

細胞はCD86陽性細胞であったので、肝生検を施行した12例における clinical statusとCD86陽性細胞比率との関連性について検討した。肝生検施行時3例がステロイド投与中であり、残りの9例はステロイド未投与であった。ステロイド投与の有無に関係なく、1例を除く全ての症例でCD86陽性細胞の比率は19%以上と高頻度を示していた。CD86陽性細胞比率とALTの

レベルや肝炎の活動性を示すHAI scoreとの有意な相関は示さなかった。また、肝生検施行後ステロイド投与を開始し経過を観察しえた4例のうち、CD86陽性細胞が高値であった3例(No.4, 11 and 12)では、ステロイド投与後すみやかにALT値が改善した。CD86陽性細胞が低値であった症例(No. 10)では、ステロイドに対する反応性が不良であった(Table 2)。

Table. 2

Analysis of CD86(+) cells in patients with AIH and other liver diseases							
	γ -glob	ALT	ANA	Histology	HAI	CD86	STEROID
No.1 (M. A.)	2.1	34	X40	CH (A0, F2)	9	44.0	ON
No.2 (O.M.)	1.1	55	X80	CH (A0, F1)	3	44.0	ON
No.3 (K. C.)	1.6	44	X20	CH (A2, F3)	13	27.5	ON
No.4 (T. K.)	2.0	151	X160	CH (A3, F3)	16	42.2	OFF Reactive
No.5 (T.K.-2)	2.0	99	X40	CH (A0, F1)	3	43.7	OFF
No.6 (A. T.)	2.0	105	X40	CH (A2, F2)	3	33.8	OFF
No.7 (J. I.)	2.3	71	X640	CH (A1, F1)	---	41.2	OFF
No.8 (M. A.)	2.4	18	X320	CH (A1, F2)	2	34.0	OFF
No.9 (N. R.)	1.6	50	X320	LC	18	19.1	OFF
No.10 (M.H.)	2.7	84	X1280	CH (A2, F2)	14	11.1	OFF Non-reactive
No. 11 (M. Y.)	1.3	131	X5120	CH (A2, F2)	14	28.9	OFF Reactive
No. 12 (T. A.)	2.4	93	X640	CH (A2, F2)	12	40.0	OFF Reactive

考案

AIHにおける肝細胞障害ではeffectorが何であるか依然不明ではあるが、門脈周囲にはCD4陽性細胞が集簇し、肝実質にはCD8陽性細胞が浸潤していることや、肝内浸潤リンパ球より得られたT細胞クローンがCD8陽性細胞であったことなどより、CD8陽性細胞と肝細胞障害との関連性が指摘されている(2,3)。CD8陽性細胞は抗原提示細胞より、クロスプレゼンテーションの機構によりHLAクラスI分子を介してシグナルを受け取るが(4)、この際T細胞活性化にとってcostimulatory分子を介するシグナルがさらに必要である(1)。今回我々の検討で、CD28分子のレセプターであるCD80やCD86陽性細胞がAIH患者の特に肝浸潤リンパ球内に高頻度に存在することがわかった。さらに、多くのリンパ球はCD69陽性であり、これら陽性細胞比率はC型肝炎におけるそれより高値であった。つまりAIHにおいては、C型肝炎における以上に肝内には活性化されたリンパ球が浸潤しており、しかもCD80やCD86陽性の抗原提示能を有する細胞が多いことを意味している。このことはAIHではよりT細胞と抗原提示細胞間でのシグナル伝達がかんに行われ、T細胞が活性化状態にあることが予想される。さらに、ステロイド投与の有無によるCD86の頻度に違いがなかったことや、CD86陽性細胞と肝機能の活動性との間に関連性を認めなかったことより、ステロイド投与により肝炎が沈静化されている状態においても、抗原提示能を有する抗原提示細胞は存在し、

シグナル伝達が阻害されている状態にあることが予想される。これは、AIH症例でステロイドを減量中に肝炎の再燃をおこす症例が存在することとも矛盾しない。

症例によっては、ANAが陽性であるにもかかわらず、AIHかどうか判断に迷う症例、薬剤性肝炎かAIHか診断に苦慮する症例、 γ -グロブリンが2g/dl以下でもAIHを強く疑う症例など、AIHの確定診断が困難な症例に遭遇する機会は多い。このような症例のAIHの診断、およびステロイド投与を行うか否かの判断において、肝内浸潤リンパ球のCD86陽性細胞比率がその補助因子となる可能が示唆され、今後症例数を重ねさらなる検討をおこなって行きたいと考えている。

文献

- 1) Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Nadler LM. The role of B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity, and down-regulation of the immune response. *Immunol Rev* 153: 47, 1996
- 2) Czaya AJ. Understanding the pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 96: 1224-1231, 2001
- 3) Tanaka A, Iwabuchi S, Takatori M, Ohno A, Yamada H, Hashimoto N, Ikeda Y, Kato T,

Nishioka K, Iino S, Yamamoto K. Clonotypic analysis of T cells in patients with autoimmune and viral hepatitis. *Hepatology* 25: 1070-1076, 1997

4) Lakszavecchia A. Licence to kill. *Nature* 393: 413-414, 1998

厚生労働科学研究費補助金（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急性発症例からみた肝細胞障害機序

研究協力者 熊田 博光 虎の門病院 消化器科部長

研究要旨 自己免疫性肝炎(Autoimmune hepatitis: AIH)の肝細胞障害については不明な点が多く、未だ一定の見解が得られていない。これは、本疾患の確定診断が難しいこと、本邦においては稀な疾患であり対象症例が少ないことも一因であると考えられる。また、近年ではAIHの発症の再にもその特徴である高 γ -glob.血症や抗核抗体の出現を伴わない急性発症例も報告されている。そこで、我々は1999年に新しく提唱されたscoring system¹⁾によりdefinite AIHと診断された症例を対象とし、これらのうち急性発症した症例と慢性経過した症例を比較検討することで、本疾患の肝細胞障害機序にどのような違いがあるかを検討した。この二群における臨床的背景、免疫学的パラメータを解析した結果、急性発症例においては、CD8CD25陽性細胞が肝細胞障害に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

A. 研究目的

我々はこれまでにAIHの組織学的変化と長期予後につき検討を加えてきた。自己免疫性肝炎(AIH)と診断されている症例のなかには、急性期には確定診断がつかず、その後の経過観察中に初めて自己免疫性肝炎と確定診断される症例があり治療の開始が遅れることもある。このような問題の一番の原因は特異的な自己抗体の無いこと、現行の診断指針では診断がつきにくいことが挙げられる。そこで、今回は、自己免疫性肝炎のうち急性発症した症例と非ウイルス性急性肝障害の症例に焦点をあて検討を行った。本年は、組織学的変化を確認した症例を対象とし、その臨床経過と宿主側因子を解析することで、何が病態に関与しているのかを明らかにすることを目的とした。各症例間の違いが何に起因するのかを検討し、副作用も起こる可能性のある免疫抑制療法をいかに効果的に行うか、またその指標となる因子が存在するのかを解析した。この三年間の間に新たにAIHと診断された症例については、初回治療の前から測定を開始し、また以前より当院通院中の症例においては、保存血清を用いて経過中の治療反応性により免疫応答の変化についても検討を行った。

B. 対象と方法

2001年3月現在当院外来通院中で経過観察を継続していることを確認したAIH症例52例と、非ウイルス性急性肝障害12例で、いずれも組織学的検索を施行している症例を対象とした。このうち当院初診時のALT値が250以上の症例をAIH急性発症群とし、それ以外のAIH慢性経過群と、非ウイルス性急性肝障害群と診断された12例につき以下の各項目において比較検討を行った。肝胆道系酵素、各種ウイルスマーカー、自己抗体、IgG、IgM、組織学的検査であり、可能なかぎりHLA-DRB1についての検討も行った。

抗核抗体は間接蛍光抗体法(Hep-2細胞)、抗平滑筋抗体は間接蛍光抗体法、抗LKM1抗体は蛍光抗体法、HBs抗原はRIA法、HCV抗体はEIA(第3世代)、HCV-

RNAはRT-PCR法、HLA typingは血清学的方法(判定困難な場合PCR-MPH法)を用いて測定した。今回の検討では、DR2、3、5、6については、DR11-18に分離して解析を行った。さらに、治療開始時より測定を開始した症例は、末梢血よりリンパ球を分離し、抗CD3抗体で固相したプレートで24時間培養した上で、フローサイトメーターにより解析と培養上清中のサイトカインを測定した。統計学的解析はカイ二乗検討を用いた。

