

図2. PSL未治療例(11例)の肝組織の推移(その1)

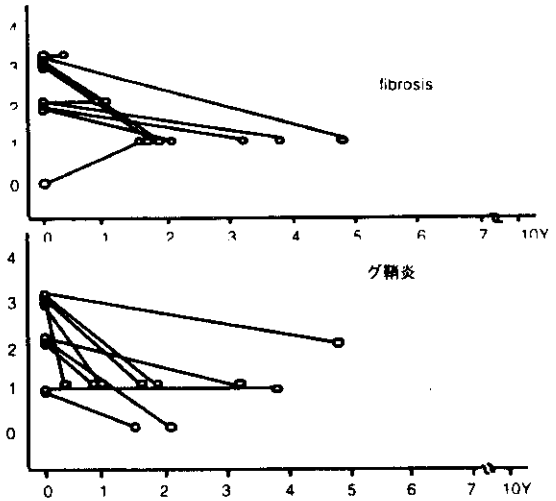


図5. 完全寛解し再燃のない例(10例)の肝組織の推移(その1)

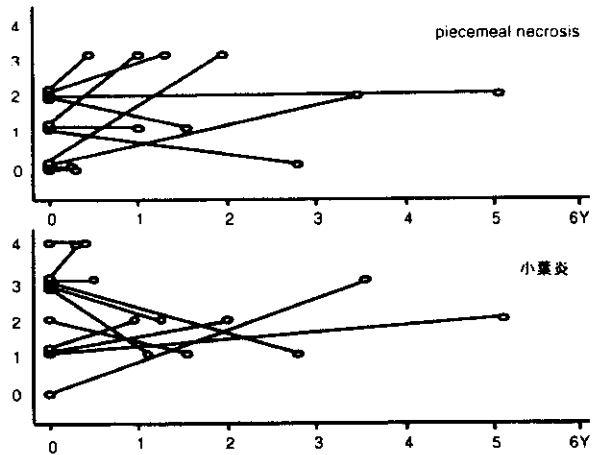


図3. PSL未治療例(11例)の肝組織の推移(その2)

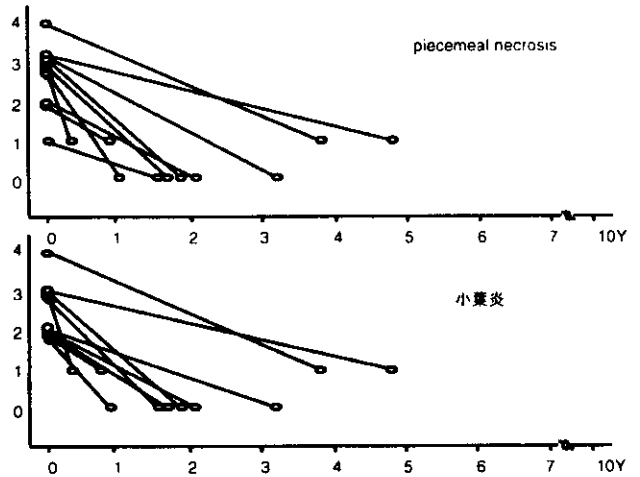


図6. 完全寛解し再燃のない例(10例)の肝組織の推移(その2)

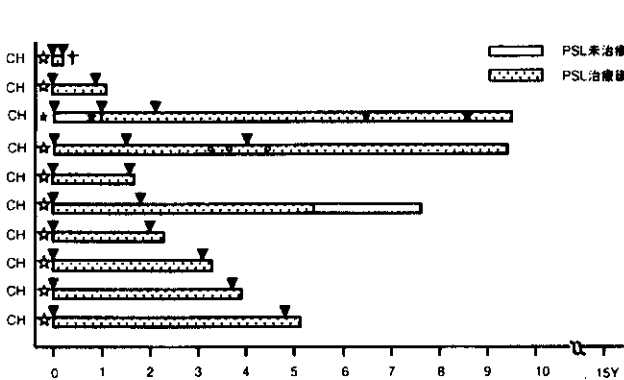


図4. 完全寛解し再燃のない例(10例)

