反応性

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した。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した。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した。なお、T 細胞の採取は本人の了解を得て行った。

C. 研究結果

1. ヒト型モノクローナル抗体の精製と抗体遺伝子 H 鎖及び L 鎖の可変領域の構造解析

一人の PBC 患者から異なった時期にクローン化した 3 つの B 細胞クローンの抗 PDC-E2 抗体遺伝子の塩基配列を求め、抗体遺伝子の由来について解析を行った結果、1) 3 つの抗体遺伝子 H 鎖及び L 鎖の可変領域はそれぞれ異なった遺伝子ファミリーを利用していて、特異的な遺伝子ファミリーの使用はなかった、2) 使用されている遺伝子ファミリーは外来抗原に使用されているものと相違することはなかった、3) 体細胞突然変異が確認された、4) 2 年 5 ヶ月の長期間、同じ抗体遺伝子を有し、高いアフィニティを有する自己抗体を産生する B 細胞の存在が確認された。

2. PDC-E2特異的T細胞のエピトープ・ペプチドあるいはアナログペプチドに対する反応性

1) PDC-E2 163-176特異的T細胞クローンのmimicry peptideとの反応性

大腸菌他、細菌由来の抗原を含めて、ヒトPDC-E2 163-176特異的T細胞クローンの外来性抗原、自己抗原に対する交差反応性を検討した。ヒトPDC-E2 163-176ペプチドと比較的高いホモロジーを有する14-merのペプチドの中から少なくとも一つのPDC-E2 163-176反応性T細胞クローンが反応したペプチド11種に対するヒトPDC-E2 163-176特異的T細胞クローンの反応をみた結果、反応パターンはGroup AとGroup Bの2つに分類された。Group Aに属するT細胞クローン(HT-6)はミトコンドリア抗原であるPDCのE3BPコンポーネントやOGDC-E2由来のペプチドと反応するだけでなく、ExDKモチーフを有する大腸菌その他の細菌由来のペプチドとも反応した。一方、Group Bに属するT細胞クローン(IY-1)はEIExDモチーフを有するE3BP由来のペプチドとのみ反応し、ExDKモチーフを有する細菌由来のペプチドとは反応しなかった。

2) ヒトPDC-E2特異的T細胞の他の自己抗原に対する交差反応性

ヒトPDC-E2 163-176特異的T細胞クローンの一部はExDKモチーフを有するE3結合蛋白やOGDCとも交差反応性を示すが、類似のアミノ酸配列を有しながらExDKモチーフを有さないBCOADCに対しては交差反応性が低いことが示された。

3) ヒトPDC-E2特異的T細胞の大腸菌由来ペプチドに対する反応性

樹立した計7株のT細胞クローンのうち大腸菌PDC-E2ペプチドと交差反応を示したものが1株、大腸菌OGDC-E2ペプチドと交差反応を示したものが5株存在した。両者ともに対する交差反応を示したものはなかった。

D. 考察

我々はまずPBC患者末梢血よりヒト型抗PDC、抗OGDCモノクローナル抗体を産生するB細胞株をクローン化し、ヒト型PDC-E2に対するモノクローナル抗体を精製した。つぎに、PDC-E2の外側リポ酸ドメインおよび内側リポ酸ドメインを網羅するように合成ペプチドを合成し、そのペプチドによる抗原と抗体との結合の阻害活性をみることにより、B細胞エピトープを明らかにした。B細胞エピトープはPDC-E2の内側および外側リポ酸ドメインのリポ酸結合リジンを中心に存在した。

今回の抗体遺伝子可変領域の構造解析の結果、PBC患者末梢血中の抗親和性でmonospecificなIgG型抗PDC-E2 monoclonal抗体の産生過程において、Ag-driven clonal selectionのmechanismが働いていると推定された。PBC患者体内において、特異的なIgG型抗PDC-E2抗体産生B細胞 cloneの一つが少なくとも約2年5ヶ月間存在することが明らかになった。時

期によって優位なB細胞クローンが変遷する可能性が示唆された。

一方、PDC-E2特異的T細胞クローンの自己抗原あるいは細菌由来抗原に対する交差反応性を検討した結果、PDC-E2 163-176反応性T細胞はまだ直接の証拠は得られていないがPBCの病因と深く関係していることが推定される。興味あることにPDC-E2 163-176反応性T細胞のTCRリガンドの認識は多様性に富むが、アナログペプチドとの反応からExDKとEIExDの2つのモチーフが同定された。さらに、それぞれのモチーフサーチにより、PDC-E2 163-176反応性T細胞の中に複数の細菌由来のペプチドやヒトOGDC-E2、E3BPなどのミトコンドリア蛋白由来のペプチドと反応するT細胞が存在していることが明らかになった。このことは、Tリンパ球のTCRリガンド認識における分子相同性機構が自己免疫疾患の発症や対応抗原の拡がりに関与している可能性を強く示唆するものと考えられる。

今後は、これらのPDC-E2 163-176反応性T細胞の役割をさらに明らかにするために、in vitroの胆管障害のアッセイ方法の確立やPBC動物モデルの開発、さらには免疫学的治療戦略として、自己抗原反応性T細胞のアナジーへの誘導、あるいはTh2タイプの細胞への誘導が想定される。

E. 結論

AMAの産生は他の外来抗原に対する抗体同様antigen-driven, clonal selectionによるものであり、抗原特異的自己抗体を産生する同一B細胞クローンの長期にわたる存在が示唆された。