C. 研究結果

まず、AIHのうち急性発症型とされたものは11例(21.2%)存在し、初診時および初回肝生検時にAIHと診断された症例はわずか4例にすぎなかった。初診時のALT値IgG値の比較では、AIH急性発症群ALT値387IU/l(256-2640)、IgG値2220mg/dl(1858-2940)、AIH慢性経過群92IU/l(22-234)、2658mg/dl(2310-4632)、非ウイルス性急性肝障害群186IU/l(88-452)、1274mg/dl(870-2520)であり、AIH急性発症群ではIgG値が慢性経過群に比して低い傾向が認められた。組織学的検索では、初回肝生検時に慢性経過群41例中38例に確定診断がえられ、急性発症型でも11例中8例はAIHと診断しうる結果であった。また、非ウイルス性急性肝障害群のなかでAIHの可能性のあるものは2例であった。AIH急性発症型において、当初AIHと確定診断しえなかった理由は、組織学的にAIHと診断されても初期の段階ではIgGが低かったりANAが低値であったりして診断基準を満たさなかった事が一番の要因であった。これらの症例のなかには、2度目の急性増悪で診断がつく症例もあり、この時点で組織学的に進行していた。AIH症例中、HLAの出現頻度は、DR4、DR8、DR15、DR14の順に多く、急性発症型においては9例中8例にDR4、DR15が認められた。治療開始前より測定したフローサイトメーターによる解析では、cytotoxic T cell (CTL)の活性化を示すCD8+CD25+細胞の推移において両群間に差が認められた。急性発症群4例と慢性経過群11例について検

討を行ったが、治療前値は、急性群24.2%群に対して、慢性群13.6%と急性群が有意に高かった。治療開始後は、1週目、2週目とも慢性経過群の方が高く、減少率では急性群が有意な差をもって減少していた。

D. 考察

AIHの肝細胞障害については、Antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) がその主たる要因であるとする報告をはじめとして諸説あるが、未だその結論はでていない。今回の我々の検討では、AIHも急性期においてはCTLを介した肝細胞障害が主体であり、障害が進むにつれADCCに主体が移っていく可能性が示されたといえる。このことは、急性発症例においては発症期に高 γ -glob.血症や抗核抗体などの免疫応答がまだ揃わないという結果の裏付けにもなると考えられる。肝細胞障害発症の当初はCTL-MHC class1を介した系がまず働き急激な障害が進み、この後、helper T cell-MHC class2を介した系により自己免疫性肝炎としての様相を整えていき、その後の病態形成には、Th1/Th2のバランスが大きく関わってくるのではないかと推察される。これは、本疾患がHLAのDR抗原に深く関わっていることも支持する結果であり、興味のもたれる点である。このため、当院でも自己免疫性肝炎とHLA typingの関係について検討した。

36例中DR4またはDR15陽性者は33例(91.7%)と高率で、他報告例との差を認めないが²³⁾、治療反応性の良好な症例では、DR14陽性例が多い傾向がみられ、組織学的にも改善している例が多かった。HLA-DR抗原が自己免疫性肝炎の病態に影響を与えている可能性については、HCV陽性例、又、他の自己免疫性肝炎におけるDR抗原の特徴的なパターンの検索において一定の傾向が認められることより、明らかである⁴⁾⁵⁾⁶⁾。本邦のAIH症例では、DR4が高頻度に陽性であり、欧米では、DR3が高頻度である。さらに欧米ではDR3陰性者ではDR4が高頻度である事より、お互いに独立した疾患感受性遺伝子であると考えられている。この事はPBMC及び肝内浸潤リンパ球を用いた報告でも検討されている。肝内浸潤リンパ球が肝細胞あるいは肝細胞由来の自己抗原に感作されていること、門脈域浸潤リンパ球においても、AIHではnon-AIHに比べてCD4陽性細胞優位であるとの報告があり、病態にclass IIが関与している事を示唆しており、DR 4、DR 15が重要な因子であると考えられる⁷⁾。又さらにLKM-1抗体陽性のAIHにおいて、LKM-1特異的T細胞のcell lineを用いたcytokine産生能の検討からTh1細胞優位であるとの報告もあり、AIHの病態におけるclass IIを介したCD4細胞が重要な役割を担っていると考えられる⁸⁾。今回の我々の検討では、発症時期および治療開始時期のCD8+CD25+細胞の変化を検討したのみであるが、今後はさらに症例数を増やすこと、組織学的変化、治療の反応性とMHC-class2抗原がどのように関わっているかについて検討を行い病態形成におけるDR抗原の役割について研究を続けていきたいと考える。

E. 結論

AIHの急性発症例における肝細胞機序にはCTLを介した系が重要な役割を担っていると考えられた。このことが、急性発症例の診断困難例における血液マーカーの変化の少なさの原因である可能性があり今後の診断における課題の一つであると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 鈴木義之・池田健次・斎藤聡・他. 自己免疫性肝炎(AIH)の病態とHLA-DR抗原についての解析. 消化器と免疫 No35:188-190,1998.
 - 2) 鈴木義之・熊田博光. 自己免疫性肝炎(Autoimmune hepatitis:AIH)の長期予後. 消化器2000 200-203,2001.
 - 3) 鈴木義之. 自己免疫性肝疾患 year note 2003 183-194,2003
- ##### 2. 学会発表
- 1) 鈴木義之・熊田博光. 第5回日本消化器免疫学会総会 1998. 自己免疫性肝炎(AIH)の病態とHLA-DR抗原についての解析.
 - 2) 鈴木義之・熊田博光. 第2回日本肝臓学会大会 1998. わが国における自己免疫性肝炎の予後. 一長期観察例における自己免疫性肝炎の病態と予後.
 - 3) 鈴木義之・熊田博光. 第86回日本消化器病学会総会 2000. 自己免疫性肝炎の今後の展開—自己免疫性肝炎の長期予後
 - 4) 鈴木義之・熊田博光. 第88回日本消化器病学会総会 2002. 本邦における難治性肝疾患の実態と変遷—自己免疫性肝炎の変遷と最近の動向

文献

1. International Autoimmune Hepatitis Group: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. Journal of Hepatology 1999; 31:929-938
2. Seki T, et al: Association of autoimmune hepatitis with HLA-Bw54 and DR4 in Japanese patients. Hepatology 1990 Dec; 12(6): 1300-1304
3. Zeniya M, et al: Immunogenetic background of hepatitis B virus infection and autoimmune hepatitis in Japan. Gastroenterol Jpn 1993 Mar; 28 Suppl 4:69-75
4. Zeniya M, et al: HCV-marker-positive autoimmune-type chronic active hepatitis: a possible relation between HCV infection and liver autoreaction. Liver 1994 Aug; 14(4): 206-212
5. Parveen S, et al: Antibodies to Ro/La, Ccp-B, and snRNPs antigens in autoimmune hepatitis of North America versus Asia: patterns of immunofluorescence, ELISA reactivities, and HLA association. Dig Dis Sci 1998 Jun; 43(6):

1322-1331

6. Donaldson PT, et al: Immunogenetics in liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1996 Sep; 10(3): 533-549
7. Schlaak JF, et al: Analysis of the in vitro cytokine production by liver-infiltrating T cells of patients with autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1993 Oct; 94(1): 168-173
8. Lohr HF, et al: Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticonotypic T-cell responses in LKM-1. *Hepatology* 1996 Dec; 24(6): 1416-14

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

急性肝炎様発症自己免疫性肝炎について

研究協力者 恩地 森一 愛媛大学医学部 第三内科

研究要旨：急性肝炎様発症する自己免疫性肝炎について、E型肝炎ウイルスの関連について検討を行った。急性肝炎様発症するAIHにはE型肝炎の関与は低いと考えられた。

A. 研究目的

急性肝炎様発症する自己免疫性肝炎については、従来より報告してきた。本研究では急性肝炎様発症する自己免疫性肝炎へのE型肝炎の関与について検討した。

B. 研究方法

対象は急性肝炎様に発症し、組織学的検索を行ったAIH13症例。保存血清を用いて東芝病院研究部三代俊治博士によって、Anti-HEV-IgM, Anti-HEV-IgG, HEV-RNAを測定して頂いた。

C. 結果

13症例のうち、Anti-HEV-IgMのみ陽性、Anti-HEV-IgG, HEV-RNA陰性の症例が1例。残りの12例は全て陰性であった。またAnti-HEV-IgMのみ陽性であった症例はステロイドの減量後に肝機能検査の増悪が見られ、ステロイドの増量後に改善していた。

D. 考察

急性肝炎様発症する自己免疫性肝炎のうち、Anti-HEV-IgMのみ陽性が1例のみであったこと、また陽性の1例もステロイド減量後に肝機能検査が悪化し、増量後に肝機能検査が正常化したことより、肝障害の主原因はAIHであったと思われる。

E. 結果

急性肝炎様発症するAIHにはE型肝炎の関与は低い。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

マウス自己免疫性肝炎モデル作製の試み

研究協力者 各務 伸一 愛知医科大学消化器内科 教授

研究要旨：II型自己免疫性肝炎の対応抗原であるcytochrome P450 IID6 (CYP2D6) 遺伝子を組み込んだプラスミドベクターを作製し、異なる2つのstrainのマウスの下肢筋肉内に免疫することにより肝障害を誘導した。CYP2D6に対する幼若化反応の結果や抗体産生が認められたことからCYP2D6に対する特異的な免疫応答が誘導されていることが確認された。また、両strain間で肝障害の程度や抗体産生において若干の相違が認められたことから、遺伝的背景因子の相違により誘導される肝障害にも差異が生じることが示唆された。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

抗LKM-1抗体の対応抗原であるCYP2D6をコードする遺伝子をCMVプロモーターの下流に組み込んだCYP2D6/pCDNA3.1ベクターを作製した。異なる2つのstrainのマウス(Balb/c, C57BL/6)の下肢筋肉内にcardiotoxinを接種し、その1週間後に同様の部位にCYP2D6/pCDNA3.1を接種した。血清中のALT値を接種後5週間まで経時的に観察し、屠殺後に下肢筋肉内におけるCYP2D6の発現をウエスタンブロット法にて確認すると同時に肝臓の組織像を検討した。また、血清中の抗CYP2D6抗体、抗原特異的幼若化反応の解析により、特異的免疫応答の誘導の有無について検討した。