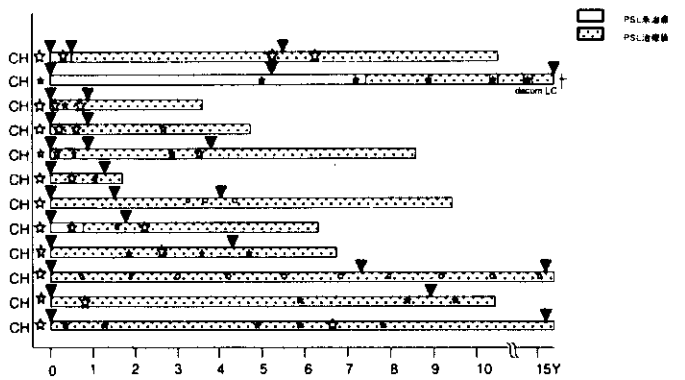


図7. 寛解・再燃のある例(12例)

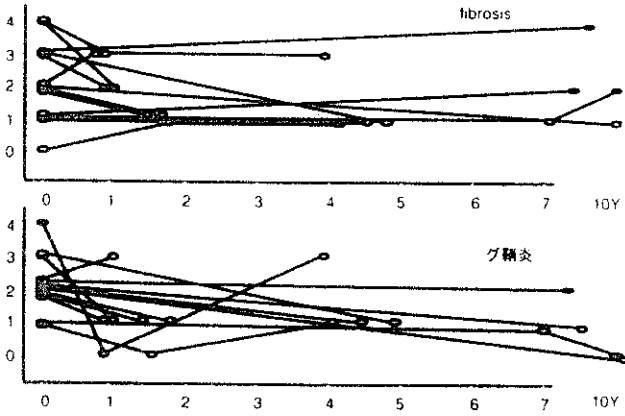


図8. 寛解・再燃のある例(12例)の肝組織の推移 (その1)

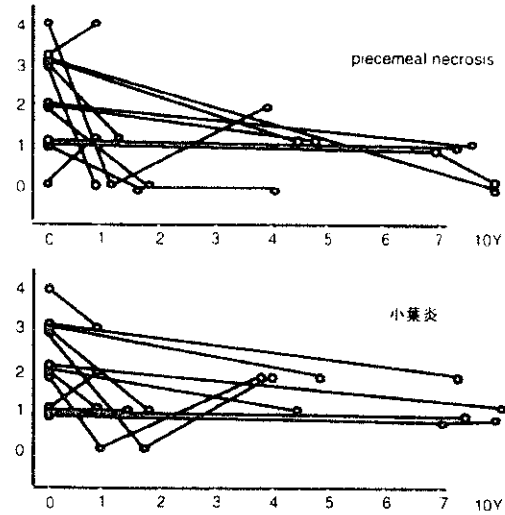


図9. 寛解・再燃のある例(12例)の肝組織の推移(その2)