また、T細胞が分子相同性機構や細菌との交差認識機構を通じてPBCの発症や自己抗体の産生に中心的な役割を果たしている可能性、大腸菌がPBCの発症と免疫病態の維持に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukushima, N., Ikematsu, H., Nakamura, M., Matsui, M., Shimoda, S., Hayashida, K., Niho, Y., Koike, K., Gershwin, M.E., Ishibashi, H. Nucleotide variations amongst V_H genes of AMA-producing B cell clones in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmunity* 14(3): 247-257, 2000

2) Shimoda, S., Nakamura, M., Shigematsu, H., Tanimoto, H., Gushima, T., Gershwin, M.E., Ishibashi, H. Mimicry peptides of human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant T-cell epitope of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 31(6): 1212-1216, 2000

3) Shigematsu, H., Shimoda, S., Nakamura, M., Matsushita, S., Nishimura, Y., Sakamoto, N., Ichiki, Y., Niho, Y., Gershwin, M.E., Ishibashi, H. Fine specificity of T cells reactive to human PDC-E2

163-176 peptide, the immunodominant autoantigen in primary biliary cirrhosis: Implications for molecular mimicry and cross-recognition among mitochondrial autoantigens. *Hepatology* 32(5): 901-909, 2000

4) Ishibashi, H., Shimoda, S., Shigematsu, H., Ichiki, Y., Hayashida, K., Nakamura, M. Identification of antigen that triggers the induction of autoimmune response in primary biliary cirrhosis. *Autoimmune Liver Disease-Its Recent Advances*, Nishioka, M., Watanabe, S., Arima, K., ed., p111-122, Elsevier Science B.V., Tokyo, 2000

5) Nishio, A., Keefe, E.B., Ishibashi, H., Gershwin, M.E. Diagnosis and treatment of primary biliary cirrhosis. *Med Sci Monit*, 6(1): 181-193, 2000

6) Nishio, A., Coppel, R., Ishibashi, H., Gershwin, M.E. The pyruvate dehydrogenase complex as a target autoantigen in primary biliary cirrhosis. in *Diagnosis and treatment of primary biliary cirrhosis. Baillière's Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology* 14(4): 535-547, 2000

7) 中村 稔, 下田慎治, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における T 細胞認識抗原の多様性と交差認識. *日本臨床免疫学会誌* 23(6): 221-226, 2000

2. 学会発表

1) Shimoda, S., Nakamura, M., Shigematsu, H., Ishibashi, H. Molecular mimicry in primary biliary cirrhosis. *IASL-APASL Joint Meeting 2000-New Insights of Hepatology in the 20th century*, IASL, 2000.6.2-7, Fukuoka

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. <シンポジウム: 原発性胆汁性肝硬変の病態と治療> 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における, 抗ミトコンドリア抗体 (AMA) 主要対応抗原間の T 細胞による交差反応性について. 第36回日本肝臓学会総会, 2000.6.9, 福岡

3) 下田慎治, 重松宏尚, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変における自己抗原反応性 T 細胞の交差反応性による外来抗原の認識. 第37回日本消化器免疫学会, 2000.8.4, 東京

4) Shimoda, S., Nakamura, M., Shigematsu, H., Ishibashi, H. Molecular mimicry in primary biliary cirrhosis. *The 4th US-Japan Meeting on Autoimmune Liver Diseases*, 2000.9.14-16, Turtle Bay, Hawaii

5) 中村 稔, 下田慎治, 石橋大海. <シンポジウム: 免疫疾患における T 細胞-抗原認識と免疫制御の可能性> 原発性胆汁性肝硬変における T 細胞認識抗原

の多様性と交差認識. 第28回日本臨床免疫学会総会, 2000.9.28, 東京

6) Ishibashi, H., Shimoda, S., Nakamura, M. <Symposium: Immunology and molecular biology for the treatment of intractable liver diseases> Induction of T cell anergy by antigen peptide analogue in primary biliary cirrhosis. *International Symposium, DDW-Japan 2000*, 2000.10.25-26, Kobe

7) Shimoda, S., Nakamura, M., Shigematsu, H., Tanimoto, H., Gushima, T., Gershwin, M.E., Ishibashi, H. Mimicry peptides of human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant T-cell epitope of primary biliary cirrhosis. *51st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD)*, 2000.10.27-31, Dallas

8) Shigematsu, H., Shimoda, S., Nakamura, M., Matsushita, S., Nishimura, Y., Sakamoto, N., Ichiki, Y., Niho, Y., Gershwin, M.E., Ishibashi, H. Fine specificity of T cells reactive to human PDC-E2 167-176 peptide, the immunodominant autoantigen in primary biliary cirrhosis: Implications for molecular mimicry and cross-recognition among mitochondrial antigens. *51st Annual Meeting of AASLD*, 2000.10.27-31, Dallas

9) 下田慎治, 重松宏尚, 石橋大海. <シンポジウム: 難治性肝疾患への免疫学の挑戦> PBC におけるミトコンドリア抗原に対する T 細胞の反応性と大腸菌感染の意義. 第4回日本肝臓学会大会, 2000.10.25-26, 神戸

10) 谷本博徳, 下田慎治, 重松宏尚, 中村 稔, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における大腸菌抗原特異的 T 細胞の樹立と自己抗原との交差反応性. 第30回日本免疫学会学術集会, 2000.11.16

11) 下田慎治, 中村 稔, 重松宏尚, 谷本博徳, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 患者より樹立したピルビン酸脱水素酵素 PDC-E2 163-176 特異的 T 細胞クローンの置換ペプチドへの反応性. 第30回日本免疫学会学術集会, 2000.11.16, 仙台

