

精製したPDCあるいはPDC-E2蛋白にてマウスを免疫する方法である。免疫後、マウス末梢血中に抗PDC抗体をほぼ全例で認めるものの、PBCに特徴的とされる非化膿性破壊性胆管炎 (CNSDC) の頻度は報告者によって様々である。また、蛋白接種の際に用いられる Freund's complete adjuvant や lipopolysaccharide が門脈域の炎症性変化を引き起こす可能性が指摘されており、結果の解釈には慎重を要する。今回我々は、胆管上皮でPDC-E2遺伝子を強制発現する実験モデルの作製を試みた。PBC 動物モデルとしてはこれまでに報告されていない系であり、今後PDC-E2発現胆管上皮の細胞変化などを観察し、in vivo におけるPDC-E2の役割について解析を行う予定である。

結語 胆管上皮にて PDC-E2 蛋白を過剰発現する in vitro および in vivo 実験モデルを作製した。今後、これらの系を用いてPDC-E2がPBCの病態にどのように関与しているのか、検討する予定である。

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。

厚生科学研究費補助金（難治性の肝疾患に関する研究事業）

分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変の肝内浸潤T細胞レパトアの解析に関する研究

研究協力者 清澤 研道 信州大学医学部第二内科教授

研究要旨：PBC患者肝組織中には多くのクローン性T細胞が浸潤しており、さらに非クローン性T細胞も多数認められ、複雑な機序によりPBCの病態が生じている。患者総てに共通のクローンは認めなかったが、V β TCR CDR3に共通するモチーフを認め、また特定の HLA との関連もあり、PBCの病態にT細胞が深く関与すること等が明らかになった。

共同研究者 吉澤 要
信州大学医学部 第二内科講師

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）は、肝内の小葉間および隔壁胆管など中等大の胆管の慢性非化膿性破壊性胆管炎を特徴とする自己免疫性肝疾患である。胆管周囲には多くのT細胞が集積しており、一部は胆管壁を破壊している像を認める。しかし、その機能および役割については明らかでない。自己抗体である抗ミトコンドリア抗体の存在が特徴であり、ミトコンドリアM2抗原の一部であるpyruvate dehydrogenase complex (PDC) に対し患者由来T細胞が、著しい増殖反応を起こすことが知られており、胆管障害においてT細胞が重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。PBCにおける胆管障害の発症機序を解明するため、患者肝組織に集積するT細胞の性状についてT細胞レセプター(TCR: T cell receptor)を解析することにより、その免疫学的役割を検討した。

B. 研究方法

9名のPBC患者肝及び末梢血よりmRNAを抽出しcDNAを作成、TCR β 鎖のV(variable) primer 26種とC (constant) primerを用いてPCRを行った。PCR産物を用いてTCR CDR (complementarity determining region) 3 size spectratyping法にてV β の種類およびそのクローン性につき解析した。またクローン性の増殖が推測されるTCR CDR3のアミノ酸配列を決定し、そのモチーフを検討した。

(倫理面への配慮)

末梢血および肝生検組織の一部を本研究に使用すること、また、肝生検時における合併症について文章にてインフォームドコンセントを行った。

C. 研究結果

患者肝組織には多くT細胞が浸潤しており、そのT細胞のTCR spectratyping 解析からいくつかのクローン性増殖 (single peak) を示すものと、非クローン性 (Gaussian分布) のものが認められた。特に末梢血

では非クローン性増殖であるが、肝組織においてはクローン性増殖が見られた結果は、明らかに特定の抗原を認識したT細胞が集積していることを示唆した。クローン性に増殖していると推測されるT細胞のV β のアミノ酸配列を決定し、各患者間で比較したところ、同一患者においてはクローン性増殖を認めるが、患者間においては同一のクローンは存在しなかった。しかしながら、患者間でいくつかの共通のアミノ酸モチーフを認めた。3人の患者のV β 4クローンのCDR3 nDn region にGly (G)-G motifを認めた。これらはV β 4-J β 2.7 combination が優位であり、全員が HLA-DR2とDQ1陽性であった。また、2名のV β 17クローンにてG-L モチーフとV β 17-J β 2.1を認めた。この2名はHLA-A26であった。Case 5においては、V β 5.3でGAG、V β 17ではGPGモチーフを認め、HLA-DR53をもっていた。

D. 考察

本研究において PBC 患者肝組織には、クローン性に増殖するT細胞と非クローン性に増殖しているT細胞が集積していることをsize spectratyping法およびsequencingにより証明した。Spectratyping法は患者肝組織に集積する $\alpha\beta$ T細胞を全体として捉え、そのクローン性を解析するのに優れている。さらに、この検証のためsequencingを行い、クローン性を証明した。各患者においていくつかのクローン性のT細胞の増殖を認めたが患者間では同一のものを認めず、それぞれのクローンの役割、病態との関係は十分には解析できなかった。しかしながら、3人のPBC患者のCDR3 nDn regionsにGly (G)-G motifを認め、これらはV β 4-J β 2.7 combination で占められておりともにHLA-DR2 and DQ1であった。また2名のV β 17クローンではG-L motif およびV β 17-J β 2.1が認められHLA-A26であった。またIchikiによるとHLA-DR53をもつPBC患者末梢血でPDC-E2 peptide特異的T細胞が存在し、この患者にはTCR V β CDR3 nDn 領域にGXGモチーフを数名に認めたと報告していることより、われわれの成績もさらに検討する必要があると考えられる。

E. 結論

PBC患者肝組織中には多くのクローン性T細胞が浸潤しており明らかに特定の抗原を認識して肝組織に集積していることが示唆された。さらに非クローン性T細胞も多数認められ、複雑な機序により PBC の病態が生じていることがうかがわれた。患者総てに共通のV β は認めなかったが、TCR CDR3に共通するモチーフおよび特定のV β -J β combinationを認めた。また特定のHLAとの関連もあり、PBCの病態にT細胞が深く関与することが判明した。この TCR 抗原特異性に基づくPBCの病態が明らかにできれば、免疫療法を用いたPBCの予後改善が期待される。

F. 健康危険情報

ルーチン検査としての肝生検時に少量のサンプルを研究用に使用した。そのため、肝生検における合併症の危険につき説明、理解を得た。

G. 研究発表

1. 論文発表

Inada H, Yoshizawa K, Ota M, Katueyama Y, Ichijo T, Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K. T Cell Repertoire in the Liver of Patients with Primary Biliary Cirrhosis. Human Immunology 61, 675-683, 2000.

2. 学会発表

Inada H, Yoshizawa K, Ota M, Katueyama Y, Ichijo T, Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K. T Cell Repertoire Analysis in the Liver of Patients with Primary Biliary Cirrhosis. APASL, Fukuoka, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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）

分担研究報告書

わが国の一般集団における抗ミトコンドリア抗体の検討

研究協力者 賀古 眞 社会保険都南病院院長

研究要旨：企業検診受診者2,160例(男性1,121名, 女性1,039名)を対象とし, わが国の一般集団における抗ミトコンドリア抗体(AMA)陽性率を検討した。AMAは11例(0.51%)に検出され, 全例で抗M2抗体が陽性であった。AMA陽性者は全例30歳以上であり, 30歳以上一般集団のAMA陽性率は0.57%であった。AMA陽性者の55%がトランスアミナーゼ高値あるいはALP高値で, 肝生検を施行し得た2例はScheuer I期の原発性胆汁性肝硬変(PBC)であった。わが国の人口統計資料より計算すると, 30歳以上の一般集団にAMA陽性者が458,120名存在し, その内, 症候性PBCは1.6%, 無症候性PBCは53%, 肝機能正常者は45.4%と推定された。

共同研究者

柴田 実¹⁾, 小野塚 靖, 小泉英子²⁾, 川口直美,
宮川 浩³⁾, 森實敏夫⁴⁾, 三田村圭二⁵⁾, 上野幸久⁶⁾

1) 昭和大学医学部第二内科助手, 2) 川崎社会保険
病院検査部, 3) 帝京大学第四内科, 4) 神奈川歯科
大学内科教授, 5) 昭和大学医学部第二内科教授,
6) 川崎社会保険病院