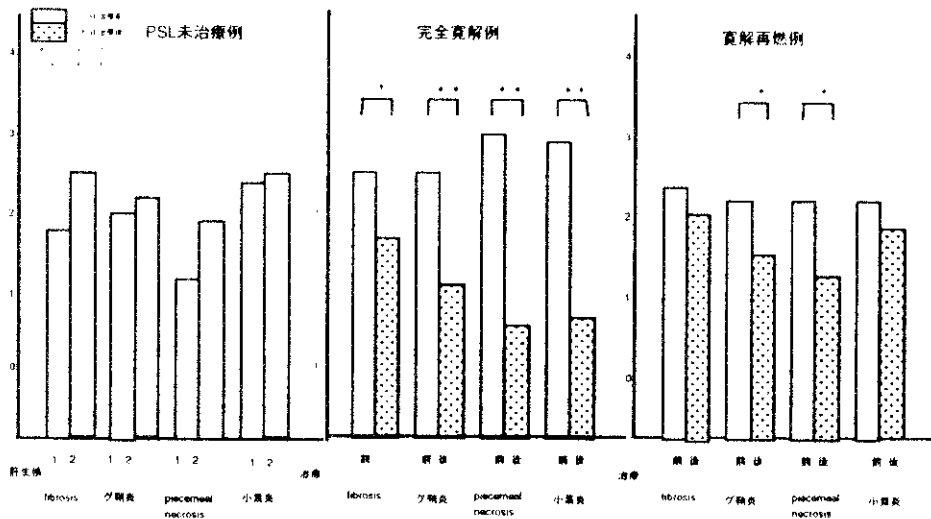


図10. PSL治療と肝組織変化

D. 考案

AIH治療について、初期治療では十分量のPSL剤を用いて、できるかぎり完全寛解をめざすべきであると思われる。完全寛解が得られると明らかに肝組織の繊維化や炎症所見が改善する。治療経過中数回以上の再燃は、肝硬変への進展が危惧される例もあるため、治療中に肝生検を行い、肝組織における繊維化や炎症の程度を十分把握したうえで、再燃時のPSL増量や他の免疫抑制剤の使用を決定すべきである。さらに治療による繊維化の改善と炎症の改善には時間的なずれがあることも十分考慮して対応しなければならないと思われる。

E. 結論

自己免疫性肝炎の長期予後を考えるとき、肝炎再燃時のPSLの投与量や長期寛解のためPSL治療の中止終了を決定するときには可能な限り肝生検を行い肝組織

中のfibrosisや各炎症程度を把握して治療にあたるべきである。副作用もあるため、病態に合わせてより適切にPSL投与を行うべきである。多施設共同で多数の治療経過と肝組織変化を集計し、治療の基本的指針をもう少し具体的に作成することが求められる。肝機能検査成績のみで治療を左右することは危険で、一部の肝硬変への進展を防止できない。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし

G. 研究発表

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

難治性の肝疾患に関する研究

主任研究者 戸田剛太郎 東京慈恵会医科大学消化器肝臓内科 教授

[目的]原発性胆汁性肝硬変(PBC)の組織学的な特徴は慢性非化膿性破壊性胆管炎と最終的な胆管消失である。慢性ウイルス性肝炎(CVH)や自己免疫性肝炎(AIH)でも、種々の程度の胆管障害を伴うことがある。[方法]PBC(17例)、CVH(26例)、AIH(18例)に由来する90の胆管病変に関して、interobserver agreementを検討した。各々の疾患群から30の胆管病変を選び、そのデジタル画像から画像解析ソフトを用いて胆管病変を切り取った。これらの胆管病変画像を14人の観察者(6名の国内肝臓病理専門家、4名の北陸地方肝臓病理医、4名の北陸地方一般病理医)に送り、3つの項目に解答してもらった。(1)胆管障害の程度を軽度、中等度、高度の3段階に評価。(2)ランダムに配列されたPBCとCVHの胆管病変からPBCを診断。(3)AIHの胆管病変を破壊性胆管炎かそうでないかに分類。[結果](1)胆管障害の程度の評価に関するinterobserver agreementは“少し悪い”～“そこそこ”の一致度であった。(2)PBCの正診率は高度の胆管障害を有する病変では80%以上であったが、胆管障害の程度の軽い症例では50%以下であった。(3)AIHに由来する30の胆管病変のうち平均で9病変が破壊性胆管炎と評価された。[結論]胆管障害の程度を評価する時のinterobserver agreementと、胆管病変のみに基づくPBCの診断時のinterobserver agreementは“少し悪い”一致度であった。AIHでもPBCで見られるのと類似した胆管障害をしばしば伴うと考えられた。

分担研究者

中沼 安二 金沢大学大学院医学系研究科
形態機能病理学

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)の組織学的特徴は慢性非化膿性破壊性胆管炎(CNSDC)、肉芽腫形成、胆管消失である。その診断には肝生検などの組織学的診断が重要と考えられている。しかしながら、PBCでは種々の程度の胆管障害が肝臓内に不均一に分布する為、組織学的診断が困難なことが少なくない。