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

(1) PBCスコアの作成と自己免疫性肝疾患診断における有用性の検討

研究協力者 辻 孝夫 岡山大学医学部第一内科 教授

研究要旨：自己免疫性肝炎（AIH）についてはInternational AIH groupによりscoring systemが提唱されており、AIHの診断に役立っている。しかし、原発性胆汁性肝硬変（PBC）については今までscoring systemがなく、診断に苦慮する場合があった。AIHスコアに準じて、PBCスコアを設定した。PBC 142例、AIH 48例およびAMA陰性のPBC（いわゆるAIC）118例を対象に、PBCスコアの妥当性について検討した。Total scoreでは、PBC群、AIC群およびAIH群の平均値はそれぞれ24.0、12.3、3.6であり3群は明確に分離された。トータルスコアでは、17<をdefinite、9-17をprobableとすると、PBCの1例を除く全例がprobable以上と診断され、142例中126例（88.7%）がdefiniteと診断された。一方AIH症例の48例中5例（10.4%）がprobableと診断されたが、definiteとなる症例はいなかった。付加項目を除いたスコアでは、12<をdefinite、6-12をprobableとすると、PBCの3例を除く全例がprobable以上と診断され、142例中119例（83.8%）がdefiniteと診断された。AIHの48例中9例（18.8%）がprobableと診断されたが、definiteとなる症例はいなかった。PBC scoring systemはPBCおよび自己免疫性疾患の診断の補助として有用と考えられた。

共同研究者 山本和秀 岡山大学第一内科、
阿部雅則 愛媛大学第三内科

鏡および肝生検で診断された、PBC 142例、AIH 48例およびAMA陰性のPBC（いわゆるAIC）118例を対象に、PBCスコアの妥当性について検討した。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）と自己免疫性肝炎（AIH）は代表的な自己免疫性疾患であり、自己免疫性肝疾患の両極に位置する病態と考えられる。すなわちAIHでは肝細胞が自己免疫的障害の標的となり、一方PBCにおいては肝内の胆管細胞が標的で、典型例における両者の鑑別は容易である。しかし、以前より両者の性格を有する症例やPBCの臨床像を示しながら抗ミトコンドリア抗体（AMA）が陰性の症例など、非定型的な症例が少なからず経験され、これらの症例については診断に苦慮する場合がある。

AIHについてはInternational AIH GroupによりAIHスコアが提唱され¹⁾、補助的診断の一つとして役立っている。PBCについてはこのようなスコアが設定されておらず、本邦では厚生省班会議の診断指針に従い、臨床的、病理学的所見を総合して診断されてきた。本研究ではPBCスコアを設定することにより、PBCやAIHなどの自己免疫性肝疾患の診断補助としての有用性を検討する。

B. 対象と方法

AIHスコアに準じて、PBCスコアを設定した。項目として、性、ALP/ALT、IgM、T. cholesterol、AMA、抗核抗体、ウイルスマーカー、薬剤・血液製剤歴、アルコール歴、遺伝因子の有無を含め、付加項目として、肝生検の病理組織像、画像所見、自己抗体、遺伝的要因を加えた。

岡山大学第一内科および愛媛大学第三内科にて腹腔

C. 結果

Total scoreでは、PBC群、AIC群およびAIH群の平均値はそれぞれ24.0、12.3、3.6であり3群は明確に分離された。Total score 17<をdefinite、9-17をprobableとすると、PBCの1例を除く全例がprobable以上と診断され、142例中126例（88.7%）がdefiniteと診断された。一方AIH症例の48例中5例（10.4%）がprobableと診断されたが、definiteとなる症例はいなかった。付加項目を除いたスコアでは、12<をdefinite、6-12をprobableとすると、PBCの3例を除く全例がprobable以上と診断され、142例中119例（83.8%）がdefiniteと診断された。AIHの48例中9例（18.8%）がprobableと診断されたが、definiteとなる症例はいなかった。またAMAなしでのスコアでは12<をdefinite、8-12をprobableとすると、PBCの全例がprobable以上と診断され、142例中134例（94.4%）がdefiniteと診断された。AIHの48例中17例（35.4%）がprobableと診断された。

PBCスコアを縦軸に、AIHスコアを横軸にとり、2つのスコアを組み合わせると2次元でプロットすると、PBCとAIHを両極に分離でき、その中間にAIC症例が配置された。PBC、AIC、AIHの比較では、AICはPBCスコア、AIHスコア共に両者の中間に位置する形になった。

D. 考察

PBCの診断は、血液生化学所見、免疫学的所見および病理組織学的所見を総合的に加味して診断されてき

た。特に、胆道系酵素の上昇、AMA陽性および病理組織学的に慢性非化膿性破壊性胆管炎 (CNSDC) を伴う典型例ではその診断は容易である。しかし、PBC早期例や AIH の要素を示す非定型例ではその診断はしばしば困難であった。

今回設定した PBCスコアを用いてPBCおよび AIH について検討してみると、各々の平均±標準偏差はそれぞれ24.0±4.0, 3.6±3.5であり、両者を明確に区別することが可能であった。このことからPBCスコアが自己免疫性肝疾患の診断補助の一つとして有用であることが示唆された。さらに AIH スコアを同時に判定し、PBC スコアと二次元で検討するとさらに診断の補助として役立つ可能性が考えられた。PBCスコア

を縦軸に、AIH スコアを横軸にとってプロットすると、PBCとAIHを両極に分離でき、その中間にAICが配置された。AICはPBCスコア、AIHスコア共に両者の中間に位置し、病態に応じて分離することが可能であった。