A. 研究目的

わが国の一般集団におけるAMA陽性率およびPBC有病率を検討し, AMA陽性者の病態を明らかにした。PBCの有病率は人口100万対19-151人, 年間発症率は人口100万対2-24人, 一般集団におけるAMA陽性率は0.07%-9.9%と報告されている^{1,2,3,4,5,6}。わが国のPBC患者数はおおよそ12,000名⁷, 有病率は人口100万対100人と推定されている。年間発症率および一般集団におけるAMA陽性率は不明である。AMA陽性者には肝機能正常例が存在するが, その病態は不明である⁸。わが国の一般集団におけるAMA陽性率およびAMA陽性者の病態を検討した。

B. 研究方法

1998年~1999年に川崎社会保険病院検診センターに受診した企業検診受診者2,160例(平均年齢45.9歳)を対象とした。男性は1,121名(平均年齢46.7歳), 女性は1,039名(平均年齢45.1歳)であった。対象のAMA陽性率および病態を検討し, わが国のAMA陽性者数およびその病態を推定した。AMAは間接蛍光抗体法を用い血清希釈倍数20倍以上を陽性とした。AMA陽性例はELISA法およびImmunoblot法で抗M2抗体を測定した。Hodgesらの報告を参考に, AMA陽性例をprobable PBCとsubclinical PBCに分類した⁹。前者はトランスアミナーゼ高値あるいはALP高値, 後者はトランスアミナーゼ正常かつALP正常と定義した。わが国の年齢別人口は1997年総務庁統計局資料を用いた。統計処理はFisherの直接確率計算法および多変量解析を用いた。統計解析はJMP 3.2.5 (SAS

Institute Inc., NC, USA) を使用して行った。本研究はヘルシンキ宣言 (Declaration of Helsinki, 1996サマセットウエスト改訂)の倫理規定を遵守し, 被験者の人権保護を最優先した。

C. 研究結果

1) AMA陽性率

AMAは2,160例中11例(0.51%: 95%信頼区間0.21%-0.81%)で検出された。男性は3例(0.27%: 0.035%-0.57%), 女性は8例(0.77%: 0.24%-1.30%)に検出され, 両群の陽性率に差は認められなかった(P=0.103)。年代別には30歳未満の集団にはAMA陽性者は存在しなかった。一般集団の30歳以上のAMA陽性率は0.57%であった(表1)。AMA陽性を応答変数, 年齢および性を説明変数としてLogistic回帰分析を実施した。年齢(P=0.1676)および性(P=0.1092)はAMA陽性を規定する有意な独立因子としては選択されなかった(決定係数=0.0349)。

2) 抗M2抗体

AMA陽性例はELISA法でIgGクラス抗M2抗体が5例(46%), IgMクラス抗M2抗体が11例(100%)に検出された。免疫ブロット法では11例(100%)に抗M2抗体が検出された。

3) 臨床分類

AMA陽性の肝機能検査値を示す(表2)。AMA抗体価は11例中8例(73%)が80倍以下と低抗体価であった。トランスアミナーゼ高値を4例(36%), ALP高値を4例(36%), γ -GTP高値を4例(36%), IgM高値を8例(73%)に認めた。Probable PBCが6例(55%), subclinical PBCが5例(45%)と診断された。Probable PBCの2例に肝生検を施行し, いずれもScheuer I期PBCであった。

表1 年齢別AMA陽性率

Age (Years)	Male	Female	Total
10-29	0% (0/62)	0% (0/184)	0% (246)
30-39	0.4% (1/241)	0% (0/126)	0.3% (1/367)
40-49	0% (0/329)	0.8% (2/260)	0.3% (2/589)
50-59	0.5% (2/389)	1.6% (6/369)	1.1% (8/758)
60-69	0% (0/90)	0% (0/92)	0% (0/182)
70-	0% (0/10)	0% (0/8)	0% (0/18)
total	0.27% (3/1,121)	0.77% (8/1,039)	0.51% (11/2,160)
Subgroup (≥30)	0.28% (3/1,059)	0.94% (8/855)	0.57% (11/1,914)

表2 AMA陽性例の肝機能検査値

Subjects	Sex	Age	AMA	AST	ALT	ALP	γ-GTP	IgM
1	F	47	640	23	20	198	16	185
2	F	58	80	26	20	190	14	237
3	F	54	640	36	36	1373	214	215
4	F	50	20	42	80	338	151	467
5	F	49	20	18	14	267	116	325
6	M	56	20	21	16	169	26	329
7	F	50	80	23	16	112	21	252
8	M	37	20	40	78	173	211	210
9	M	52	20	15	16	108	23	167
10	F	51	20	38	47	107	30	267
11	F	54	80	42	61	239	50	254

基準値: AST < 35 IU/L, ALT < 35 IU/L, ALP 70-230 IU/L, γ-GTP < 55 IU/L,

IgM 67-211 mg/dl

4) PBC患者数およびAMA陽性者の病態

わが国の30歳以上の人口は79,713,000人であり、AMA陽性率が0.57%であることより、30歳以上の一般集団のAMA陽性者は458,120名(191,311-725,388名)と計算された。そのうち251,966名が probable PBC, 206,154名が subclinical PBCと推定された。わが国のPBC患者数は12,000例であり、その61.1% (7,332例) が症候性PBCと診断され公費負担を受けている³。Probable PBCを症候性PBCと無症候性PBCに分類し、症候性PBC患者数を7,332人とすると、無症候性PBCは244,634人と計算された。以上よりわが国のAMA陽性者は症候性PBCが1.6%、無症候性PBCが53%、肝機能正常が45.4%と推定された。

D. 考察

2,160名を対象としてAMA陽性率を検討した。AMA陽性者は全例30歳以上であり、30歳以上一般集団

1,914名のAMA陽性率は0.57%であった。一般集団におけるAMA陽性率を検討した4編の論文が存在し、陽性率は0.07%-9.9%と報告されている^{3,6}。AMA陽性が1.5%-9.9%と高く報告した2論文は症例数が101例⁶および201例³と少なく、αエラーおよび出版バイアスの可能性が存在する。症例数が1,530例と最も多い論文のAMA陽性率は間接蛍光抗体法で0.07%、免疫プロット法で0.5%と低値であった³。この論文は対象の1,245例(81%)が献血者であり、自己選択バイアスの影響で一般集団より健康な集団が選択されていた可能性がある。対象の年齢も不明である。献血者での検討のため他の報告より若年者が多いと推定され、選択バイアスの影響で陽性率が低値となった可能性がある。我々の成績では30歳以下ではAMAが一例も検出されなかった。もう一つの報告は症例数が1,461例で、AMA陽性率は0.89%と我々の結果より高値であった⁴。対象の平均年齢は43.4歳であり、我々

の対象の平均年齢(45.9歳)と類似している。この報告は免疫ブロット法でAMAを検出しており、我々が用いた間接蛍光抗体法と異なっていた。AMA陽性率の差は、検出方法の感度が異なるためと考えられる。我々が対象として用いた企業検診者は献血者や人間ドック受診者より自己選択バイアスが少ない。

わが国の30歳以上の一般集団には458,120名のAMA陽性者が存在し、その251,966名が probable PBC と推定された。わが国で PBC と診断されている患者は12,000例であり、推定 probable PBC 患者の4.8%であった。この差は研究デザインの相違によると推定される。一般集団のAMA陽性者数は population-based study、PBC 患者数は hospital-based study で算出された。Population-based study ではより軽症な例が多く選択される。Turchanyらが行った population based study では、14名のAMA陽性者のうちALP高値を示したのは1名(7%)のみであった。実際に PBC と診断されている患者よりかなり多くの、AMA陽性者が存在すると推測される。

E. 結論

30歳以上の一般成人集団のAMA陽生率は0.57%であった。AMA陽性者の1.6%が症候性PBCで、大部分が無症候性PBCあるいは肝機能正常と推定された。

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

2000,6,5 IASL (Fukuoka, Japan)

Prevalence of anti-mitochondrial antibody (AMA) in the Japanese general population. Shibata M, Koizumi H, Onozuka Y, Morizane T, Kako M, Mitamura K, Ueno U. (J Gastroen Hepatol 15 Suppl. 88, 2000.)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

population in Estonia. Am J Gastroenterol 1997; 92: 124-126.