慢性ウイルス性肝炎(CVH)でも胆管障害を伴うことがある。その程度は多くの場合弱い、時に強い障害をみることもある。しかしながら、PBCとの鑑別はウイルスマーカーなどの血液検査にて容易になされる。

自己免疫性肝炎(AIH)は臨床病理学的に診断され、典型的な症例の診断は容易である。しかしながら、PBCと類似した臨床病理像を示すことがあり、PBCとの鑑別が困難なことも少なくない。更にPBCとAIHが合併したオーバーラップ症候群という概念も提唱されている。このことから、AIH症例の胆管障害の組織学的な検討はPBCとの鑑別やPBCとの合併を評価する上で重要と考えられる。実際、CNSDCに類似した胆管障害の有無はAIHの診断基準の1つに含まれている。今回我々はPBC、CVH、AIHに由来する胆管障害の組織学的評価に関するinterobserver agreementについて検討した。

B. 研究方法

観察者は14名の医師で、6名の国内肝臓病理の専門

家(向坂彰太郎、福岡大学内科;鹿毛政義、久留米大学病理;前山史朗、聖マリアンナ医科大学病理;山本和秀、岡山大学内科;中野雅行、国立千葉病院;島松一秀、公立八女病院病理)、4名の北陸地方肝臓病理医(原武讓二、黒部市民病院病理;原田憲一、金沢大学病理;佐々木素子、金沢大学病理;常山幸一、富山医科薬科大学病理)、4名の北陸地方一般病理医(松井一裕、富山医科薬科大学病理;海崎泰治、福井県立病院病理;内山明央、富山県立中央病院病理;黒瀬望、金沢医科大学病理)からなる。

材料は金沢大学医学部附属病院と金沢大学形態機能病理学における1993年から2002年までの症例から胆管障害を有するPBC17例、CVH26例、AIH18例の肝生検材料を用いた。AIH症例は臨床病理学的に診断され、オーバーラップ症候群を疑われた症例は含まれていない。PBCとAIH症例の全例でHCVとHBVは陰性であった。

それぞれの疾患から30の障害胆管をランダムに選び、その胆管障害像をデジタル画像で取り込み、画像解析ソフトで胆管を切り取った。その時なるべく胆管周囲組織が含まれないようにした。これら胆管のデジタル画像をCD-ROMに取り込み観察者に郵送した。観察者は画像のみを郵送し、臨床像、検査成績は提示しなかった。

PBCとCVHに由来する胆管病変に関しては、合計60の胆管病変をランダムに配列した。それぞれの胆管病変に関して胆管障害の程度を軽度、中等度、高度の3段階に評価してもらった。また、それぞれの胆管病変を“PBCに伴うもの”、“CVHに伴うもの”、“わからない”に分類してもらった。

AIHの胆管病変に関しては、30の障害胆管の程度を3段階に分類してもらった(上述)。さらに、各々の胆

管障害像を“破壊性胆管炎と考えられる”、“慢性肝炎に伴うものと考えられる”、“わからない”に分類してもらった。

次に述べる3つの項目に関してinterobserver agreementを検討した。1つ目は胆管障害の程度の評価。2つ目は障害胆管のみに基づくPBCの診断。3つ目はAIHの胆管病変の破壊性胆管炎との評価に関するものである。Interobserver agreementは一致率(%)と κ 値で解析した。 κ 値の解析は以前の報告に準じた(0.20以下, “悪い”: 0.21-0.40, “少し悪い”: 0.41-0.60, “そこそこ”: 0.61-0.80, “良い”: 0.80-1.00, “非常に良い”)。

C. 研究成果

1. 胆管障害の程度評価

胆管障害の程度評価に関するinterobserver agreementを表1に示す。一致率は58.8%~71.3%で、北陸一般病理医の一致率は国内肝臓病理専門家に比して有意に高かった。 κ 値は0.328~0.522で、北陸一般病理医の κ 値は国内肝臓病理専門家と北陸肝臓病理医に比して有意に高かった。