自己免疫性肝疾患において診断に苦慮する症例としては、早期の自己免疫性肝疾患やPBCとAIHの両要素を持ち合わせる疾患があり、後者は overlap 症候群²⁾、mixed type、immunocholangitis、autoimmune cholan-giopathy³⁾あるいはautoimmune cholangitis などさまざまな名称で呼ばれてきた。今後、このような症例において診断補助としてのPBCスコアの有用性を検討する必要がある。

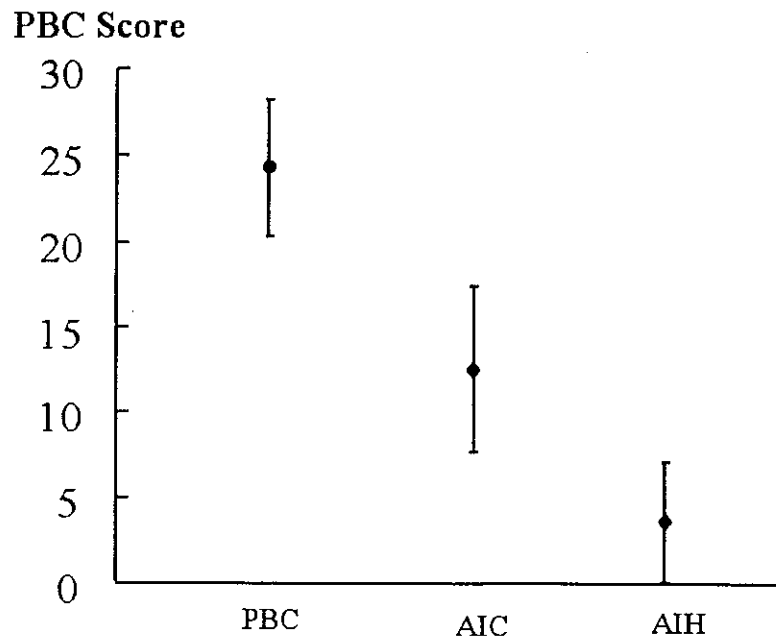
PBC Scoreの各因子と点数

1) 性	女性	+2	6) 抗核抗体	40 倍以上	-1
	男性	0		< 40 倍	0
2) ALP / ALT	>3.0	+3	7) ウイルスマーカー	陽性	-3
	3.0 - 2.0	+2		陰性	+3
	2.0 - 1.0	+1	8) 最近の肝障害を起こしうる薬剤の服薬歴 あるいは血液製剤の非経口的投与	あり	-4
	1.0 - 0.5	0		なし	+1
	< 0.5	-1	9) アルコール(一日平均飲酒量)	< 25 g/day	+2
3) IgM の正常上限値との比	>2.0	+3		> 60 g/day	-2
	1.5 - 2.0	+2	10) 遺伝的因子	患者の血族2親等内に PBC あり	+2
	1.0 - 1.5	+1		患者あるいは1親等内での他の 自己免疫疾患あり	+1
	<1.0	0			
4) T.cho の正常上限値との比	>1.0	+1			
	<1.0	0			
5) AMA, AMA-M2 抗体	ELISA 法で陽性	+5			
	ELISA 法で陰性	-3			

付加項目

1) 病理組織	CNSDC を認める	+10
	肉芽腫を認める	+5
	門脈域の胆管 / 動脈比が 0.8 未満	+5
	胆管細胞の変性 (空胞化、多層化)	+2
	胆管細胞の増生、5%以上の形質細胞の浸潤	+1
	中等度以上 (5 個 / 小葉以上) の巣状壊死	-2
	異なる病因が示唆される所見 (鉄沈着など)	-2
2) 画像診断所見	脂肪肝を認める	-1
	胆管結石、胆嚢結石あり	-3
	胆管閉塞及び狭窄の所見あり	-10
3) 自己抗体	AMA 陰性で、抗セントロメア抗体が陽性	+2
	AMA 陰性で、抗セントロメア抗体が陰性	0
4) 遺伝的要因	HLA-DR 8 ハプロタイプ陽性	+1

PBCスコア (Total)	definite 17 <, probable 9 - 17
(付加項目なし、AMA あり)	definite 12 <, probable 6 - 12
(AMA のみなし)	definite 12 <, probable 8 - 12



E. 文献

- 1) Alvarez F, et al. International Auto-immune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-38.
- 2) Duclos-Vallee JC, et al. Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1069-1073.
- 3) Ben-Ari Z, et al. Autoimmune cholangiopathy: part of the spectrum of autoimmune chronic active hepatitis. *Hepatology* 1993; 18: 10-15.

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

(2) PBCにおける胆管細胞特異的に発現する遺伝子の検索

研究協力者 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)では肝内胆管がT細胞を中心とする自己免疫学的機序により破壊されることが推察されているが、その標的抗原は未だ不明である。従来PBCの胆管細胞を純粋に収集することは困難であり、PBCの胆管細胞特異的に起こっている変化を明らかにすることは不可能であった。近年、laser captured microdissection (LCM)の開発により、顕微鏡下に特定の細胞のみを同定し、収集することが可能となった。またpolymerase chain reaction (PCR)やDNA microarrayなどの分子生物学的手法を用いることにより、微量な組織からの遺伝子発現を解析が可能となってきている。本研究では、LCMによりPBC胆管細胞に特異的に発現されている遺伝子を解析することにより、胆管細胞障害の標的抗原を同定することを試みた。Preliminaryな実験として、正常肝を対象に、LCMにより胆管細胞を採取し、胆管細胞特異的に発現されるcytokeratin 19 (CK19)のmRNAの検出を試みた。その結果、胆管細胞を選択的に採取することが可能であり、 β -actinおよびCK19のmRNAの発現をRT-PCRにより確認できた。今後、他の遺伝子解析を進めていく予定である。