C. 研究結果

CYP2D6/pCDNA3.1を接種したマウスの筋肉内にはCYP2D6として予想される56KDaのバンドがウエスタンブロット法にて確認された。

両strainともALT値については有意な上昇が認められなかったが、CYP2D6/pCDNA3.1接種群の約半数のマウスの肝組織内にグ鞘内への炎症細胞浸潤とfocal necrosisを散見した。また、C57BL/6に比べBalb/cマウスにおいてより強い肝障害を呈しているマウスが多く認められた。CYP2D6/pCDNA3.1を接種したC57BL/6マウスの血清中にはCYP2D6に対する抗体産生を認めたが、Balb/cでは明らかな抗体産生を認めなかった。CYP2D6に対する幼若化反応は両strainともCYP2D6/pCDNA3.1を接種した群において亢進していた。

D. 考察

両strainのマウスにおいてCYP2D6特異的免疫応答により肝炎が惹起された可能性が示された。また、肝障害の程度や抗体産生において両strain間で相違が認められたことから、遺伝的背景因子の相違により誘導される肝障害にも差異が生じることが示唆された。今後はより強力な発現ベクターの構築と免疫方法の改良について検討を重ねたい。

E. 結論

当モデルは自己免疫性肝炎の発症機序、病態制御機構の解析に有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 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。

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。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

Con A誘発マウス肝炎モデルを用いた免疫学的肝細胞障害の発症とその制御機構の検討

研究協力者 牧野 勲 旭川医科大学附属病院院長

研究要旨：Con A誘発マウス肝炎モデルはCon Aにより肝内にCD4+ Tリンパ球が浸潤し、その後肝小葉内に広範な肝細胞壊死が生じること、催炎性サイトカインであるTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β が肝細胞障害発症に関わっていることから、自己免疫性肝炎や劇症肝炎などの難治性肝疾患の有用なモデルとなることが報告されてきた。我々は本モデルにおいて、TNF- α によって誘導されるマウスCXCケモカインであるMacrophage inflammatory protein-2(MIP-2)が、多核白血球の肝局所への遊走と活性化を行い、肝障害発症に深く関わっていることを見いだした。今回、CCケモカインであるMIP-1 α がTh1サイトカイン産生を誘導し、肝障害発症に関与することを明らかにした。

共同研究者

中村公英、横浜吏郎

旭川医科大学内科学第二講座

A. 研究目的

白血球の遊走活性化因子であるケモカインは、様々な炎症性疾患やアレルギーの場で重要な役割を果たしていることが知られているが、肝疾患における関与についてはいまだ十分解明されていない。我々はこれまでにCon A投与後早期に種々のケモカインが血中に増加すること、またマウスCXCケモカインであるMIP-2が多核白血球の遊走および活性化を介してCon A肝障害の増悪因子としてはたらくことを報告した。今回更に、マウスCCケモカインであるMIP-1 α に注目し、肝障害発症への関与および作用機序について検討した。

B. 研究方法

7週令の雌性Balb/cマウスにCon A (15 or 20mg/kgBW)を尾静脈より1回静注し、肝障害モデルを作成した。Con A投与1、2、4、6、8、12、18、24時間後に下大静脈より採血し、血中MIP-1 α 値をELISA法(Genzyme社)にて測定した。次に抗マウス MIP-1 α 抗体 (50 or 200 μ g/マウス、Genzyme社)をCon A (20 mg/kgBW)投与30分前に1回静注し、Con A投与8、24時間後の血中ALT値を酵素法(Wako社)で測定した。同様にCon A投与8時間後に肝臓を摘出し、ホルマリン固定後、H-E染色し、病理学的変化について検討した。また、マウスrecombinant MIP-1 α (0.5 or 2 μ g/マウス、Genzyme社)をCon A (15 mg/kg BW)投与30分前に腹腔内投与し、Con A投与8時間後の血中ALT値を測定した。さらに、MIP-1 α の作用機序について検討するため、抗マウスMIP-1 α 抗体 (200 μ g/マウス)とマウスrecombinant MIP-1 α (2 μ g/マウス)をCon A投与30分前に投与し、Con A投与2、8時間後の、血中IFN- γ およびTNF- α 値をELISA法(Genzyme社)で測定した。

統計学的検討は、血中ALT値並びにIFN- γ 、TNF-

α 値の結果をMean \pm SEで示し、有意差検定はt検定あるいは分散分析 (ANOVA) 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投与による血中MIP-1 α 値の変化

Con A (20mg/kgBW)を尾静脈より1回静注すると、投与2時間後をピークとした一過性の血中MIP-1 α 値の増加が認められ、18時間後には投与前値に復した(図1)。

2. 抗MIP-1 α 抗体、マウスrecombinant MIP-1 α のCon A誘発肝障害に及ぼす影響

抗マウス MIP-1 α 抗体の前投与により、Con A投与8、24時間後の血中ALT値は対照群に比較して用量依存性に有意に低下した(図2)。また、病理組織学的検討では、Con A投与8時間後の広範肝細胞壊死像の軽減を認めた(図は呈示せず)。一方、マウスrecombinant MIP-1 α の前投与により、Con A投与8時間後の血中ALT値は対照群に比較して有意に増加した(図3)。

3. Con A投与後のIFN- γ およびTNF- α 産生に及ぼす抗MIP-1 α 抗体、recombinant MIP-1 α の影響

200 μ gの抗マウスMIP-1 α 抗体の前投与により、Con A (20mg/kg)投与8時間後の血中IFN- γ 値、また2時間および24時間後の血中TNF- α 値は対照群に比較し有意に低下した(図4)。一方、2 μ gのマウスrecombinant MIP-1 α の前投与により、Con A (15 mg/kg)投与2時間後の血中血中TNF- α 値は対照群に比較し有意に低下した(図5)。

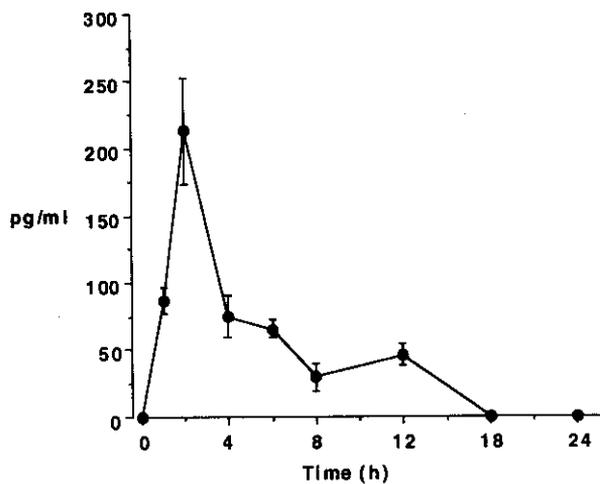


図1. Con A (20mg/kg) 静注後の血中MIP-1αの経時的変化

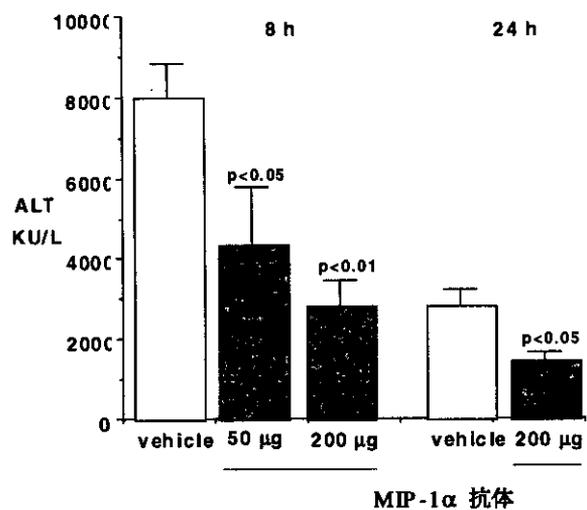
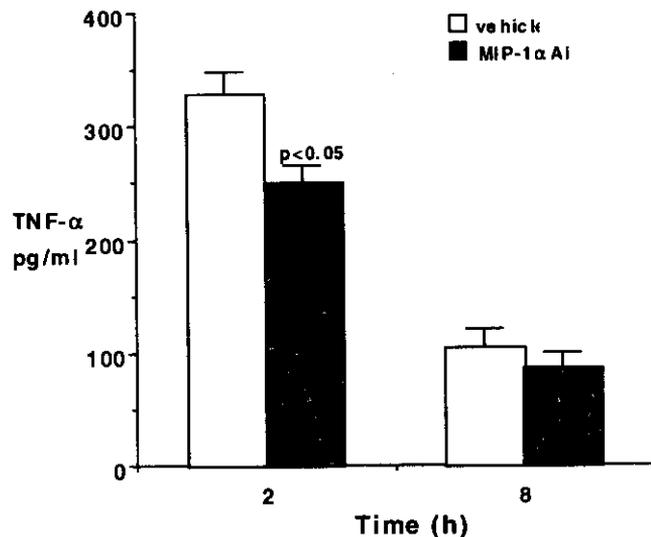