2. PBCの診断

表2にそれぞれの観察者の正診率を示す。正診率の平均は61%~72%で、国内肝臓病理専門家で最も高かった。PBCの胆管障害の程度に分けて正診率を検討すると、高度の胆管障害を有する症例の正診率は80%以上であったが、軽度の胆管障害のみの症例では50%以下の正診率であった(表3)。PBC診断に関するinterobserver agreementは一致率が67.2%~70.9%で、 κ 値が0.333~0.413で、“少し悪い”~“そこそこ”の一致度に相当した(表4)。

3. AIHに伴う胆管病変の評価

それぞれの観察者により破壊性胆管と評価された胆管病変数を表5に示す。2名の国内肝臓病理専門家は全病変を非破壊性胆管炎と評価した。他の観察者は30病変中6~18病変を破壊性胆管炎と評価した。破壊性胆管炎と評価した観察者の割合と、その病変数を表6に示す。半数以上の(7名以上)の観察者が一致して破壊性胆管炎と診断された病変は7病変あり、その内2病変は10名の観察者に破壊性胆管炎と評価された。AIHの胆管病変を破壊性胆管炎と評価する時のinterobserver agreementを表7に示す。一致率は65.6%~71.1%であった。 κ 値は0.119~0.363となり国内肝臓病理専門家で有意に低かったが、これは全病変を非破壊性胆管炎と評価した2名の観察者に起因していた。

表1 胆管障害の程度評価に関するinterobserver agreement

	国内 肝臓病理専門家	北陸 肝臓病理医	北陸 一般病理医
一致率	58.8%	64.1%	71.3%**
κ 値	0.328	0.360	0.522*,**

*, p<0.05 vs 国内肝臓病理専門家; **, p<0.05 vs 北陸肝臓病理医

表2 胆管病変のみに基づく原発性胆汁性肝硬変の正診率

	国内 肝臓病理専門家	北陸 肝臓病理医	北陸 一般病理医
観察者 1	60%	43%	40%
観察者 2	63%	73%	63%
観察者 3	67%	73%	63%
観察者 4	73%	73%	76%
観察者 5	80%		
観察者 6	83%		
平均	72%	66%	61%

表3 胆管病変のみに基づく原発性胆汁性肝硬変の正診率(胆管障害の程度別)

胆管障害	国内 肝臓病理専門家	北陸 肝臓病理医	北陸 一般病理医
軽度	50%	37%	42%
中等度	89%	85%	73%
高度	83%	88%	88%

表4 胆管病変のみに基づく原発性胆汁性肝硬変の診断におけるinterobserver agreement

	国内 肝臓病理専門家	北陸 肝臓病理医	北陸 一般病理医
一致率	68.3%	70.9%	67.2%
κ 値	0.374	0.413	0.333

表5 破壊性胆管炎と評価された自己免疫性肝炎の胆管病変数(合計30病変)

	国内 肝臓病理専門家	北陸 肝臓病理医	北陸 一般病理医
観察者 1	12 病変	14 病変	18 病変
観察者 2	11 病変	10 病変	12 病変
観察者 3	9 病変	8 病変	11 病変
観察者 4	7 病変	8 病変	6 病変
観察者 5	0 病変		
観察者 6	0 病変		
平均	6.5 病変	10.0 病変	11.8 病変
割合	21.7%	33.3%	39.2%

表6 破壊性胆管炎と診断した観察者数と、破壊性胆管炎と評価された病変数の関係

観察者数	10 名	7-9 名	4-6 名	1-3 名
病変数	2/30	5/30	9/30	10/30

表7 自己免疫性肝炎の胆管病変を破壊性胆管炎と評価する時のinterobserver agreement

	国内 肝臓病理専門家	北陸 肝臓病理医	北陸 一般病理医
一致率	70.0%	71.1%	65.6%
κ 値	0.119	0.363*	0.309*

*, p<0.05 vs 国内肝臓病理専門家

D. 考察

胆管障害の程度評価に関するinterobserver agreementは“少し悪い”~“そこそこ”の一致度に相当した。特に北陸一般病理医で一致度が有意に高かったが、その理由は特定できなかった。