共同研究者 山本和秀、東 俊宏、坂口孝作、
下村宏之

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)では、肝内の中等大胆管が破壊され末期には胆汁うっ滞を来すが、胆管障害の機序は不明である。破壊胆管周囲にはリンパ球をはじめ種々の免疫担当細胞が集簇していることから、自己免疫学的機序による胆管破壊が推察されている。一方、PBCに特異的に出現する抗ミトコンドリア抗体の対応抗原が pyruvate dehydrogenase complex (PDC) であることが明らかにされ¹⁾、PDCあるいは分子相同性を示す物質が胆管細胞内に存在する可能性および胆管障害の標的分子である可能性が示唆されている。しかし、in situ hybridization による検討ではPDCの分子そのものの発現増強は認められておらず、現在までのところ胆管上皮細胞における標的分子は同定されていない²⁾。

PBCにおける標的抗原や病因の解明が困難であった理由の一つに、胆管上皮細胞を純粋に集め、解析することが困難であったことがあげられる。近年、laser capture microdissection (LCM)が開発され、単一の細胞レベルで細胞を回収することが可能となってきている³⁾。そこで、正常およびPBCの胆管上皮細胞を選択的に集め、胆管細胞に特異的に発現されている遺伝子を解析することにより、標的分子の同定を試みる。

B. 対象と方法

正常肝1例および肝移植時に得られた先天性胆道閉鎖症1例を対象にした。凍結切片を作成し、70%エタノール固定後、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、胆管細胞を選択的にLCM (Arcturus Engineering,

Inc.)により収集した。採取組織よりtotal RNAをtotal RNA Microprep kit (Stratagene) を用いて抽出し、oligo dT primer (SuperScript, Life Technologies) を用いてcDNAに変換した。肝臓内では胆管細胞特異的に発現されている Cy-tokeratin 19 (CK19)特異的なprimerを用いてPCR (40 cycles)により遺伝子産物を増幅した。 β -actinを内部コントロールとして用いた。genomic DNAはDNaseにより消化した。genomic DNAの増幅についてreverse transcription (RT)を行わずに同様のPCRを行った。

C. 研究結果

LCMにより胆管細胞のみを採取することが可能であった。この方法により PBC 肝よりも胆管細胞のみを純粋に収集することが可能と考えられた。

採取された組織における、 β -actinおよびCK19特異的primerを用いたPCRにより、各々のPCR産物を増幅させることが可能であった。RTを行わない場合にはPCR産物が認められないことから、genomic DNAからの増幅はないものと考えられた。

今後、PBCおよび正常肝の胆管上皮細胞を比較検討し、胆管細胞特異的に発現している遺伝子を解析する予定である。

D. 考案

PBCは臓器特異的自己免疫性疾患の一つと考えられており、他の自己免疫性疾患同様に胆管上皮細胞に特異的に発現されている抗原に対して、自己免疫反応が惹起されていると推察されている。しかし、現在までのところ胆管細胞に特異的に発現されている抗原およびその発症機序も不明である。胆管細胞は組織中に少数であり、PBCの病的細胞を純粋に単離、収集することは困難であったため、病的胆管細胞の解析は不可

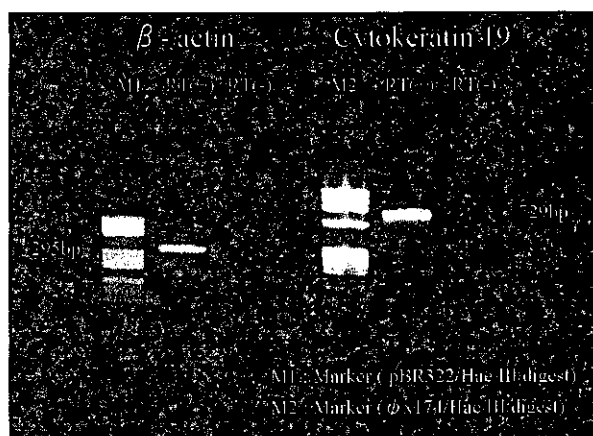
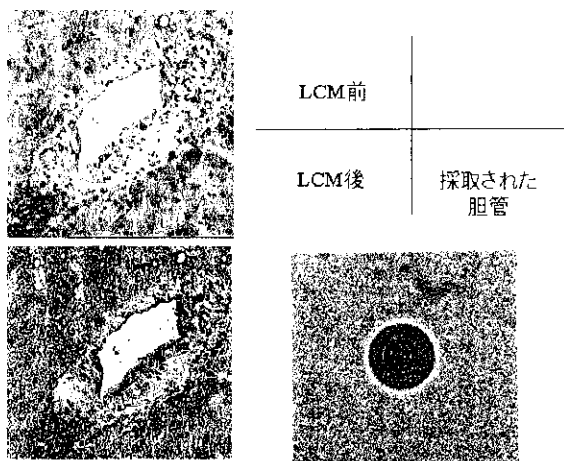
能であった。

近年開発された LCM により、顕微鏡下に特定の細胞のみを回収することが可能であり、その細胞における特異的遺伝子発現を解析可能である。この方法は、特定の細胞における遺伝子発現、癌細胞における遺伝子発現⁴⁾、神経細胞における遺伝子発現⁵⁾の解析などに応用されてきている。さらに、単一の細胞における遺伝子発現も分子生物学的な手法を駆使して可能となってきた。