⁵ Omagari K, Rowley MJ, Whittingham S, et al: Autoantibodies to M2 mitochondrial autoantigens in normal human sera by immunofluorescence and novel assays. J Gastroenterol Hepatol 1996; 11: 610-616.

⁶ Azizah MR, Shahnaz M, Zulkifli MN et al: Anti-nuclear, anti-mitochondrial, anti-smooth muscle and anti-parietal cell antibodies in the healthy Malaysian population. Malays J Pathol 1995; 17: 83-86.

⁷ 森満, 玉腰暁子, 小嶋雅代, 他: 難治性肝疾患の全国疫学調査成績. 厚生省特定疾患調査研究事業, 特定疾患に関する疫学調査平成8年度研究業績集: 23-27, 1997.

⁸ Primary biliary cirrhosis: an epidemiological study: Br Med J 1980; 281: 1642-1643.

⁹ Hodges JR, Hall AJ, Wright R: Primary biliary cirrhosis and antimitochondrial antibodies. Lancet 1981; 361.

¹ Metcalf J, James O: The Geoepidemiology of Primary Biliary Cirrhosis. Sem Liv Dis 1997; 17: 13-22.

² Myszor M, James OF. The epidemiology of primary biliary cirrhosis in north-east England: an increasingly common disease? Q J Med 1990; 75: 377-385.

³ Mattalia A, Quaranta S, Leung PS et al: Characterization of antimitochondrial antibodies in health adults. Hepatology 1998; 27: 656-661.

⁴ Turchany JM, Uibo R, Kivik T, et al: A study of antimitochondrial antibodies in a random

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

UDCA 13年投与例の、5回の経時的病理組織像、生化学検査変化の経過観察をし得た1症例-UDCAとbezafibrateの効果について

研究協力者 田中 直見 筑波大学臨床医学系消化器内科 教授

研究要旨：bezafibrateがUDCA不応性の肝硬変期PBCにおいても胆道系酵素値の改善に有効であ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)においてbezafibrateは肝胆道系酵素を改善する薬剤として使用されている。UDCA長期投与例において経時的病理組織像の変化を観察し、bezafibrateの有効性を検討する。

B. 研究方法

患者は54歳女性。1986年健康診断時に肝機能障害を指摘され、近医の紹介により1987年9月当院消化器内科受診。飲酒歴、輸血歴、常用薬なし。血液データ上、GOT 75 (IU/l), GPT 116 (IU/l), ALP 505 (IU/l), γ GTP 259 (IU/l), T-Bil 0.6 (mg/dl), T-cho 184 (mg/dl), ESR 30 (mm/h), IgG 2649, IgA430, IgM 441 (mg/dl), AMA 160倍以上, ANA (speckled) 80倍, LEテスト(-), サイログロブリン抗体(-), マイクロゾームテスト(-), HBs抗原(-), HBs抗体(+), HBe抗体(+), ICG 15分値4.2%。軽度搔痒感を伴い、S1PBCが疑われた。

第1回腹腔鏡下肝生検施行(1987年10月7日)。肝表面のなだらかな起伏と網目様白色紋理をみとめ、病理所見上 PBC Scheuer stageII と診断された。1987年10月13日より UDCA 600 mg/day 服薬開始。GPT 95, ALP 382, γ GTP 86と改善し、第2回経皮的肝生検施行(1988年11月29日)。門脈域の炎症細胞浸潤は著明に軽減し、その他の所見に著変なくstageII-IIIと診断。以後、第3回経皮的肝生検(1991年8月22日、UDCA開始後約4年)では軽度fibrosisの進行、第4回経皮的肝生検(1993年12月21日、UDCA開始後約6年)ではfibrosisの程度は変化ないが炎症所見の悪化がみられ、やはりstageII-IIIと診断された。この間特に症状なく経過し、血液データ上も著変なくUDCA投与前よりも改善状態は持続した。1994年5月頃より皮膚搔痒感が強くなり、1995年9月頃(UDCA開始後約8年)から胆道系酵素値が徐々に増加傾向を示し始めた。1996年3月にはIV型コラーゲン値が基準値を上回るようになった

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントを得て採血、肝生検を施行した。

C. 研究結果

2000年2月29日にはGPT 135, ALP 907, γ GTP 213, T-Bil 0.7 となり第5回経皮的肝生検施行(2000年3月14日、UDCA開始後約12.5年)。IgM 364, AMA 640倍, M2抗体>2000 (U/ml), IV型コラーゲン 197 (ng/ml), HCV抗体(-)。病理所見上、線維化、炎症細胞浸潤とも増悪しておりScheuer stageIVと診断された。UDCAのみの治療では血液生化学データを改善できず、2000年3月28日より、UDCAに加えてbezafibrate 400mg/dayを開始。一時上腹部不快感にて2カ月bezafibrate休薬し、再増悪したが、以後血液データは改善傾向を示し、2000年12月5日にはGPT 73, ALP 308, γ GTP 101, IgM 320まで改善した。

D. 考察

bezafibrateはUDCA無効例においても有効であるとされるが、いずれもPBCの比較的初期例に限られている。本症例は診断時Scheuer stage IIでUDCA投与にて8年間良好に経過したが2次無効となった硬変期PBCである。短期間の投与観察ではあるが硬変期PBCにおいてもbezafibrateにより胆道系酵素値の改善がみられた。

E. 結論

短期間の投与観察ではあるがbezafibrateがUDCAに不応性の肝硬変期PBCにおいても胆道系酵素値の改善に有効である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし

G. 研究発表

当該研究に関するものはなし

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（難治性肝疾患 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：非硬変期の原発性胆汁性肝硬変（PBC）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に与える影響を経時的な血液生化学的検査の観察と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(10例)を対象とし、BF投与前と投与2ヶ月、6ヶ月、12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(8例)、非投与群(8例)の計16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投与群は投与2ヶ月で血清ALP、 γ -GTPが有意に低下し、その傾向は6、12ヶ月後に顕著となった。ALT、IgMも投与12ヶ月で有意に低下した。一方、BF投与群は非投与群に比してMDR3 mRNAの発現が2.4倍増強されていた。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の発現を介して肝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はPBCの治療薬になり得ると考えられた。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が示唆された。今後は抗ヒトMDR3モノクローナル抗

体を用いて組織学的にMDR3の発現を観察する予定である。

F. 研究発表

1. 学会発表

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

宮崎浩彰、中橋佳嗣、広原淳子、井上恭一
第36回日本肝臓学会総会(肝臓 41 suppl.(1): A116, 2000)

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のBezafibrateによる治療

研究協力者 大西 三朗 高知医科大学第一内科 教授

研究要旨：bezafibrateの約3年の長期投与で非硬変PBCの症状消失、生化学的検査改善が維持され、肝の組織学的改善も期待されることが示唆された。また、MDR3 glycoproteinの発現低下が未治療PBCで認められ、bezafibrate投与後に回復する。このことからMDR3 glycoproteinの発現低下がPBCの病態に関与し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)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ない。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の長期的効果を検討することにある。約3年間bezafibrateをUDCAに追加投与した8例の非硬変PBC例の経過を検討した。また、治療前PBC症例でのMDR3 P-glycoproteinの発現を免疫組織学的に検討し、その病態への関わりを検討した。

B. 研究方法

対象症例は非硬変PBC8例。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。bezafibrateを追加、UDCAと併用投与を行った。Bezafibrateは400mg/day経口投与、UDCAは600mgまたは900mg/dayで約3年間の経過を観察した。4例が症候性であった。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。