胆管病変のみに基づく、PBCの正診率は40-83%(平均66.4%)であった。高度の胆管障害を有する症例で

はその正診率は80%以上と高かったが、軽度の胆管障害のみの症例では正診率は50%以下と低かった。

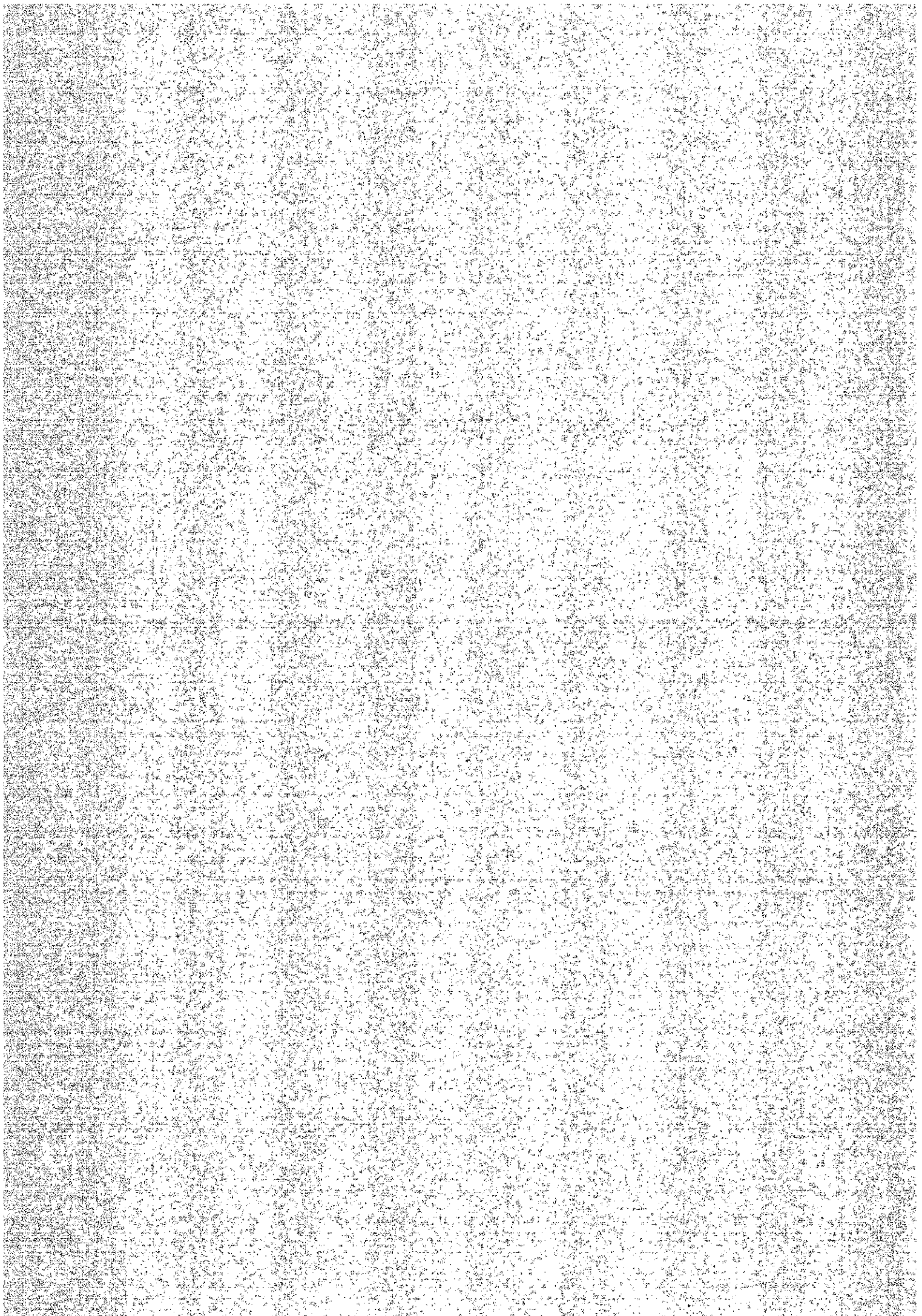
このことより、高度の胆管障害を有するPBC症例は胆管障害像のみでの診断が可能な例が多いが、軽度の胆管障害しか伴わない症例では胆管障害像以外の組織所見がその診断に重要と考えられた。実際、PBCでは胆管障害以外にも肉芽腫形成、胆管消失、慢性胆汁うっ滞所見などの胆管障害以外の組織所見も良く知られている。逆に、胆管障害が弱いだけではPBCを否定することは出来ず、他の組織所見を探す必要があると考えられる。