図2. Con A 肝障害に対する抗MIP-1α抗体の影響

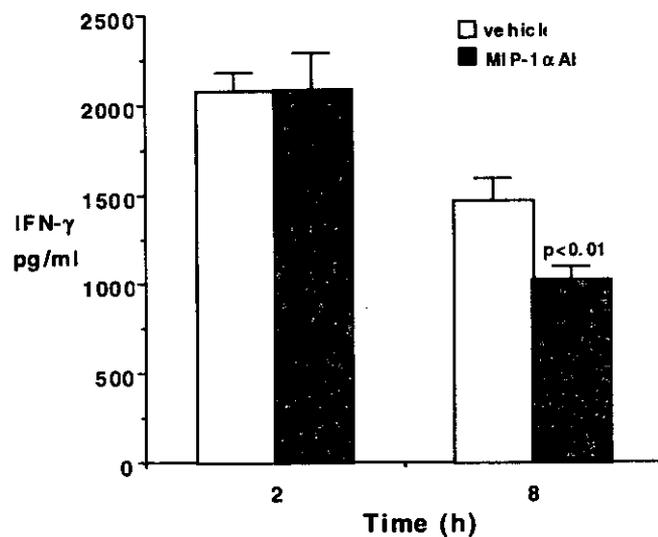


図4. Con A 投与後の血中Cytokine産生に対する抗MIP-1α抗体の影響

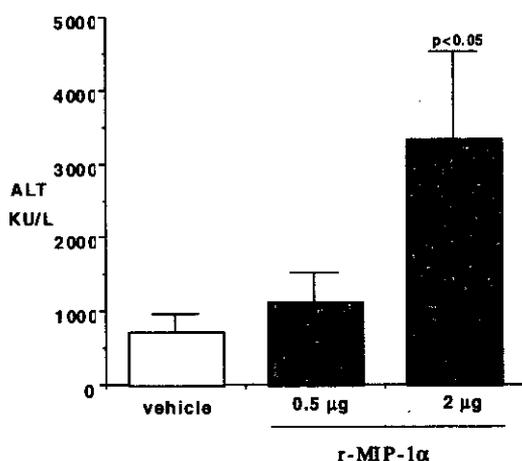


図3. Con A 肝障害に対するrecombinant MIP-1αの影響

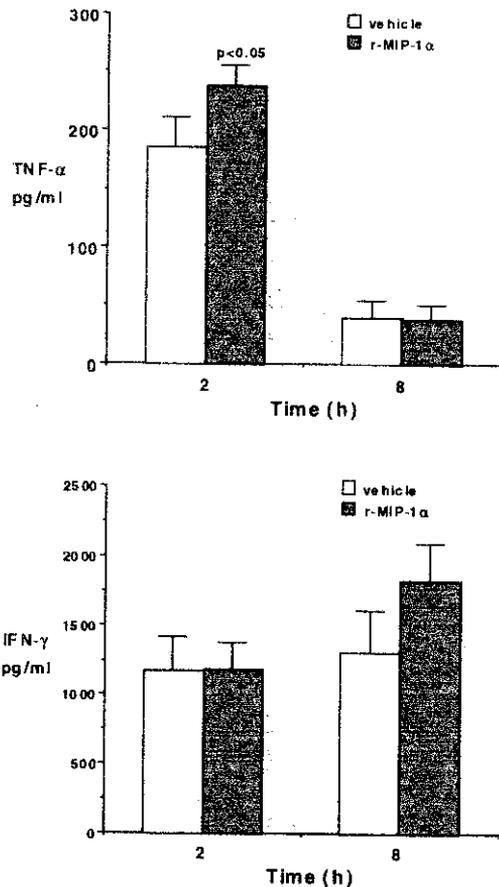


図5. Con A 投与後の血中Cytokine産生に対する recombinant MIP-1 α の影響

D. 考察

Con A誘発マウス肝炎モデルはCon Aにより肝内にCD4+Tリンパ球が浸潤し、その後肝小葉内に広範な肝細胞壊死が生じること、催炎性サイトカインであるTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β が肝細胞障害発症に関わっていることから、自己免疫性肝炎や劇症肝炎などの難治性肝疾患の有用なモデルとなることが報告されてきた。我々はこれまでの検討により、本モデルではCon A投与後に産生されるTNF- α によって誘導されるマウスCXCケモカイン、MIP-2が、多核白血球の肝局所への遊走と活性化を行い、肝障害発症に深く関わっていること、更にセリンプロテアーゼ阻害剤であるAntithrombin IIIがMIP-2産生抑制を介して肝障害発生を阻止することを報告してきた。

一方、CCケモカインは主としてリンパ球、単球系の遊走因子として知られているが、本モデルにおける役割については未だ報告されていない。CCケモカインであるMIP-1 α と肝胆道系疾患については、これまでGVHDによる肝障害、肝移植後の拒絶反応への関与が報告されており、またYoneyamaらはマウス肉芽腫性実験肝障害における、樹状細胞とMIP-1 α の役割について詳細に検討している。今回我々は、本モデルにおけるMIP-1 α の関与に注目し、その役割、作用機序について検討した。

今回の検討により、Con A投与後早期に血中に一過性のMIP-1 α の増加が確認された。また、抗MIP-1

α 抗体の前投与は肝細胞障害を用量依存性に軽減させ、逆にrecombinant MIP-1 α の前投与は肝細胞障害を増悪させた。これらの結果はMIP-1 α がMIP-2と同様、Con A誘発肝障害の発症進展に関与していることを示唆している。また、作用機序としては、抗MIP-1 α 抗体の前投与により、Con Aにより誘導されるTNF- α およびIFN- γ の血中濃度が低下し、逆にrecombinant MIP-1 α の前投与は血中TNF- α を増加したことから、Con A投与により産生されたMIP-1 α がこれらの炎症性サイトカインの産生誘導を介して肝障害の増悪因子として働いていることが示唆された。しかし、本研究において抗MIP-1 α 抗体の投与は、ALT上昇や炎症性サイトカインの増加を完全には抑制しておらず、MIP-1 α はCon A肝障害の発症進展に部分的に関与しているものと考えられる。

我々は、これまでにCon A誘発肝障害においてMIP-2がTNF- α によって誘導されることを明らかにしており、今回の結果はMIP-1 α とMIP-2が異なる作用機序で肝障害発症に関与していることを示唆している。一方、Con A誘発肝障害における他のケモカインの関与については、CXCケモカインであるinterferon-inducible protein-10 (IP-10)が肝へのリンパ球遊走を促すことが報告されており、本モデルでは様々なサイトカインやケモカインが複雑にクロストークしながら肝障害の発症、進展に関わっている可能性が考えられる。今後さらに様々なサイトカイン、ケモカイン産生の経時的な変化、その産生細胞の検討、またそれぞれの相互作用を明らかにしていくことにより、本モデルにおける肝障害発症の詳細な機序、更には免疫学的肝障害の治療法開発へ寄与することが出来ると考えられる。

E. 結論

以上より、MIP-1 α はTh1サイトカインであるTNF- α 、IFN- γ 産生を誘導し、Con A肝障害発症に関与することが明らかになった。本研究の結果は、MIP-1 α が免疫学的肝細胞障害機序が関与する自己免疫性肝炎や劇症肝炎などの難治性肝疾患の発症機序や治療法の研究に有用な標的となりうることを示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Concanavalin A (Con A) 誘発マウス肝障害モデルにおけるNSAIDsの効果 薬理と治療 30:S 369-372, 2002.
- 2) Concanavalin A (Con A) 誘発マウス肝障害モデルにおけるヒアルロン酸(HA)の投与効果 薬理と治療 30:S 373-377, 2002.
- 3) Concanavalin A (Con A) 誘発マウス肝障害モデルにおけるMacrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α)の関与 薬理と治療 30:S 379-382, 2002.
- 4) Antithrombin III prevents concanavalin A-induced liver injury through inhibition of

Macrophage inflammatory protein-2
release and production of prostacyclin in
mice. J Hepatol 36:766-73, 2002.

2. 学会発表

- 1) 第88回日本消化器病学会総会 パネルディス
カッション(8)
ケモカインを標的とした免疫学的肝細胞障害
の発症機序と治療法の検討. 日消誌99:
A175, 2002.
- 2) 第6回日本肝臓学会大会 ワークショップ 6
Concanavalin A誘発マウス肝障害モデルにお
けるヒアルロン酸の投与効果. 肝臓
43:Suppl(2) A314, 2002.
- 3) 第6回日本肝臓学会大会
Concanavalin A (Con A)誘発マウス肝障害モ
デルにおけるMacrophage Inflammatory
Protein-1 α (MIP-1 α)の関与. 肝臓
43:Suppl(2) A375, 2002.