本研究では、正常肝からの胆管細胞の採取および胆管細胞特異的な遺伝子の増幅を試みたところ、胆管細胞を特異的に採取でき、またCK19のmRNAの発現を

RT-PCRにより確認可能であった。今後、mRNAからcDNA libraryの作成および正常胆管細胞とのsubtractionまたはDNA microarrayを用いた解析により、特異的抗原を同定する予定である。

自己免疫性疾患において標的抗原が同定されれば、すでに多発性硬化症において治療が試みられているように、将来標的抗原を用いて自己寛容を誘導する治療応用が可能となる⁶⁾。PBCにおける胆管細胞特異的に発現されている遺伝子の解析は、胆管障害機序の解明のみならず、将来の治療応用に重要な意味をもつと考えられる。



E. 文献

- 1) Van de Water J, et al. Autoantibodies of primary biliary cirrhosis recognize dihydrolipoamide acetyltransferase and inhibit enzyme function. *J Immunol* 1988; 141: 2321-2324.
- 2) Harada K, et al. In situ nucleic acid hybridization of pyruvate dehydrogenase complex-E2 in primary biliary cirrhosis: pyruvate dehydrogenase complex-E2 messenger RNA is expressed in hepatocytes but not in biliary epithelium. *Hepatology* 1997; 25: 27-32.
- 3) Emmert-Buck MR, et al. Laser capture microdissection *Science* 1996; 274: 998-1001.
- 4) Schutze K, Lahr G. Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 737-42.
- 5) Luo L, et al. Gene expression profile of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat Med* 1999; 5: 117-122.
- 6) Vandenberg AA, et al. Treatment of multiple sclerosis with T-cell receptor peptides: results of a double-blind pilot trial. *Nat Med* 1996; 2: 1109-15.

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の胆管病変の病態解明に関する研究

研究協力者 向坂彰太郎教授 福岡大学医学部 内科学第三講座

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）は自己免疫学的機序により肝内胆管の破壊をみると解釈されているがその詳細は依然として明らかではない。本研究では、PBC胆管における細胞間のtight junctionを免疫組織化学的に観察し、他の胆汁うっ滞性疾患との病変の違いを検討した。その結果、PBCでは肝内の小胆管のtight junctionに変化を認めたが、このような変化はUDCA治療後のPBCでは著明に改善していた。原発性硬化性胆管炎（PSC）および肝外胆汁うっ滞では胆管のtight junctionには変化を認めず、肝細胞のtight junctionに変化が見られた。このため、PBCではうっ滞した胆汁は主として胆管の細胞間を通して血中に逆流し、PSCならびに肝外胆汁うっ滞では肝細胞間を通して胆汁は逆流するものと考えられた。

A. 研究目的

未だ詳細が明らかにされていない、原発性胆汁性肝硬変（PBC）における自己免疫学的機序による肝内胆管の破壊の病態を解明する。PBC胆管における細胞間のtight junctionを免疫組織化学的に観察し、他の胆汁うっ滞性疾患との病変の違いを検討する。

B. 対象と研究方法

PBC（UDCA治療前、および、UDCA治療後）、PSC、閉塞性黄疸、肝硬変、光顕的健常肝を対象とした。免疫組織化学的に、tight junction-associated proteinであるZO-1と7H6の局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

C. 研究結果

健常肝および硬変肝では、上記2種類の蛋白は、胆管細胞ならびに肝細胞においてcolocalizeしていた。PBCでは胆管細胞において、ZO-1は局在していたが、7H6の局在が減弱あるいは消失していた。しかし、肝細胞ではZO-1の局在に変化をみなかったものの、7H6の局在は、stageがⅢあるいはⅣへと進行するにつれ、徐々に減弱・消失していた。また、UDCA治療後のPBCでは、胆管細胞の7H6の局在の変化は健常肝に類似した状態までに改善していた。

一方、PSCおよび肝外胆汁うっ滞では、胆管細胞のtight junctionではZO-1および7H6はcolocalizeしていたが、肝細胞の7H6の局在が消失していた。

D. 考察

以前、我々はPBCでは胆管細胞のアポトーシスが多いことを報告したが、今回の検討によりPBCでは胆管のtight junctionに変化を来していることが明らかとなった。7H6の免疫組織化学的局在の減弱あるいは消失は、tight junctionの透過性と相関することが知られているため、PBCでは胆管のparacellular pathwayを介した透過性の亢進があるものと考えられた。この事により、PBCでは、胆汁中に含まれる細胞障害性胆汁酸やエンドトキシン、種々の細菌成分

がparacellular pathwayを介して、胆管外へと漏出し、胆管細胞周囲に炎症細胞の浸潤を促し、あるいは種々のサイトカインの産生を亢進させると推測される。さらに、これら浸潤細胞ならびに産生されたサイトカインは胆管障害を惹起しあるいは障害を助長させるものと考えられた。

一方、PSCでは、胆管周囲の線維化による胆管障害が予想されるが、少なくとも胆管のtight junctionの障害は認められず、このため、本疾患の胆管周囲の炎症細胞浸潤は著明ではないのかもしれない。しかし、PSCでは肝細胞のtight junctionに変化が見られ、胆汁成分は肝細胞のparacellular pathwayを通して類洞に逆流するものと考えられた。また、肝外胆汁うっ滞でもPSCとほぼ同じtight junction蛋白の局在の変化が見られたため、PSCでは胆管周囲の線維化により胆管の狭窄が生じ、毛細胆管を含めた胆道系の内圧の上昇を来し、その結果通常でも胆管に比べleakyな肝細胞のtight junctionを介した胆汁の逆流が起こるものと考えられた。

E. 結論

PBCではうっ滞した胆汁は主として胆管の細胞間を通して血中に逆流し、PSCならびに肝外胆汁うっ滞では肝細胞間を通して胆汁は逆流するものと考えられた。
参考文献：Sakisaka S, Koga H, Sasatomi K, et al. Biliary secretion of endotoxin and pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Yale Journal of Biology and Medicine* 1998, 70:403-408.