MDR3 P-glycoproteinの肝組織での発現を免疫組織学的に以下のように行った。対象は治療前PBC4例、Bezafibrate+UDCA投与31ヵ月後PBC1例、Chronic hepatitis C (F1/A1) 3例である。肝生検組織凍結切片を作製し、一次抗体にAnti-MDR-3 monoclonal antibody (KAMIYA Biomedical)を用いABC法にてperoxidase発色で観察した。

C. 研究結果

胆道系酵素は全例において有意に低下した。8例で投与開始1年後においてALPは平均50%、 γ GTPは平均38%の低下を示した。bezafibrate投与前 γ GTPが比較的高い症例ではALPはほぼ正常域に維持されたが、 γ GTPに関しては十分な改善が得られなかった。その他はいずれの症例においても投与開始後2ヵ月で胆道系酵素は急速に低下しその後はその値を約3年間にわたって維持していた。トランスアミナーゼも同様に有意に低下し、長期間低値を維持した。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掻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、再発をみていない。組織学的所見は1例でbezafibrate投与開始31ヶ月後に施行されたが、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。

MDR3 P-glycoproteinの肝組織での発現では、対照としたChronic hepatitis C (F1/A1)に比較して未治療PBCではその発現低下が認められた。また組織学的改善が認められた治療後PBCでは対照とほぼ同等の発現が認められた。

D. 考察

長期にわたって、1. bezafibrateは症候性PBCの症状を消失させる。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る。5. bezafibrateは安全に投与が可能で、組織学的改善が期待される。MDR3 P-glycoproteinのmRNAの発現低下は認められない。タンパクレベルでの発現低下の原因は明らかではないが、それが増悪因子となっている可能性がある。

E. 結論

bezafibrateは非硬変PBCの症状、生化学的検査を、長期にわたって改善し、肝の組織学的改善も期待されることが示唆された。MDR3 P-glycoproteinのPBC肝組織での発現低下が病態に関与している可能性が示唆された。

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.

岩崎信二、前田隆、大西三朗；原発性胆汁性肝硬変の病態と治療 Bezafibrateによる治療。肝胆膵1999；39(1)：103-110。

厚生科学研究費補助金（肝 研究事業）

分担研究報告書

PBCにみられる肉芽腫性病変 —P. acnesの肉芽腫形成への関与を中心に—

研究協力者 中沼 安二 金沢大学医学部病理学講座第二 教授

原発性胆汁性肝硬変(PBC)の肉芽腫形成における菌体成分の関与を検討するため、肝組織内から細菌遺伝子の分子生物学的検出を行った。その結果、肝組織内から種々の腸内細菌が検出され、特に *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) が PBC の肉芽腫から高頻度に検出された。次に、*P. acnes* を選択的に検出した結果、PBCの肉芽腫からは全例で検出されたが、PBCの肝実質や対照疾患では低頻度であった。肝組織内から検出された細菌種の多くは腸内細菌を主とする常在菌であり、経門脈的または経胆管的に種々の細菌成分が、肝内に流入していると推測された。また、PBCの肉芽腫部では *P. acnes* の菌体成分が集簇しており、肉芽腫反応の原因(抗原)になっているものと考えられ、*P. acnes* がPBCの病態形成に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は、慢性非化膿性破壊性胆管炎と呼ばれる肝内小型胆管の進行性破壊と消失や類上皮肉芽腫の形成を組織学的特徴とする。特に障害胆管が肉芽腫内に埋もれている像(肉芽腫性胆管炎)は、PBCに特異的な所見であり診断価値も高い。通常、肉芽腫は細菌感染症やある種の真菌症、異物の進入などに際して好発すると考えられている。現在まで、細菌感染症とPBCとの関連性を検討した報告があるものの、細菌が直接PBCの病態発症に関与しているのかどうかは不明である。今回、我々はPBCの肉芽腫性病変に注目し、細菌の分子生物学的検出、同定を行い、PBCの病態形成における細菌菌体成分の関与について検討した。

B. 研究方法

1. 材料

肉芽腫が見られた PBC 9 例のホルマリン固定パラフィン包埋肝組織切片を対象に、マイクロダイセクションシステム(オリンパス)を用いて肉芽腫部および門脈域周囲の肝実質のみを選択的に採取後、DNAを抽出し、PCRのテンプレートとした。また、対照群として原発性硬化性胆管炎3例、肝外閉塞性黄疸2例、ウイルス性慢性肝炎4例、組織学的正常肝4例を用い、門脈域と肝実質からDNAサンプルを得た。

2. 細菌遺伝子の分子生物学的検出

細菌16S rRNA 遺伝子は約1500塩基対からなり、その中に菌種を越えて保存されている conserved region と種特異的な配列からなる divergent region がそれぞれ10箇所存在する。今回、conserved regionから1100F(5'-GCAACGAGCGCAACCC-3'), 1400R(5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3')のプライマー対(PCR産物約310bp)を用い、PCR増幅を行った。そのPCR産物をsubcloning後、10個のコロニーからPCR産物の塩基配列を解読し、菌種を同定した。

2. *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 遺伝子の検出

選択的に *P. acnes* を検出するため、16S rRNA 遺伝子内で *P. acnes* に特異的なプライマー(5'-GGGTTGTAA(A/T)CCGCTTTCGCCTG-3'; 5'-GGGACACCCATCTCTGAGCA-3')を設定し、PCRを行った。

C. 研究結果

1. 細菌遺伝子の検出と同定

PBC 5 例と対照群 6 例(原発性硬化性胆管炎2例、ウイルス性慢性肝炎2例、正常肝2例)を用い、本検討を施行した。その結果、すべてのDNAサンプルから細菌16S rRNA 遺伝子由来のPCR増幅産物が得られた。

塩基配列の解読の結果、肉芽腫、門脈域および肝実質からあらゆる常在菌由来の DNA が検出された。主に *P. acnes*, *Bacillus*, *Pseudomonas* などの腸内細菌が多く検出された。特に *P. acnes* は、PBCの肉芽腫から50クローン中20クローン(40%)と最も高頻度に検出された。

2. *P. acnes* 遺伝子の検出

P. acnes を選択的に検出したところ、PBCの肉芽腫からは全例、肝実質からは56%検出された。対照群からも検出されたが、50%以下と低頻度であった。

D. 考察

我々は平成12年度本研究班報告で、PBCの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、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ことを報告した。また、肉芽腫を形成する類上皮細胞にHLA-DRおよびCD1dの発現を認めたことより、類上皮細胞は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、菌体構成成分であるリポポリサッカライド(LPS)やリポテイコ酸(LTA)などの脂質成分が肉芽腫反応の抗原となっている可能性を報告した。

PBCの病態発症と細菌感染症との関連性は多数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、我々は肝組織中から分子生物学的手法により細菌遺伝子を検出し、何らかの細菌成分がPBCの病態形成に関与している可能性を検討した。その結果、肝組織から検出、同定された細菌種の多くは腸内細菌を主とする常在菌であり、経門脈的あるいは経胆管的に種々の細菌成分が、肝内に流入していると推測された。しかし、このような菌体が生菌の状態で流入しているとは考えにくく、分断化した菌体成分であると推測される。また、全例のPBC肉芽腫部から*P. acnes*由来の遺伝子が検出された。*P. acnes*はグラム陽性の嫌気性菌で、リパーゼ産生によるニキビの病原菌として有名である。また、*P. acnes*は、アジュバント活性を有し、動物実験にて肉芽腫を形成することが知られている。従って、PBCの肉芽腫から*P. acnes*が検出されたことは非常に興味深い所見であり、*P. acnes*に対する異常な免疫応答がPBCの肉芽腫形成、さらにはPBCの病態形成に拘わっていることが示唆された。その上、近年、*P. acnes*は全身性肉芽腫性疾患であるサルコイドーシスの病原菌としても注目されており、*P. acnes*に対する宿主の異常な免疫応答が、種々の疾患の病態形成に関与しているのかもしれない。今後、PBCの疾患特異性さらに胆管特異性を検討するため、細菌成分に対する宿主の免疫機構の解明が必要である。

E. 結論

PBCの肉芽腫部では*P. acnes*の菌体成分が集簇しており、肉芽腫形成の原因(抗原)になっているものと考えられ、*P. acnes*がPBCの病態形成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

- Harada K, et al. Molecular Identification of Bacterial 16S Ribosomal RNA Gene in Liver Tissue of Primary Biliary Cirrhosis: Is *Propionibacterium Acnes* Involved in Granuloma Formation? Hepatology (in press)
- 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. 2000;33:9-18.