H. 知的財産権の出願登録状況

1. 特許所得
なし

自己免疫性肝炎におけるSLA/LP抗体：頻度・意義と対応抗原の解析

研究協力者 宮川 浩 帝京大学溝口病院第四内科 助教授

研究要旨：各種自己免疫性肝疾患を対象にSLA/LP抗体のスクリーニングを行ったところ、I型AIH75例中、5例(6.7%)にのみ検出され、対照とした他の肝疾患、SLEや健常人では1例も検出されなかった。次に、SLA/LP抗体の対応抗原がaminoacyl-tRNA associated proteinの1つであると報告されたことから、Jo-1抗体をはじめとする既知の関連自己抗体との異同をimmunoprecipitationで検討した。SLA/LP抗体はtRNAに沈降したが、既知のものとは相違した。さらにその分子量をimmunoblot法で検索したところ、48kDaと判明し、既知のものとは相違した。以上の結果から、SLA/LP抗体は、その検出は低率であったが、自己免疫性肝炎に特異性が高く、既知の自己抗体とは相違する抗体であることが明らかになった。

A. 研究目的

soluble liver antigen/liver pancreas (SLA/LP) 抗体は従来II型自己免疫性肝炎 (AIH) を特徴づける自己抗体として報告されてきた。最近、本抗体の主要対応抗原がaminoacyl-tRNA associated proteinの1つであることが報告され^{1,2}、recombinant蛋白を抗原としたELISAが開発された³。

そこで、各種自己免疫性肝疾患や他の肝疾患を対象として本抗体のスクリーニングを行い、本邦における頻度と臨床的意義を検討した。さらに、SLA/LP抗体の対応抗原の解析を行い、既知のaminoacyl-tRNA associated proteinを抗原とする他の自己抗体との異同を検討した。

B. 研究方法

1. 頻度と臨床的意義：I型AIH 75例、II型AIH 5例、PBC 46例、PSC 10例、C型慢性肝炎 47例 (LKM-1抗体陽性17例を含む)、SLE 48例、cryptogenic hepatitis 3例、および健常人40例を対象とした。SLA/LP抗体はSLA/LP recombinant proteinを抗原としたELISAによってスクリーニングを行い、immunoblot法によって確認した。

SLA/LP抗体の臨床的意義を明らかにするため、陽性例と陰性例の間で、臨床病理像を比較した。

2. 対応抗原の解析：超音波処理したHeLa培養細胞を用いてimmunoprecipitationを行い、さらに、同培養細胞を抗原としたimmunoblotを行い、対応抗原の分子量を既知の自己抗体のそれと比較した。

C. 研究結果

1. SLA/LP抗体は、I型AIH75例中、5例(6.7%)のみに検出され、対照とした他の肝疾患、SLEや健常人では1例も検出されなかった。

2. SLA/LP抗体陽性のI型AIH 5例と、陰性の70例の間で、臨床病理像を比較した(表1)。初診時の平均年齢、男女比、生化学検査、IgG値、PT活性、HLA-DRの分布、肝組織の進展度、およびprednisoloneの反応性は、両群間に差はなかったが、死亡率は陽性例で有意に高率であった。欧州例ではHLA-DR3保有者に本抗体が高率に検出されると報告されているが、今回の対象例ではHLA-DR3保有者はいなかった。

表1. SLA/LP抗体陽性/陰性別にみたAIHの臨床病理像の比較 (初回検査時)

Category	anti-SLA/LP		P value
	positive (n=5)	negative (n=70)	
mean age (years old)*	56 ± 14	54 ± 12	ns
male : female	0:5	10:60	ns
T-Bil. (mg/dL)*	4.0 ± 2.3	3.5 ± 2.0	ns
ALT (IU/L)*	489 ± 68	402 ± 58	ns
IgG (mg/dL)*	2702 ± 188	2688 ± 158	ns
PT activity (%)	74 ± 8	78 ± 8	ns
HLA-DR locus	1:0:4	17:0:44**	ns
DR2:DR3:DR4			
Histology CH : LC	4:1	66:4	ns
Response to prednisolone (responder : non-responder)	4:1	59:4	ns
Mortality rate	2 (40%)	2 (4%)	0.01

Abbreviations: CH, chronic hepatitis; LC, liver cirrhosis; ns, not significant.

*Values are expressed as mean ± SEM. ** The other nine patients did not show the presence of DR2, DR3, and DR4.

3. SLA/LP抗体陽性血清では、tRNA領域に immunoprecipitationされたが、既知の自己抗体の RNAサイズとは相違した。

4. SLA/LP抗体陽性はimmunoblot法によって48 kDaのバンドが認められたが、対照としたJo-1抗体、PL-7抗体ではそれぞれ50、80kDaのバンドが検出され、明らかに相違した。

D. 考察

本邦の自己免疫性肝疾患におけるSLA/LP抗体の頻度は6.7%で、欧州での成績と比較すると低率であった。しかしながら、本抗体はI型AIH以外の疾患では1例も検出されず、AIHに極めて特異的に検出されることが判明した。特記すべきはSLEでも1例も検出されなかったことで、この点は抗核抗体と大きく相違した。興味あることに、欧州では、本抗体の検出率がHLA-DR3保有者で有意に高いことが報告されている⁴。しかしながら、本邦の一般人口におけるHLA-DR3保有者は皆無に近いことが知られており、このことが、本邦におけるSLA/LP抗体頻度の低い一因となっていると推察された。

本抗体の臨床的意義を明らかにするため、陽性例と陰性例との間で臨床病理像を比較した。生化学検査やIgG値、HLA-DRの分布に差はなく、欧州での報告とは相違し、本抗体が必ずしも重症例でのマーカーとはいえなかったが、肝疾患に基づく死亡率はSLA/LP抗体陽性例で有意に高率であった。今回の検討から、SLA/LP抗体陽性のAIHをIII型に亜分類する必然性には乏しかったが、本抗体の意義について、さらに対象症例を重ねた検討が必要と考えられた。

さて、最近、本抗体の主要対応抗原がaminoacyl-tRNA associated proteinの1つで、UDA-suppressor tRNA-associated proteinであると報告されたが、その機能は未だ不明である。対応抗原がaminoacyl-tRNA associated proteinである既知の自己抗体として、一部のdermatomyositis/polymyositis患者に検出されるJo-1抗体、PL-7抗体が知られているが、本抗体との異同は明確にされていない。そこで、HeLa培養細胞を用いたimmunoprecipitationとimmunoblotを用いて、本抗体の分子生物学的な検討を行った。

Immunoprecipitationで本抗体陽性血清は、対照とした上記2つの抗体陽性血清と同様にtRNA領域にprecipitationされたが、RNAサイズは相違していた。また、immunoblot法で本抗体は48kDaのバンドとして検出されたが、対照とした他の自己抗体は既報のごとく、Jo-1抗体は50 kDa、PL-7抗体は70 kDaと、分子量も相違していた。従って、本抗体は、既報の自己抗体とは相違し、AIHに特異的な自己抗体であることが明らかにされた。

AIHの発症機序の詳細は依然として不明であるが、本抗体はAIHにのみ検出される特異性の高い自己抗体であり、既知の自己抗体とは相違するものであることから、本抗体反応のさらなる研究は、一部のAIHの発症機序の機序の解明に寄与すると思われる。

E. 結論

SLA/LP抗体の頻度はAIHの6.7%と低率であったが、他の対照群では1例も検出されなかった。本邦での検出率が欧州例に比較して低い理由として、HLA-DR3保有者が一般人口でも極めて低率であることや、AIHの病態、とくに重症例が本邦では少ないことが考えられた。

SLA/LP抗体の解析から、本抗体はaminoacyl-tRNA associated proteinを対応抗原とする既知の自己抗体とは相違することが明らかになった。

参考文献

1. Wies I, Brunner S, Henninger J, et al. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 2000; 355: 1510-1515.
2. Costa M, Rodriguez-Sanchez JL, Czaja AJ, Gelpi C. Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP (Ser) Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 2000; 121: 364-374.
3. Beeres M, Herkel J, Czaja AJ, et al. Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut* 2002; 51: 259-264.
4. Czaja AJ, Donaldson PT, Lobse AW. Antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas and HLA risk factors in type I autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 413-419.

健康危険情報

なし。

研究発表

準備中

知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

自己免疫性肝疾患における抗carbonic anhydrase II抗体
—その測定法の検討—

研究協力者 池田 有成 東京厚生年金病院 内科部長

研究要旨：ELISAにおける抗Carbonic anhydrase II 抗体価の至適測定条件を検討し、肝疾患患者症例（98例）の抗体価の測定を行った。その結果、今までの報告例の多くは不適切な条件下で測定をしていた可能性が示唆され、自己免疫性胆管炎（AIC）のほか、原発性胆汁性肝硬変（PBC）、自己免疫性肝炎（AIH）、原発性硬化性胆管炎（PSC）などの症例においても高率に陽性例が認められた事から、抗CAII抗体は、AICに特異的というよりも、各種の自己免疫性疾患で出現する抗体の1つと考えられた。また、ウイルス肝炎症例群においても正常者群と比較して有意差（ $P < 0.01$ ）が認められた事から、ウイルスによる免疫寛容の破綻より出現していることが推測された。

共同研究者

細田 英雄 東京厚生年金病院 中央検査室

A. 研究目的

炭酸脱水素酵素 アイソザイムII (Carbonic anhydrase II 以下CAIIと略) は水と二酸化炭素より重炭酸の生成を触媒する酵素で、体内の腺上皮細胞に広く分布していて、細胞内外のpHの調節に関与している。現在、このCAIIに対する抗体が肝疾患だけでなく膵疾患、膠原病などの疾患においても報告されている。しかし、それらのELISAにおける測定条件は一定でなく、高濃度の抗原を用いた報告例もあり、非特異的な反応が生じている可能性が考えられた(表1)。