F. 研究発表

- 論文発表
- 1) 向坂彰太郎：原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病態。診療と新薬37（6）：762-764，2000
- 2) 向坂彰太郎：原発性胆汁性肝硬変。胆と膵21：647-650，2000

G. 知的所有権の取得状況 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

- (1) Latentにあるいはearly PBCに関する研究
- (2) PBCにおける樹状細胞機能異常

研究協力者 恩地 森一 愛媛大学医学部第三内科 教授

研究要旨：(1) 潜在性あるいは早期と考えられる原発性胆汁性肝硬変(PBC)の臨床病理学的特徴を明らかにするため、肝生検時の血清ALP値により層別化し解析した。血清AL値が低値の症例は全例が無症候性で、19例中18例がScheuer I期であった。(2) PBCにおける樹状細胞(DC)機能異常について、末梢血から単離したDCを用いて解析した。このDCにおいても異系同種T細胞の幼若化補助能は低下しており、DCの機能異常がPBCの病態に関わっていることが示唆された。

(1) Latentにあるいはearly PBCに関する研究

A. 研究目的

肝機能検査が正常であっても抗ミトコンドリア抗体(AMA)陽性で慢性非化膿性破壊性胆管炎(CNCD)を認める症例や、IF法やELISA法でAMA、M2抗体が検出できないがimmunoblot法では検出可能であるPBC症例が存在する。このような症例は診断困難であり、潜在性あるいは早期の症例と考えられる。今回、組織学的検索を行ったPBC症例について、肝生検時の血清ALP値に着目し肝機能正常あるいは軽度異常例の臨床病理学的特徴を解析した。

B. 研究方法

当教室で組織学的検索を行いPBCと診断された89例について、肝生検時の血清ALP値により層別化し、その臨床病理学的特徴を解析した。

C. 研究結果

ALPが正常上限の1.5倍以下(ALP低値例)の19例は全例無症候性であった。血液生化学検査では、ALP低値例では総コレステロール値が低かった($p < 0.05$)。組織学的検索では、ALP低値例では19例中18例がScheuer I期で、1例はII期だった。肉芽腫はALP低値例に多く見られた($p < 0.05$)。

D. 考察

肝機能検査が正常ないし軽度異常のPBC症例については診断困難であることが多い。今回の検討では、血清ALP値がPBCの臨床病態と関与している可能性が示唆された。当教室でもPBC患者の姉妹検索の結果、肝機能が正常でIF、ELISA法でM2抗体陰性だが、immunoblot法でM2抗体陽性である女性を経験している。実際、生体肝移植でドナーがM2抗体陽性でレシピエントにPBCが発症した例も報告されている。Latentな経過をとるPBC患者も存在することから、ドナーについてはimmunoblot法での検索が必要と考えられる。

E. 結論

肝機能検査が正常であるLatentにあるいはearly PBCが存在しており、今後検討が必要である。

F. 健康保険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Abe M et. al. Hyperplastic liver nodules associated with early-stage primary biliary cirrhosis mimicking hepatocellular carcinoma. Dig Dis Sci 45;1563-67,2000

2. 学会発表

第4回日本肝臓学会ワークショップ 非典型的な原発性胆汁性肝硬変と自己免疫性肝炎の臨床像 阿部雅則, 日浅陽一[肝臓41(Suppl 2)A340]

H. 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

(2) PBCにおける樹状細胞機能異常

A. 研究目的

我々は、免疫応答の中心に位置している樹状細胞(DC)に着目し、PBCの病在下に誘導されるDC(Mo-DC)は、T細胞幼若化補助能が低下していた。近年、末梢血単核球から細胞表面マーカーを利用してDCを直接単離することが可能となった(PB-DC)。今回、PBC患者および健常者からPB-DCを単離し、その機能を解析した。

B. 研究方法

対象はPBC患者5名、肝機能異常のない健常人4名。末梢血からMo-DC、PB-DCを単離した。1人の健常者のT細胞と混合培養し、T細胞幼若化補助能を測定した。

C. 研究結果

従来の報告と同様に、PBC患者のMo-DCは健常者と比較してT細胞幼若化補助能は有意に低下していた。また、PBC患者では、PB-DCについてもT細胞幼若化補助能は有意に低下していた。

D. 考察

DCの解析が急速に進み、現在ではその特性を利用して免疫療法も開始されている。我々の教室を含めて肝疾患での検討はMo-DCで行われてきた。今回、得たPB-DCは1.末梢血から直接単離している。2.サイトカイン、培養による影響がない。3. purityが高い。といった特徴がある。PBCではPB-DCでも機能低下があることが明らかとなった。今後、そのメカニズムの解析が必要である。また、DCのサブセットとPBCの病態との関わりについてを究明する必要がある。

E. 結論

PBC患者では、単球由来のDCと同様に、末梢血から直接単離したDCでも機能低下が見られた。

F.健康保険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Onji M et. al. Intrahepatic dendritic cells. Progress in Hepatology, 5 Liver and immunology; p13-22,2000.

Masumoto T et.al. Role of dendritic cells in patients with primary biliary cirrhosis.

Autoimmune Liver Disease-Its Recent Advances;p149-155,2000.

Okazaki A et. al. Expression of inducible nitric oxide synthase on antigen-presenting dendritic cells. Dendritic cells 10:23-24,2000.