2. 学会発表

- 原田憲一ら. 原発性胆汁性肝硬変の肉芽腫病変におけるBacterial 16S rRNA geneの検出. 第4回日本肝臓学会大会
- Harada K, et al. Molecular identification of bacterial 16S ribosomal RNA gene in liver

tissue of primary biliary cirrhosis: *Propionibacterium acnes* is mostly detectable in granulomatous lesion. 51st Annual Meeting, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)

- 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

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

自己免疫肝炎類似GVHRモデルにおける、自己抗体の出現に関する検討

研究協力者 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、抗ミトコンドリア抗体、抗核抗体などの自己抗体が産生されることが確認された。

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 の系を用いて自己免疫肝炎類似の肝病変について報告してきた。つまり、B6マウスとB6のMHC class IIの3つのアミノ酸の異なるbm12マウスを交配したF1マウスに親のB6のspleen T cellsを移入し肝病変を解析してきたが、このGVHRモデルは実際のPBCと異なり、非化膿性破壊性胆管炎の所見や線維化はみられなかった。そこで、近年マウスで急性の肝障害をおこすConcanavalin (Con A) に着目し、GVHRの肝病変にCon Aを投与することで、肝病理所見の進展像が確認された。つまり、従来の小葉間胆管周囲の炎症の増悪、piecemeal necrosis、胆管上皮間のリンパ球浸潤、bridging necrosisが認められた。これらの病変は原発性胆汁性肝硬変(PBC)や自己免疫性肝炎(AIH)に典型的とはいえないが、自己免疫的機序にて発症する動物モデルとなる可能性が示唆された。そこで、今回我々は、PBCやAIHの際に出現する自己抗体に関して、今回のGVHRにCon Aを加えたモデルにおいて検討を行った。

B. 研究方法

(bm12×B6)F1メスマウスに、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、これをG群とし、さらにGVHR導入5日後にCon A 15mg/Kgを静注した群をG+C群とし、これらは14日目に、normal群とともに屠殺。Con Aのみ同量投与した群をC群とし、9日目に屠殺。採血にて、血清中の抗ミトコンドリアM2抗体(MESACUP ミトコンドリアM2: IgGクラス)、抗核抗体(スクリーニング用のMESACUP ANA テスト: IgGクラス； 8種類の自己抗体を認識；抗2本鎖DNA抗体、抗U1RNP抗体、抗Sm抗体、抗SS-A/Ro抗体、抗SS-B/La抗体、抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗Jo-1抗体、抗セントロメア抗体)をELISA法にて検出し、プレートリーダーにて各群間の吸光度を比較した。

(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

抗ミトコンドリア抗体:

各群の吸光度を比較すると normal control 群で 0.12 ± 0.05 、C群で 0.13 ± 0.02 、G群で 0.44 ± 0.11 、G+C群で 0.43 ± 0.10 (Mean \pm S.E.)であった(n=6)。

抗核抗体:

normal control群で 0.05 ± 0.02 、C群で 0.06 ± 0.03 、G群で 0.84 ± 0.34 、G+C群で 0.65 ± 0.23 (Mean \pm S.E.)であった(n=6)。

抗ミトコンドリア抗体、抗核抗体の出現はG群とG+C群ともnormal control群やC群に比べて有意な増加を示した ($p < 0.001$)。しかし、このGVHRの関与する2群間では出現に差を認めなかった。

D. 考察

PBC, AIH では自己抗体が産生される。またヒトGVHRでもAMAが産生されていると報告されている。我々はマウスGVHRモデルに抗PDI抗体が産生されることを報告してきた。今回このモデルにおいてANAをはじめ、各種自己抗体も産生されていることを確認した。これらの自己抗体が病因や病態の進展にどう関わるのかは不明であるが、donor CD4⁺ T cellは自己反応性のB cellを含めたpolyclonalなB cellの活性化をひきおこした可能性が示唆された。また、GVHRにCon Aを加えることで、それぞれ単独では見られなかった病態を呈したが、AMA、ANAの出現動態から判断すると、根底にあるGVHRの自己免疫病態が保たれた状態に、Con Aによる肝細胞破壊性機序が修飾を加えた可能性があると考えられた。

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、自己抗体が産生されることが確認された。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし

G. 研究発表

当該研究に関するものはなし

H. 知的財産権の出願、登録状況

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

Con Aマウス肝炎モデルを用いた免疫学的肝障害発症機序とその治療法の研究

研究協力者 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、ヒアルロン酸（Hyaluronan:HA）がTNF- α やIFN- γ などの炎症性サイトカイン産生を抑制することにより肝障害発症を阻止し、その効果はHA分子量に依存することを明らかにした。

A. 研究目的

肝疾患において、肝類洞内皮細胞障害や肝線維化を反映して血中にHAが増加することが知られている。また、HAはリンパ球、好中球、NK、NKT細胞表面のCD44レセプターと結合し、これらの細胞の炎症局所への浸潤や活性化に関与するとともに、種々のサイトカイン遺伝子の発現調節作用も報告されている。一方、マウスにCon Aを静脈投与することにより、Tリンパ球活性化を介した免疫学的肝細胞障害モデルが作製される。今回、本モデルを用いてHAの投与効果とサイトカイン産生能に対する影響を検討した。

B. 研究方法

7週令の雌性Balb/cマウスにCon A（Type IV、Sigma社）20 mg/kgBWを1回静注し、肝障害モデルを作製した。HA 1%水溶液（900 kD、生化学工業社）を蒸留水で0.05、0.1、0.25、0.35%に希釈し、それぞれ0.5 mlをCon A投与18時間前に静脈内投与した。Con A投与8時間後の血中GPT値（酵素法、Wako社キット）と0、2、4、8時間後の血中TNF- α 、IFN- γ 濃度（ELISA法、Genzyme社キット）を比較検討した。また、900 kDの0.35% HA、0.5 mlをCon A投与48時間前からCon A投与後1時間後に投与し、HA投与時間と肝障害抑制効果を検討した。さらに、分子量250、470、780、900、1200 kDの0.35% HA、0.5 mlをCon A投与18時間前に投与し、Con A投与8時間後の血中GPT値を比較検討した。統計学的検討は、血清GPT値ならびに血中TNF- α 、IFN- γ 濃度の結果をMean \pm SEで示し、有意差検定は分散分析(AN-OVA)にて行った。

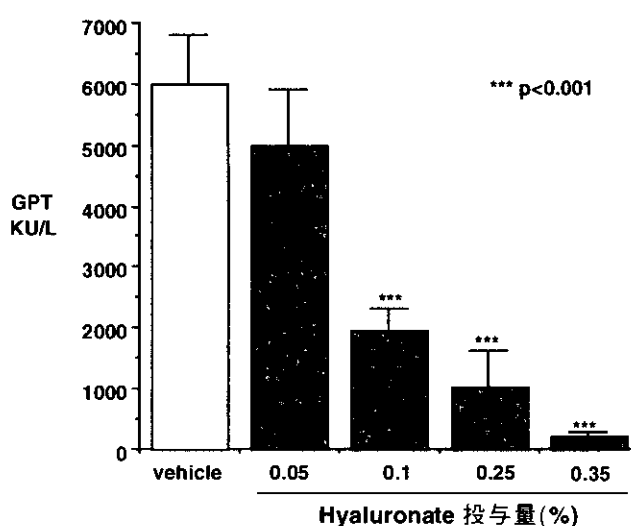
本実験にあたってはあらかじめ旭川医科大学動物実験委員会の承諾を得、さらにNIHの実験動物取り扱い規約に基づいて行った。

C. 研究結果

1. Con A誘発肝炎に対するHAの効果

0.1、0.25、0.35%の900 kD HA 0.5 mlの前投与は対照群に比べCon A投与8時間後の血中GPT値を有意に低下し、その効果は用量依存性であった（図1）。