さらに、それらの報告例に広く用いられている市販の抗原(CAII: Sigma社製)と2次抗体(anti-human IgG)との反応のみで発色値がすでに高いという我々の検討結果から(表2)、抗原中にIgG様の不純物の存在が疑われ、結果の信頼性に疑問が感じられた。そこでこのIgG様物質を除去した粗精製抗原を作製した後、至適測定条件を決定し、肝疾患患者の抗体価を測定した。

B. 研究方法

1) 抗原中のIgG様物質を除去する為に、Protein G Sepharose(Pharmacia Biotech社)と共に1晩混和し、粗精製のCAII(除去後CAII)を得た。除去操作の評価として、除去前後のCAIIをTownbinらの方法に準じたImmunoblot法にて、2次抗体とのみ反応させ混入しているIgG様物質の確認をした。2) 除去前後のCAII中に存在するIgG量を、affinity purified anti-human IgGを抗原に用いたサンドウィッチELISAより求めた。3) 至適測定条件の決定として除去後CAIIを、1 mg/mlより段階希釈してCAII抗体陽性3例、正常者3例の血清との反応から抗原濃度を決定し、この濃度にて血清希釈倍率、2次抗体濃度、反応時間を決定した。4) 設定したELISAの至適測定条件で、患者血清98例(原発性胆汁性肝硬変(PBC)26例、自己免疫性肝炎(AIH)16例、自己免疫性胆管炎(AIC)3例、原発性硬化性胆管炎(PSC)2例、ウイルス性肝炎51例)と正常人26例のCAII抗体価を測定した。5) 液体クロマトグラフィでさらにCAII抗原の精製を試みた。

表1. ELISAの測定条件の比較

	年代	報告者	Antigen (CA2)		Serum dilution	
1	1998	Kino-Ohsaki, J. et al.	5mg/ml	50 μ l	(1:25)	50 μ l
2	1999	Akisawa, N. et al.	5 μ g/ml	50 μ l	(1:100)	50 μ l
3	1999	Frulloni, L. et al.	5 μ g/ml	50 μ l	(1:25)	50 μ l
4	1999	Ono, M. et al.	5 μ g/ml	-	(1:30)	100 μ l
5	2000	Okazaki, K. et al.	1mg/ml	50 μ l	(1:40)	50 μ l
6	2002	Ando, A. et al.	5mg/ml	100 μ l	(1:25)	100 μ l
7		Our method	10 μ g/ml	50 μ l	(1:200)	50 μ l

表2. CAII 試薬と2次抗体と OC^{490} 値の比較

CAII Lots number	Po-Goat-anti-human IgG 1:2000
Lot 50K9284	0.755
Lot 98H9310	0.298
Lot 79H9285	0.479

Second antibody (1:2000)	Before	After
1. Po-Goat-anti-human IgG	0.755	0.048
2. Po-Rabbit-anti-human IgG	0.937	0.103
3. Po-Goat-F(ab') ₂ -anti-human IgG(r)	0.685	-
4. Po-Rabbit-F(ab') ₂ -anti-human IgG(Fc)	0.379	-
5. Po-Goat-anti-human IgG(Fab)	0.487	-
BSA	0.035	0.035

(Po: Peroxidase-conjugated) Each test was run in duplicate. (CAII Lots number: 50K9284)

Before; non PG Sepharose-column-applied CAII

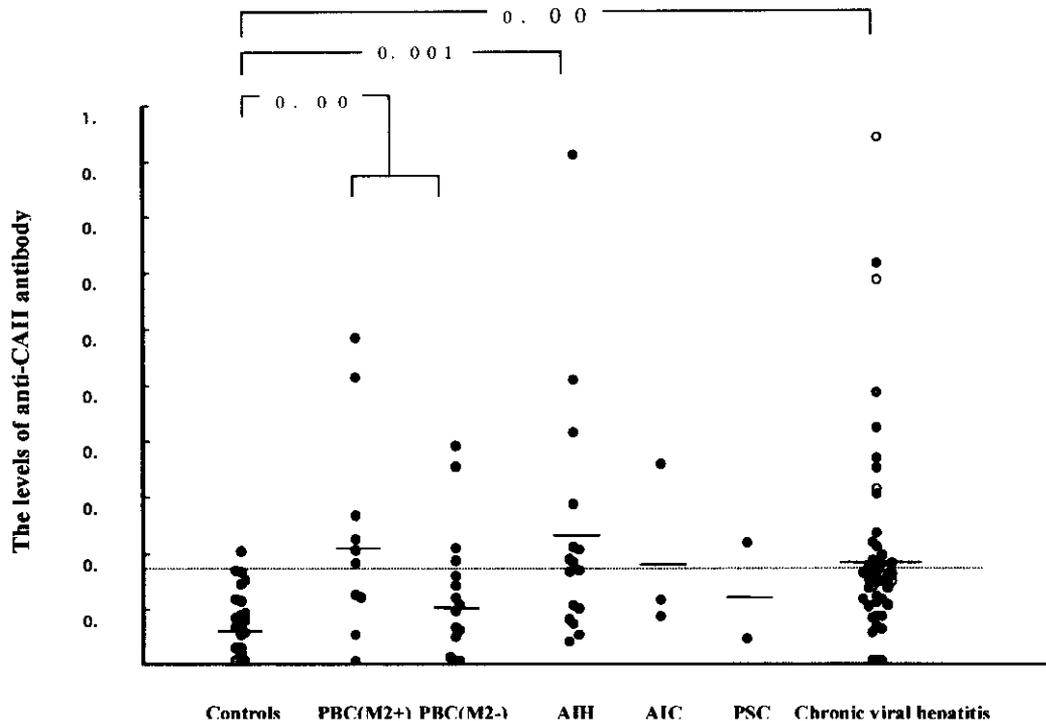
After; PG Sepharose-column-applied CAII

C. 研究結果

除去前のCA2のImmunoblotからIgGのH鎖の位置にバンドが確認され、除去後消失した。2) 除去前のCAII 1mg中に1.1 μ gのIgG様物質の混入がみられ、除去後は0.01 μ gに減少した。3) 至適測定条件は、抗原濃度で10 μ g/mlで充分であり、血清希釈倍率は100倍から200倍であった。4) IgG様物質の除去により、正常域に移行した症例が12例(AIH 6例 PBC 6例)中4例(AIH 2例 PBC 2例)にみられた。しかし、

4例ともIgG分画のリウマチ因子は陰性であった。除去後CAIIでのELISAの結果、陽性(正常者の平均値+2SD以上)は、AIH 16例中8例(50.0%)、PBC 26例中8例(30.8%)、AIC 3例中1例(33.3%)、PSC 2例中1例(50.0%) ウイルス性肝炎51例中14例(27.5%)であった(図1)。また、PBC症例におけるミトコンドリアM2抗体との相関関係を検討したが、有意な差は得られなかった。

図1. 各疾患における抗CAII抗体価 (OC^{490} 値) の比較



Enzyme-linked immunosorbent assay of serum antibody against CAII. Absorbance was determined at 490nm (A^{490}). Dotted line indicates mean absorbance +2SD in normal subjects (0.180). In the case of chronic viral hepatitis, open symbols represent infection by hepatitis B virus. Closed symbols represent infection with hepatitis C virus.

(M2+) = Positive ELISA for antibodies against the M2 component of the mitochondrial inner membrane.
(M2-) = Negative ELISA for antibodies against the M2 component of the mitochondrial inner membrane.

D. 考察

胆管上皮細胞にCAIIが存在する事から自己免疫性胆管炎 (AIC) において、特異的に抗体価の上昇が観察されたとした報告例があるが、我々の結果において、自己免疫性肝炎、自己免疫性胆管炎、原発性硬化性胆管炎、さらにウイルス肝炎においても高率にCAII抗体価の上昇した症例が確認された。この事から、CAII抗体は、AICに特異的に出現するというよりも、各種の自己免疫性疾患で出現する抗体の1つと考えられた。そして、ウイルス性肝炎において高率に抗体価の高い症例が確認された事は、正常者にも自己成分と反応する抗体を産生し得るBリンパ球の存在が知られており、その寛容の破綻の機序に関しては不明の点が多いものの、ウイルス感染に伴う自己成分の変化や、サブレッサーあるいは、ヘルパーT細胞の異常などが関与しているものと考えられた。

E. 結論

市販のCAII試薬中にIgG様の不純物の混入があり、抗体価を測定するうえで精製が必要と考えられた。これに伴いCA2抗体陽性から陰性へと変化した症例が認められ、今までの報告は過大評価されていた可能性が考えられる。

また、AICだけでなく、PBC、AIH、PSC、さらにウイルス性肝炎においても、正常者群と比較して有意な差が確認された。この事から、CAII抗体は、各種の自己免疫性疾患で出現する抗体の1つと考えられた。

G. 研究発表

第38回日本肝臓学会総会 (2002 6月)

第49回日本臨床検査医学会総会 (2002 11月)

Reference

- Andoh, A., Fujiyama, Y., Yoshioka, U., et al, 2002. Elevated serum anti-carbonic anhydrase II antibodies in patients with ulcerative colitis. *Int.J.Mole.Med.* 9, 499-502.
- Akisawa, N., Nishimori, I., Miyaji, E., et al, 1999. The ability of anti-carbonic anhydrase II antibody to distinguish autoimmune cholangitis from primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *J.Gastroenterol.* 34, 366 - 371.
- Gordon, S.C., Quattrociochi-Longe, T.M., Khan, B.A., et al, 1995. Antibodies to carbonic anhydrase in patients with immune cholangiopathies. *Gastroenterology.* 108, 1802 - 1809.
- Kino-Ohsaki, J., Nishimori, I., Morita, M., et al, 1996. Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjögren's syndrome. *Gastroenterology.* 110, 1579-1586.
- Okazaki, K., Uchida, K., Ohana, M., et al, 2000. Autoimmune-related pancreatitis is associated with autoantibodies and Th1 / Th2-type cellular immune response. *Gastroenterology.* 118, 573-581.