Tanimoto K et.al. Immunohistochemical localization of CD83+ dendritic cells in patients with primary biliary cirrhosis. Dendritic cells 10:19-21,2000.

2. 学会発表

第86回日本消化器病学会総会ワークショップ 原発性胆汁性肝硬変における抗原提示樹状細胞の一酸化窒素産生の解析 山本和寿, SMF Akbar[日本消化器病学会雑誌(臨増) A116,2000]

H. 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

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

PDC-E2発現とPBCに関する実験病理学的検討

研究協力者 小林 健一 金沢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）の発症に抗ミトコンドリア抗体（AMA）、およびその対応抗原がどのように関与しているのか、未だ明らかにされていない。本研究ではAMAの対応抗原の一つであるpyruvate dehydrogenase complex E2 component（PDC-E2）遺伝子を胆管上皮細胞に強発現する実験モデルの作製を試みた。胆管細胞特異的遺伝子の一つであるマウスcytokeratin 19のプロモーター領域の下流にマウスPDC-E2遺伝子を挿入し、発現プラスミドを構築した。プラスミドをマウス培養胆管上皮細胞に導入し、一過性発現モデルを作製した。またC57/BL6マウスの卵細胞に導入し、PDC-E2トランスジェニックマウスを作製した。いずれのモデルにおいても、導入した遺伝子の発現が認められた。これらの系はPBCの基礎研究の一助となると考えられた。

研究目的 抗ミトコンドリア抗体（AMA）、ないしその対応抗原である pyruvate dehydrogenase complex E2 component（PDC-E2）は、原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病因とは直接関連しない、いわゆる epiphenomenon であるとする考えがある一方、病因と直接関連するとの考えもあり、未だ明らかではない。本研究ではPDC-E2の過剰発現がPBCの病因となりうるかを検討する目的で、胆管上皮にPDC-E2を強発現する実験モデルの作製を試みた。

研究方法 (1) マウスPDC-E2 cDNA：マウス肝臓から mRNA を調整し、RT-nested PCR 法にてマウスPDC-E2 ORFを含むcDNAをクローニングした。(2) 胆管細胞特異的プロモーター：マウス肝臓から調整したゲノムDNAより、nested PCR法にて cytokeratin 19（以下CK19）プロモーター領域をクローニングした。(3) 発現ベクター：GFP 発現ベクター pEGFP（CLONTECH）にクローニングしたCK19プロモーター領域を挿入し、pCKEGFPとした。またCK19プロモーター領域の下流にマウスPDC-E2 cDNAおよびFLAG-Tagを挿入し、pCKE2FLAGを作製した。(4) マウス胆管細胞：マウスの肝内末梢胆管細胞をKatayanagiらの方法によって単離し、樹立した培養胆管細胞株を用いた。これらの細胞はコラーゲンゲル上で単層、シート状に発育した。(5) 胆管上皮への遺伝子導入：リポフェクション法にて、コラーゲンゲル上に培養したマウス胆管上皮細胞に遺伝子を導入した。(6) トランスジェニックマウス：作製したpCKE2FLAGよりプロモーター、PDC-E2、poly Aを含むDNA断片を切り出し、C57/BLマウスの卵細胞に injection し、PDC-E2トランスジェニックマウスを作製した。(7) 発現の確認：抗 FLAG M2モノクローナル抗体（Sigma）を用いて、免疫組織染色および Western blottingを行い、融合蛋白の発現を確認した。

研究結果 (1) マウス mature PDC-E2 cDNAのORF

を含む1713bpをクローニングし、塩基配列を決定した。ヒトPDC-E2 cDNAと比較して86.1%の相同性であった。またAMAの重要な対応エピトープ領域とされる lipoil-binding region（LBR）である VETDKAT-VGFESLEEC（42-57 aa）と IETDKATIGFEVQEEG（169-184 aa）を2カ所に認めた。(2)胆管細胞特異的プロモーターとしてマウスCK 19 5'-上流領域2691bpをクローニングした。(3) 胆管細胞特異的プロモーター活性の検討：GFP 遺伝子の 上流に CK 19プロモーターを組み込んだpCKEGFPをマウス初代胆管細胞に導入し、蛍光顕微鏡下に観察した。細胞質に一致して蛍光が認められ、導入後時間経過とともに蛍光量は増加した。コントロールとしてpEGFPを導入したサンプルでは蛍光は認められなかった。CK 19 5'-上流領域は胆管上皮においてプロモーター活性を有することが判明した。(4) in vitro実験モデル：pCKE2FLAGをマウス胆管上皮に導入し、抗FLAG抗体を用いた免疫染色にて蛋白の発現を検討した。遺伝子を導入したサンプルは抗FLAG抗体で染色され、PDC-E2とFLAGの融合蛋白が発現していると考えられた。(5) in vivo実験モデル：PDC-E2トランスジェニックマウスの肝組織に対し、抗FLAG抗体を用いた免疫染色を行ったところ、胆管上皮が染色された。また胆管樹から whole cell lysate を調整し、SDS-PAGEにて展開後、抗FLAG抗体を用いて Western blottingを行ったところ、PDC-E2とFLAGの融合蛋白として予想される分子量のバンドを認めた。

考察 PBC患者の肝臓では胆管上皮へのAMAの結合が観察され、AMAの対応抗原について多くの研究が行われてきた。また免疫組織染色による検討にて、PBCの胆管上皮ではPDC-E2の発現が増強している可能性が報告されている。しかし、AMAやその対応抗原が PBC の病態にどのように関与しているのか、明らかにされていない。これまでいくつかのグループがPBC動物モデルの作製を試みているが、その多くは