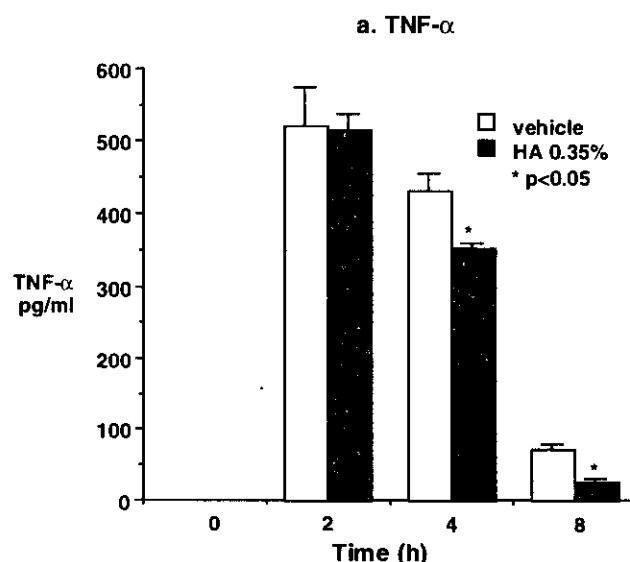
図1. Con A誘発肝炎に対するHyaluronanの効果



2. Con A投与後の血中サイトカイン産生に対するHAの効果

0.35%の900 kD HA 0.5 mlの前投与は対照群に比べCon A投与4、8時間後の血中TNF- α 濃度と2、4時間後の血中IFN- γ 濃度を有意に抑制した（図2）。

図2. Con A投与後の血中cytokine産生に対するHyaluronanの効果



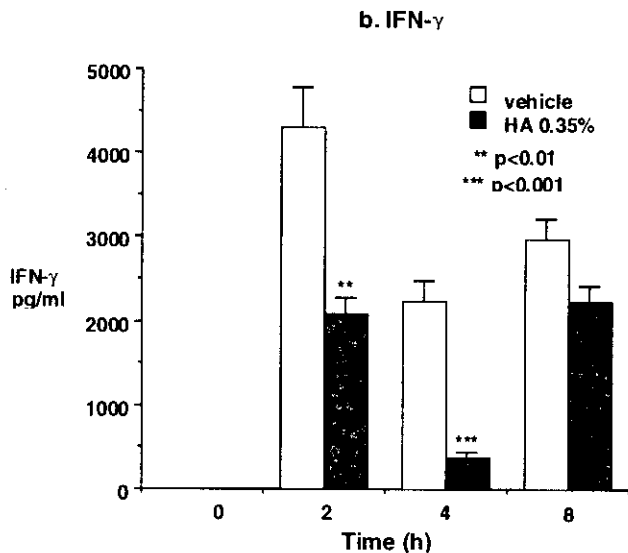
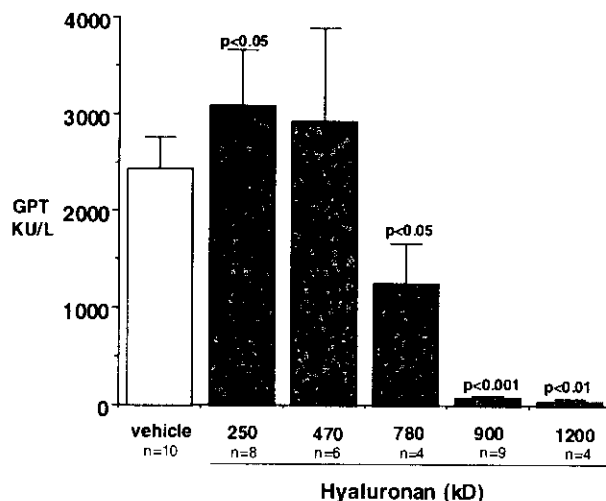


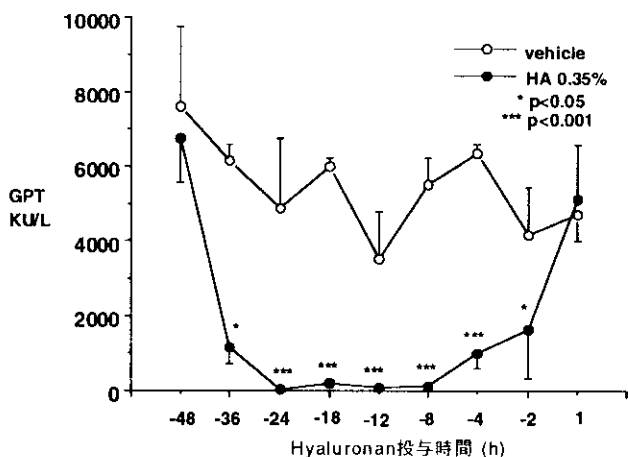
図4. Hyaluronan分子量と肝障害抑制効果



3. HA投与時間と肝障害抑制効果

0.35%の900 kD HA 0.5 ml前投与の効果はCon A投与36時間前から2時間前まで認められたが、Con A投与前48時間、投与後1時間では効果は認められなかった (図3)

図3. Hyaluronan投与時間と肝障害抑制効果



4. HA分子量と肝障害抑制効果

種々の分子量のHAが生体内に存在することから、HA分子量とCon A肝細胞障害抑制効果について検討した。分子量250、470、780、900、1200 kDのHA (生化学工業社)を蒸留水で0.35%に希釈し、0.5 mlをCon A投与18時間前に投与し、Con A投与8時間後の血中GPT値を比較検討した。Con A投与8時間後の血中GPT値は対照群に比べ780、900、1200 kDのHA投与群で有意に低下したが、250 kD投与群では逆に有意な上昇を認めた (図4)。

D. 考察

Con A 誘発マウス肝障害モデルの発症機序としては、Con AによりT細胞が活性化され、過剰産生されたサイトカインによって肝に特異的な壊死炎症が生じるとされている。その発症に関わるサイトカインとしては、中和抗体やノックアウトマウスを用いた検討からTNF- α 、INF- 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。

一方、本モデルを用いて肝障害発症抑制効果を有する薬剤の検討はDexamethasone、FK 506、Cyclosporine Aなどの免疫抑制剤のほか、Chlorpromazine、Sodium FusidateやHeparinなどが報告されている。今回我々は、Con A肝障害モデルを用いて、細胞外マトリックスの構成成分であるHAの効果について検討した。HAはリンパ球、好中球、NK、NKT細胞表面のCD44レセプターと結合し、これらの細胞の炎症局所への浸潤や活性化に関与しており、また、最近ではサイトカインやケモカインなどの遺伝子の発現調節作用も報告されている。

今回の検討では、HA前投与はCon A肝細胞障害を用量依存性に抑制した。また、その作用機序としてはTNF- α やINF- γ などの炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。また、興味深いことにその作用はHAの分子量に依存し、分子量780-1200 kDの高分子HAが効果的であった。炎症局所に存在するHAは比較的低分子であり、転写調節因子であるNF- κ Bを活性化し、サイトカインやケモカイン遺伝子の転写を促進するが、高分子HAは逆に抑制効果を示すことが最近報告されている。

HAは肝疾患において肝類洞内皮細胞障害や肝線維化を反映して血中に増加するが、その分子量は不明であり、また、肝局所において炎症を惹起するのか、或るいは抑制するのかは明らかではなく、今後の検討が必要である。

E. 結論

Con A 肝細胞障害モデルにおいて HA は、TNF- α や IFN- γ などの炎症性サイトカイン産生を抑制することにより肝障害発症を阻止するが、その効果は HA 分子量に依存することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 免疫学的肝細胞障害における CXC ケモカインと多核白血球の関与
薬理と臨床 印刷中, 2001.
- 2) Concanavalin A (Con A) 肝障害モデルにおけるケモカインとサイトカインの関与
箱根シンポジウム記録 印刷中

2. 学会発表

- 1) 第86回日本消化器病学会総会
Concanavalin A (Con A) 誘発マウス肝炎モデルにおける Macrophage inflammatory protein-2 の関与について. 日消誌 97: 2000.
- 2) Annual meeting of the American Gastroenterological Association
Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) induced by TNF- α plays a pivotal role in concanavalin A-induced hepatitis in mice.
Gastroenterology 118:A920, 2000.
- 3) 第36回日本肝臓学会総会
Concanavalin A 誘発マウス肝炎モデルに対する Antithrombin III の治療効果と投与時間の検討. 肝臓 41:Suppl (1) A192, 2000.
- 4) 第21回日本炎症学会
Concanavalin A (Con A) 誘発マウス肝炎モデルの肝細胞障害発症における CXC ケモカインと白血球の役割.
炎症 20:530, 2000.
- 5) 第4回日本肝臓学会大会
免疫学的肝細胞障害における NSAIDs の肝障害増悪機序の検討.
肝臓 41:Suppl(2) A448, 2000.