厚生労働科学研究費補助金（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ステロイド中断後の予後に及ぼす因子の解析

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：ステロイド治療が奏効し、プレドニゾロン 2.5～5mg/日まで減量し、6ヶ月以上ALT正常が持続したAIH7例（男性1例、女性6例）を対象にステロイドの中断あるいは減量を試みるケースシリーズ研究を行った。ステロイド中断例4例中3例（75%）で再燃がなかった。ステロイド減量例3例中1例（33%）で再燃がなかった。全体として、7例中4例（57%、95%信頼区間20-94%）で再燃がなかった。再燃例と非再燃例の診断時検査成績を比較すると、非再燃例は病悩期間が短く、T-Bil値が高く、AST、ALT値が高く、IgG値が低い傾向が認められた。したがって、再燃例は慢性肝炎型発症、非再燃例は急性肝炎型発症例が多かった。再燃例3例は再燃時期が中断後平均37±16日（2例が28日、1例が56日）であり、プレドニゾロン5から10mg/日で再正常化に成功した。今後QOLの改善、さらに副作用の低減のために、ステロイド中断が可能な症例を予知する因子の解析のため多数例を対象にした研究が望まれる。

共同研究者

柴田 実 1)

1) NTT東日本関東病院消化器内科

A. 研究目的

自己免疫性肝炎 autoimmune hepatitis (以下AIH) は慢性の疾患であるが、ステロイドが奏効し、ステロイド減量後少量を投与続けることで正常の肝機能を維持できる症例が多い。ステロイドの長期投与による骨粗鬆症、糖尿病、などの風作用の出現を考えると、中断が可能な例では、中断すべきである。しかし、中断後の再燃は避ける必要がある。欧米の報告では、治療を中断すると半年以内に50%で、3年以内に70～86%で再燃が認められる¹²³。

そこで、ステロイド中断後の再燃および非再燃を規定している因子を明らかにすることが必要となる。本研究はAIH症例でステロイド中断を試み、中断後のアウトカムを規定している因子を明らかにする目的で行われた。

B. 研究方法

1) 対象および研究デザイン

対象はステロイド治療が奏効し、プレドニゾロン (PSL) 2.5～5mg/日まで減量し、6ヶ月以上ALT正常が持続したAIH7例（男性1例、女性6例）である。年齢は平均53.9±10.7歳(40～72歳)。

研究デザインはケース・シリーズ研究である。

2) 方法

PSL 2.5mg/日の4例ではPSL中断：4例
PSL 5mg/日の3例ではPSL 2.5mg/日に減量し、2週毎にT-Bil, AST, ALTを測定した。

トランスアミナーゼが正常値上限の2倍以上の上昇を再燃と定義した。

再燃例は PSL 5mg/日に増量し、ALT 正常化すれば PSL 5mg/日で維持した。ALT の改善がなければ、2週毎 PSL を5mgずつ増量し、正常化するまで増量し

た。

ステロイド中断・減量後の経過観察期間は現時点で全例1年以上である。

名義変数の比較は χ^2 乗検定、連続変数の比較は Wilcoxon rank-sum testで行った。

C. 結果

ステロイド中断例4例中3例（75%、95%信頼区間33-100%）で再燃がなかった。ステロイド減量例3例中1例（33%、95%信頼区間0-87%）で再燃がなかった。全体として、7例中4例（57%、95%信頼区間20-94%）で再燃がなかった（表1）。

表1. ステロイド中断・減量例と再燃の有無

	再燃あり	再燃なし	合計
全体	3例 (43%)	4例 (57%)	7例
PSL 中断群	1例 (25%)	3例 (75%)	4例
PSL 減量群	2例 (66%)	1例 (33%)	3例

再燃例と非再燃例の診断時検査成績を比較すると、非再燃例は病悩期間が短く、T-Bil値が高く、AST、ALT値が高く、IgG値が低い傾向が認められた（表2）。したがって、再燃例は慢性肝炎型発症、非再燃例は急性肝炎型発症例が多かった。

再燃例3例は再燃時期が中断後平均37±16日（2例が28日、1例が56日）であり、中断直前トランスアミナーゼはAST：27±6 IU/L、ALT：22±5 IU/L、再燃時トランスアミナーゼはAST：73±25 IU/L、ALT値：70±25 IU/Lであった。再治療の奏効率は100%で、PSL投与量：6.6±2.9 mg/日（2例が5mg/日、1例が10mg/日）であった。

表2. 再燃例と非再燃例の比較

	再燃例	非再燃例	P
年齢 (歳)	56±6	52±14	0.734
性 m:f	0:3	1:3	0.350
病期期間 (年)	5.7±4.6	2.8±1.7	0.054
診断時成績			
T-Bil (mg/dL)	0.8±0.3	9.4±9.5	0.189
AST (IU/L)	153±29	854±458	0.154
ALT (IU/L)	128±27	1,039±604	0.093
IgG (mg/dL)	3,592±1,163	2,644±1,023	0.705
ANA +ve	3 (100%)	2 (50%)	0.147
AIH スコア	20±3	15±2	0.525

D. 考察

本研究から、AIHでプロドニゾロン一日量5mgまたは2.5mgまで減量可能で、これらの用量で血清アミノトランスフェラーゼが正常値を維持できる症例では、ステロイド中断・減量後すくなくとも1年間は再燃のない症例が57%あることが示された。さらに、非再燃例は、診断時の血清アミノトランスフェラーゼ値、血清総ビリルビン値がより高値で、血清IgG値が低く、病期期間が短い傾向が認められた。再燃例では、再燃後プレドニゾロンを一日治療5mgあるいは10mgまで増量することにより、すみやかに正常化が可能であった。

AIH症例の大部分はコルチコステロイド、あるいはアザチオプリンに反応し、肝機能の大幅な改善が得られる^{4,5,6}。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⁷。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%であることが報告されている⁸。また、中央値62歳のAIH患者を対象とした研究では、5年生存率が64%と報告されている⁹。わが国でも、3年生存率が90%という報告がある¹⁰。

したがって、AIHの予後は良好といえるが、今後QOLの改善、さらに副作用の低減のために、ステロイド中断が可能な症例を予知する因子の解析のため多数例を対象にした研究が望まれる。

E. 結論

1. PSL中断/減量後に43%で再燃を認めた。
2. 再燃率は中断群が25%、減量群が66%であった。
3. 再燃例は慢性肝炎型発症、非再燃例は急性肝炎型発症例が多かった。
4. 再燃例の方が病期期間が長く、抗核抗体陽性が多く、診断時AIHスコアが高い傾向が認められた。
5. 再燃は中断/減量から1~2ヶ月後に認められた。
6. 2週毎に採血し、ALTが正常上限の2倍以上に上昇したら直ちに再治療すると、PSL 5-10mg/日で治療が可能であった。

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
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

文献

- ¹ Czaja AJ. Treatment of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis.* 2002;22:365-78.
- ² Heneghan MA, McFarlane IG: Current and novel immunosuppressive therapy for autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2002;35:7-13.
- ³ Czaja AJ, Menon KV, and Carpenter HA: Sustained remission after corticosteroid therapy for type 1 autoimmune hepatitis: a retrospective analysis. *Hepatology.* 2002;35:890-7.
- ⁴ Krawitt EL: Autoimmune hepatitis [see comments]. *N Engl J Med* 1996; 334:897-903.
- ⁵ Czaja AJ: Drug therapy in the management of type 1 autoimmune hepatitis. *Drugs* 1999; 57:49-68.
- ⁶ 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.
- ⁷ Toda G, Zeniya M, Watanabe F, Imawari M, Kiyosawa K, Nishioka M, Tsuiji 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.
- 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 1 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.

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

自己免疫性肝炎の予後調査と複数回肝生検施行例の検討

研究協力者 渡部 幸夫 国立相模原病院 内科医長

研究要旨：本研究では、国立病院肝疾患政策医療ネットワーク参加施設で行った自己免疫性肝炎（AIH）の予後調査についての224例の解析である。慢性肝炎の186例中、9例（4.8%）が肝硬変に進展した。この進展に影響した要因について、グルココルチコイド（PSL）剤の治療内容、反応性、経過中の肝機能再燃などについて検討した結果、初期PSL治療で完全寛解が得られることと、治療経過中に3回以上の肝炎再燃を起こさない点が肝硬変への進展を抑制する因子として有意であった。

AIHではPSL治療とその反応性で予後が左右されるため、治療前と治療中に複数回の肝生検を施行した29例について検討した。2回の肝生検の間でPSL治療を行わなかった11例では組織所見4項目のうち、繊維化は大半が進行するかもしくは同程度で推移したがグ鞘炎やpiecemeal necrosis、小葉炎などの炎症所見は自然改善する例も散見される。一方、PSL治療で完全寛解が得られ、再燃のない10例では4項目とも改善し、治療開始早期から炎症所見（グ鞘炎や小葉炎）が、遅れて繊維化の改善があり、時間的な差が明らかであった。いずれも明らかな改善は1年ないし1年半以上を要する。PSL治療で寛解・再燃のある12例では、各因子とも悪化改善が混在していた。

AIH長期治療において肝機能検査成績のみで判断せず、経過を追って肝生検を施行し、肝組織所見改善の程度を十分に把握して、PSL投与量や中止などの治療方針を決定すべきである。

A. 研究目的

最近、自己免疫性肝炎（AIH）は長期予後の良い疾患と考えられてきているが、必ずしもそうではない。寛解が得られると治癒したかのように思われるが、後に再燃を繰り返し肝硬変に進展していく症例も少なくない。長期予後を考慮すると、プレドニゾロン（PSL）を代表とする免疫抑制剤の選択や投与量について、症例個々の適切量を検討する必要がある。さらに再燃時の投与量決定の判断は容易ではない。また、長期完全寛解した例の治療中止時期も未だ具体的の方針が決定されていないのが現状である。AIH初期治療は肝機能検査成績の重症度で漠然と決められているに過ぎない。よりの確かな治療を行うためには何を指標とすべきかについて解析する目的で、今回は治療に連動して変化する肝機能検査成績と肝組織上の変化を詳細に把握することとした。

B. 研究方法

対象と方法：国立病院療養所肝疾患政策医療ネットワークにおいて、1998年からAIH症例の新規登録調査を4回行い、既に382例が集計された。このAIHを対象に平成14年11月、22の関連病院にAIH予後調査を依頼した。AIH予後調査には初診日からの通院治療状況や最終受診日の治療内容と肝機能寛解状態の有無、そして最終受診時頃の肝病態は慢性肝炎か肝硬変かなどについて調査した。

今回の調査で、治療前と経過中に2回以上の肝生検を施行した例について問い合わせた。各施設にも小数例に施行されていたが、最も多くの複数回肝生検を行っていた国立病院長崎医療センターと当院の症例について治療を含めた臨床経過と肝生検所見を対比し

た。

PSL治療の有無と治療経過について、3群に分類した。①PSL未治療11例、②PSL治療で完全寛解し、再燃のない10例、③PSL治療で寛解と再燃のある12例とした。肝組織所見は国立長崎医療センターで以前から使用されていた方法に準じた。肝組織をfibrosis、グ鞘炎、piecemeal necrosis、小葉炎の4項目について所見の強弱を0～4の5段階評価した。たとえばfibrosisでは0は正常、5は肝硬変である（表1）。剖検2例を含む総肝生検数は64検体（平均2.2回/1例）で、臨床経過の観察期間は7.2±5.3年（中央値5.9年）であった。肝生検間隔の中央値は各群それぞれ①1.3年、②1.8年、③4.3年であり、寛解と再燃のある例で長かった（表2）。

C. 研究結果

1. AIHの予後調査

なるべく純粋のAIH予後を調査するため、C型肝炎合併例（HCVRNA陽性）を除外し224例が集計された。男女比は1：11で、年齢は55.0±13.3歳であった。通院状況は67%が現在通院中で、15%が診療を自己中断していた。診療中断は、PSL治療中断のための急性増悪を危惧される。

全経過中PSL治療は78%に投与され、未投与49例中31例（63%）にUDCAが、5例にSNMCが投与されていた。肝病態は治療開始時、慢性肝炎が186例（85%）で、そのうち肝硬変への進展増悪が9例（4.8%）に見られた。当初から肝硬変であった例は33例（15%）で、劇症肝炎が2例にあった。死亡は9例で、慢性肝炎例で5例と最も多いが、この死因は肺炎などの感染症を含むすべて他病死であった。肝硬変で肝不全死1

例、劇症肝炎による肝不全死2例であった。HCCは2例あり、いずれも肝炎ウイルスは陰性でAIHによる発癌と考えられたが死因には関与していない(表3)。次に、慢性肝炎から肝硬変に進展した例の治療内容を検討した。肝硬変に悪化する例は、発症初期のPSL初回治療に対する有効性において完全寛解でない例と、3回以上の再燃がある例に有意に進展が見られた。

2. 複数回肝生検例について

①PSL未治療11例には、発症初期にAIHの確定診断がつかず、経過観察中に再燃してPSL治療となった例が多く含まれているが、中には発症時に経過や肝組織所見から非ABC型急性肝炎と考えられた例も含まれていた。各症例の経過を示す。大きい星印はAST/ALTが300以上か、T.Bil 3.0以上の肝炎増悪を示し、小さい星印はそれ以下での肝炎増悪を示した。矢印は肝生検を示した(図1)。

未治療例の肝組織所見のうちfibrosisは7例が悪化し、改善は1例のみであった。グ鞘炎やpiecemeal necrosis、小葉炎については悪化する例や改善する例があった。PSL未治療のAIHでも自然寛解し、肝組織も改善する点が注目されるが、多くは後に再燃していた(図2、図3)。

②PSL治療で完全寛解し、2回の肝生検の間隔では再燃のない10例の経過を示す(図4)。肝組織の推移については、fibrosisは0から1への悪化の1例を除き、大半が改善していた。しかし、改善を認める時期については1年以降、多くは1年6ヶ月以降であって、いずれも1までの改善となっており、完全にfibrosisが消失することはない。短い期間ではfibrosisには変化が

ない。一方、グ鞘炎やpiecemeal necrosis、小葉炎はすべて改善し、時期的にも治療開始して1年未満の早期から改善が認められる。しかし、炎症所見も完全消失には1年以上は必要である。1回目の肝生検で炎症の強い例において数年間の治療後も炎症が完全消失せずわずかに残存する症例については、今後もPSL治療を継続する必要があるか否かを、検討する必要がある(図5、図6)。

③PSL治療で寛解、再燃のある例と持続肝炎の12例の経過を示した(図7)。肝組織所見ではFibrosis、グ鞘炎、piecemeal necrosis、小葉炎すべてに改善例や悪化例が混在し、数年を経て肝生検を行った長期例でも、明らかな改善のない例が目立つ。改善後に悪化する例もある(図8、図9)。

肝組織所見の4つの項目について、1回目と2回目の肝生検所見の平均値を比較した。PSL未治療群では4項目とも悪化し、特にpiecemeal necrosisにおいて悪化が目立つが、有意差はなかった。完全寛解例では4項目ともPSL治療で有意に改善し、特にpiecemeal necrosisと小葉炎の改善が顕著であった。寛解再燃例ではグ鞘炎とpiecemeal necrosisで改善があったが、fibrosisなどは有意に改善していない。寛解再燃群は完全寛解群と比べて、明らかに肝組織の改善は乏しい(図10)。

肝組織所見における4つの項目間の相関関係を検討した結果、グ鞘炎とpiecemeal necrosisにおいて最も関連性があった。肝硬変への進展に強く関与するfibrosisについてはpiecemeal necrosisと関連があった。

PSL治療と経過による分類

- ① PSL未治療例 (11)
- ② PSL治療で完全寛解し、再燃のない例 (10)
- ③ PSL治療で寛解・再燃のある例 (12)

肝組織の分類(国立病院長崎医療センター)

fibrosis	グ鞘炎	piecemeal necrosis	小葉炎
0	0	0	0
1	1	1	1
2	2	2	2
3	3	3	3
4	4	4	4

表1. PSL治療の有無とその有効性による分類

症例数	29 例
男女比	4 : 25 (女性86.2%)
年齢	56.0±12.2 歳
観察期間	7.2±5.3 年(中央値5.9年)
肝生検回数	64回 (2.2回/例)
腹腔鏡回数	34回 / 24例 (1.6回/例)
医療機関	国立長崎医療センター19例 国立相模原病院 10例

表2. 複数回肝生検例の対象

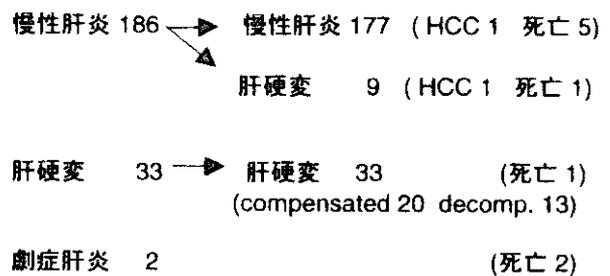


表3. AIHの初期病態と最終病態への進展

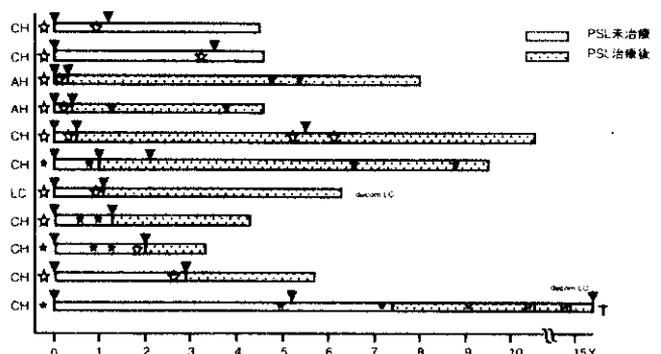


図1. PSL未治療例 (11例)