H. 知的財産権の出願登録状況

1. 特許所得

ヒアルロン酸を肝疾患処置剤として特許出願

III-4. 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

生存シグナル活性化による細胞障害抑制の検討

研究協力者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科分子制御治療学 教授

研究要旨：プロスタグランジン（PGE）の肝障害抑制効果について培養肝細胞・類洞内皮細胞を用いて検討した。両細胞には細胞内cAMPを上昇させるPGE受容体の存在が確認され、PGE添加培養によりBADがリン酸化され細胞障害が抑制された。PGEは、細胞内生存シグナルを活性化することで細胞障害を抑制する効果を有する。

A. 研究目的

活性化されることでその細胞の生存をもたらすことから生存シグナルと呼ばれる細胞内情報伝達機構が明らかにされつつある。なかでもPI3K-PKB/Akt系とcAMP-PKA系が生存シグナルと呼ばれる所以は細胞死促進因子であるBADをリン酸化する事でBADの細胞死促進機能を不活化し細胞死を抑制することがその論拠の一つとなっている。ヒト肝癌由来細胞株を用いた検討においても、前述の2経路を刺激、或いは抑制することによって細胞死を抑制、或いは促進させ得ることが、明らかとなっている。そこで、cAMP-PKA系を活性化することで、細胞障害抑制効果を得ることができないかと考え、プロスタグランジン（以下、PGE）の細胞内生存シグナル活性化による細胞障害抑制効果を、肝細胞・類洞内皮細胞を用いて検討した。

B. 研究方法：

肝細胞・類洞内皮細胞各々のPGE受容体の存在は、特異プライマーを用いたRT-PCR法で確認した。各細胞について最適培養条件下と、細胞死誘導刺激として血清除去下、TNF α 添加条件下でPGE添加培養24時間後に、細胞数をWST-1法で、生存シグナルとしてのBAD蛋白のリン酸化をWestern blot法で検討した。

C. 研究結果：

両細胞にはcAMPを上昇させるPGE受容体の存在が確認された。PGE添加によって、BAD蛋白のリン酸化が亢進している事と、細胞死誘導刺激による細胞数の減少が抑制されている事が示された。

D. 考察：

臨床研究から、劇症肝炎に対する治療法として相反する結果が報告されているPGEであるが、生存シグナル活性化による細胞障害抑制効果が認められる事から、劇症肝炎における細胞庇護目的の治療薬と成り得ると考えられた。

E. 結論：

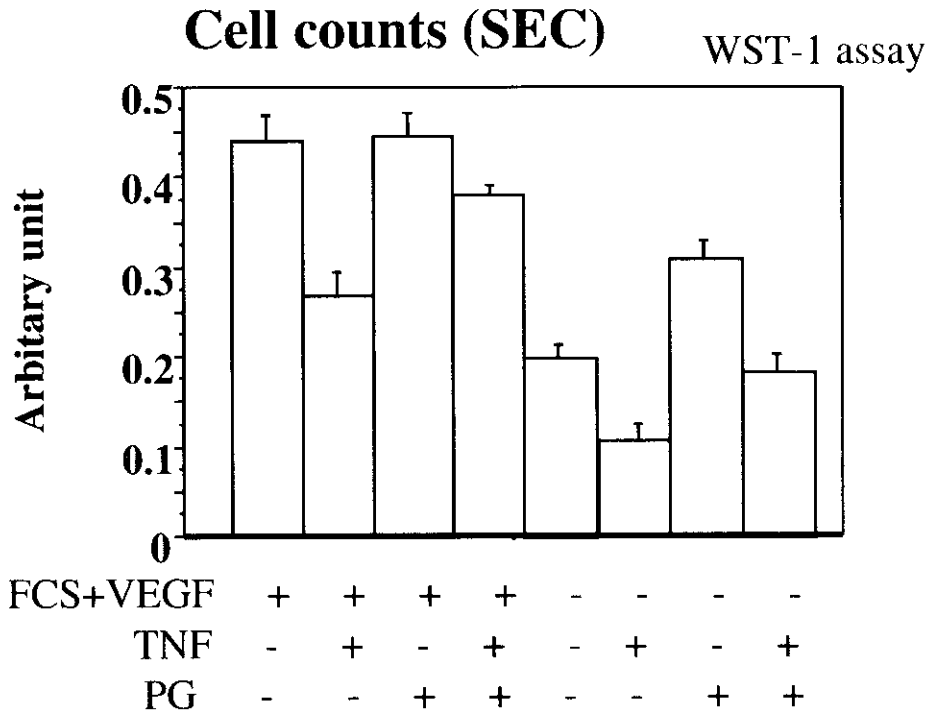
PGEは、細胞内生存シグナルを活性化することで肝細胞障害を抑制し得る。

F. 研究発表

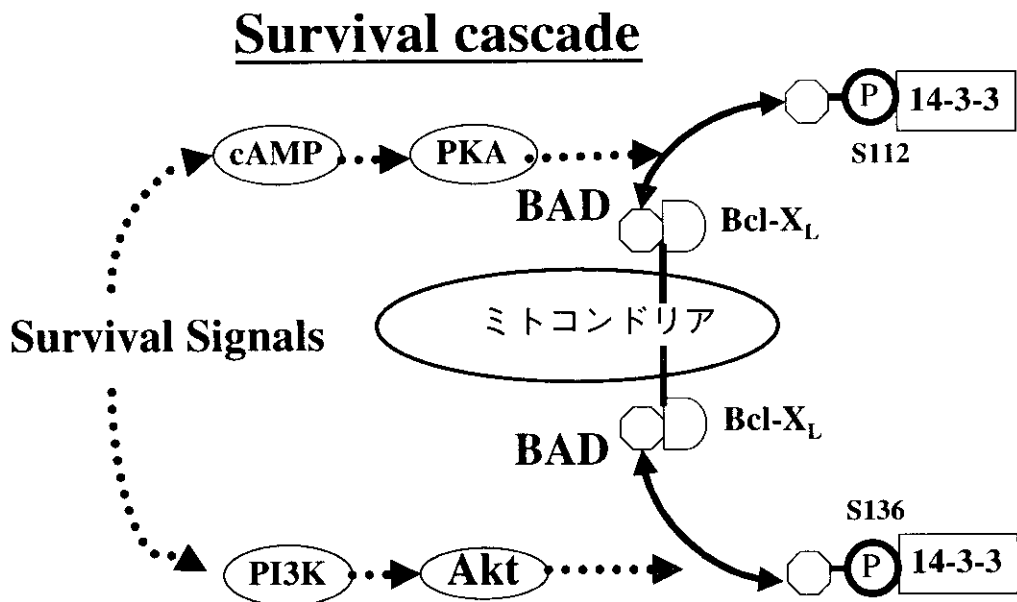
1. 論文発表：なし
2. 学会発表：
第36本肝臓学会総会
51th AASLD Hepatology 32,4,327A,2000

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



類洞内皮細胞は、PGE添加により、血清除去或いはTNF α 添加による細胞死を抑制される。



細胞内生存シグナル伝達機構にはcAMP-PKA系とPI3K-Akt系が存在し、BAD蛋白の磷酸化を介して、細胞死シグナルを抑制する。

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

HGFのシグナル伝達 -サイクリンD1遺伝子転写調節機構の解明-

研究協力者 坪内 博仁 宮崎医科大学第二内科

研究要旨：肝細胞の増殖に重要なHGFはcyclin D1の発現を誘導する。ラット初代培養肝細胞およびラット肝癌細胞を用いてcyclin D1遺伝子転写調節領域を解析した。ラットcyclin D1遺伝子発現は、その5'上流領域に存在するCREおよびEts類似配列を介して正に制御されており、Ets類似領域には増殖因子により誘導される新たな転写因子が結合している可能性が考えられた。

A. 研究目的

肝細胞の増殖にはHGFなどの増殖因子が重要な役割を果たしており、HGFを初代培養肝細胞に添加するとcyclin D1が発現する。本研究では初代培養ラット肝細胞およびラット肝癌細胞（dRLh84）を用いて、cyclin D1遺伝子転写調節領域を解析した。

promoter in rat hepatoma cells and primary cultured hepatocytes treated with growth factors. (投稿中)

G. 知的所有権の取得状況
なし

B. 研究方法

(1) ラットcyclin D1遺伝子を単離し、種々の長さの5'上流領域をルシフェラーゼ遺伝子の5'上流に挿入し、その転写活性を検討した。(2) 転写因子結合領域をプローブとしてelectrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行いcyclin D1発現に関わる転写因子を検討した。

C. 研究結果

(1) 64bpのプロモーター領域と-1010~-613bpの5'上流の2ヶ所に転写活性が認められた。(2) -64bpプロモーター領域のCREにはCREBが結合し、Ets類似配列には、HGFやEGFで誘導される新たな転写因子が結合する可能性が考えられた。

D. 考察

ラットcyclin D1遺伝子の発現は、その5'上流領域に存在するCREおよびEts類似配列を介して正に制御されており、Ets類似領域には増殖因子により誘導される新たな転写因子が結合している可能性が考えられた。

E. 結論

ラットcyclinD1発現誘導には、CREBおよび増殖因子によって誘導される新たな転写因子が、関与していると考えられた。

F. 研究発表

Additive and inhibitory effects of simultaneous treatment with growth factors on DNA synthesis through MAPK pathway and G1 cyclins in rat hepatocytes. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 368-373, 2001)
Transcriptional regulation of rat cyclin D1

厚生科学研究費補助金（難治性の肝疾患に関する研究事業） 分担研究報告書

劇症肝炎に対する治療戦略におけるインターロイキン10の有効性に関する検討

研究協力者 沖田 極 山口大学医学部第一内科教授

研究要旨：劇症肝炎の病態におけるTh1(pro-inflammatory)/Th2(anti-inflammatory)-associated cytokine imbalanceを明らかにすることを目的として、劇症肝炎5例、急性肝障害7例および健常人6例について細胞内サイトカイン測定という手法を用いて、単一リンパ球レベルおよび単一monocyte/macrophageレベルにおいてIFN- γ , IL-2(Th1-associated cytokines) およびIL-10 (Th2-associated cytokine) の各々のサイトカイン産生能を比較検討した。単一リンパ球レベルにおけるIFN- γ 陽性率は劇症肝炎($34.2 \pm 3.6\%$)および急性肝障害($49.1 \pm 8.9\%$)では健常人($19.6 \pm 2.9\%$)に比して著明に亢進していた。またIL-2陽性率も劇症肝炎($27.5 \pm 7.0\%$)および急性肝障害($27.9 \pm 4.8\%$)で健常人($18.3 \pm 1.4\%$)に比して著明に亢進していた。単一リンパ球レベルにおけるIL-10陽性率はいずれの群においても著明な変化は観察されなかったが、急性肝障害($2.8 \pm 1.0\%$)は劇症肝炎($1.2 \pm 0.4\%$)に比べて高い傾向を認めた。さらに単一monocyte/macrophageレベルにおけるIL-10陽性率は劇症肝炎($6.2 \pm 1.1\%$)、急性肝障害($23.5 \pm 15.3\%$)であり、IL-10産生に関してはmonocyte/macrophageレベルの方がリンパ球よりも高値であり、急性肝障害は劇症肝炎よりも高値を示した。また劇症肝炎急性型生存例においては少なくともmonocyte/macrophageのIL-10産生が保たれていた。以上のことより、劇症肝炎の進展・増悪にはTh1/Th2-associated cytokine imbalanceが関与している可能性が考えられた。免疫学的バランスを是正する意味においてもIL-10の投与は、劇症肝炎に対する新しい治療戦略の一つになり得るものと考えられた。

A. 研究目的

劇症肝炎は急激かつ広範な肝細胞壊死に基づいて、肝性昏睡をはじめとする種々の急性肝不全症状を来す極めて予後の不良な疾患であり、その病態は非常に複雑であるが、基本的には肝臓を標的臓器とする局所免疫反応ならびに全身性の免疫反応の両者が過剰に亢進した病態であると捉えることが可能である。このような病態下では持続する高濃度の炎症性サイトカインの発現が肝細胞障害を進展させ、さらに全身性の炎症反応の亢進、すなわちSIRS(systemic inflammatory response syndrome)と呼ばれる病態を惹起し、多臓器不全(MOF: multiple organ failure)へと至らしめ、劇症肝炎の予後を不良なものにすると考えられる。

われわれは、全身性の過剰な免疫反応が劇症肝炎の進展・増悪に関与するという立場から、主として炎症性サイトカイン(pro-inflammatory cytokine)の産生に関連するhelper T cell, type 1(Th1)と、主として抗炎症性サイトカイン(anti-inflammatory cytokine)の産生に関連するhelper T cell, type 2(Th2)との免疫学的バランスが重要であると考えて研究を行っている。今回、劇症肝炎の病態におけるTh1/Th2-associated cytokine imbalanceの関与について、細胞内サイトカイン測定法という新しい手法を用いて、単一リンパ球レベルさらには単一monocyte/macrophageレベルにおいて解析した。

B. 研究方法

対象患者は劇症肝炎が急性型3例、亜急性型2例の合計5例で、原因はいずれもHBV感染によるものであり、転帰は4例が死亡で、1例が生存例であった。コ

ントロールとして意識障害を伴わない急性肝障害7例および健常人6例についても同様の解析を行った。

急性肝障害の内訳は急性肝炎重症型(PT<40%)3例、急性肝炎(PT>40%)1例、伝染性単核球症1例、アルコール性肝障害1例および薬剤性肝障害1例であった。

原則として当科入院時に採血を行い、より生体に近い条件下でのサイトカイン産生能を解析するために抗凝固剤添加全血を用いた。Th1-associated cytokineであるIFN- γ およびIL-2産生能を見るためにphorbol-myristate-acetate 25ng/mlおよびIonomycin 1 μ g/mlでリンパ球を刺激し、Th2-associated cytokineであるIL-10産生能を見るためにはConcanavalin A 5 μ g/mlでリンパ球を刺激した。次いで産生されたサイトカインの分泌を阻害するためにBrefeldinを10 μ g/ml添加後、IFN- γ 、IL-2産生能に関しては4時間、IL-10に関しては24時間、37°Cにてincubationした。incubation終了後、PerCP標識抗CD3抗体によりTリンパ球を染色した後、赤血球を溶血させ、さらにリンパ球細胞膜を浸透圧溶液にて処理した。引き続き抗人IFN- γ 、抗人IL-2および抗人IL-10の各蛍光標識抗体を加え、細胞内に存在する目的サイトカインと結合させた。最後にフローサイトメトリーを用いてTリンパ球7000-10000個につきIFN- γ 、IL-2およびIL-10の各陽性率を算出し各群間で比較した。さらにIL-10に関しては、その産生が知られているmonocyte/macrophageにおいても、monocyte/macrophage認識抗原として抗CD33抗体を、また刺激物質としてlipopolysaccharide (LPS) を用いることにより単一monocyte/macrophageレベルで同様の解析を行った。

倫理面への配慮として、劇症肝炎患者については本