今回の実験で用いたAIH症例は臨床病理学的に診断され、オーバーラップ症候群を疑われた症例は含まれていなかった。にもかかわらず、30病変中平均で9の胆管病変が破壊性胆管炎と評価された。この結果より、CNSDCと類似した胆管障害がAIHでも出現しうることが示唆される。また、PBCとAIHの鑑別、PBCとAIHの合併に関しては、胆管病変のみで評価することは困難であると考えられ、PBCの組織学所見(上述)や、confluent necrosis、強い実質炎、形質細胞浸潤などのAIHの組織所見を総合的に検討する必要があると考えられた。

E. 結論

今回の実験で、胆管障害の評価に関する interobserver agreementは“少し悪い”に相当した。胆管障害像のみに基づくPBCの診断は、その程度の弱い症例では困難であると考えられた。また、AIHでもPBCで見られるのと類似した胆管障害像がしばしば認められると考えられた。

II-2. 自己免疫性肝炎に関する研究



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

国際共同研究にもとづいた日本人自己免疫性肝疾患の特性

研究協力者 石橋 大海 国立病院長崎医療センター 臨床研究センター長

研究要旨：本研究の目的は、世界各国間でみられる自己免疫性肝疾患の罹患頻度、病像の相違を明らかにすることにより、日本人にみられる本疾患の特性を明らかにすることである。そのために、国内とともに海外の研究者にアンケート調査を依頼し、登録患者について患者プロフィールを共通のプロトコールに従って記入して頂き、調査項目について統計処理を行い比較検討した。研究者間での診断基準の相違や患者背景の偏りを排除するために、同一時期に診た患者について同一の基準にて診断した症例を対象とした。自己免疫性肝疾患の罹患頻度や病像・病型は各国間で大いに異なった。日本人の自己免疫性肝疾患の特性としては、他の国に比較し原発性胆汁性肝硬変が自己免疫性肝炎よりも多く、早期あるいは無症候性の症例が多くを占めた。日本における自己免疫性肝疾患の認識および診断能力の高さや診断のための環境が整っていることが推察された。しかし、国内における地域別の頻度の差の理由については不明であった。

共同研究者

戸田剛太郎（『難治性の肝疾患』研究班、日本内科学会）、西岡幹夫・森實敏夫（日米自己免疫性肝疾患会議）、矢野右人・酒井浩徳・渡部幸夫（国立病院・療養所）、竹越國夫、元雄良治（認定内科専門医会）

海外共同研究者

Gershwin M.E.(米国カリフォルニア大学)

自己免疫性肝疾患(AILD)とは、自己免疫性肝炎(AIH)、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、原発性硬化性胆管炎(PSC)を基本とするが、AIH-PBC overlap、Autoimmune cholangitis、AMA陰性PBC、AIH-PSC overlapなどの境界領域やオーバーラップ症例も含めた。

疾患の罹患頻度は、同期間に同医療施設に受診したB型慢性肝疾患(HBsAg陽性またはHBcAb x200)90%陽性)およびC型慢性肝疾患(HCV-RNA陽性またはHCV抗体陽性)症例数と比較した。

調査期間は2001年2月1日より2001年5月31日までの4ヶ月間とし、調査票回収期限を2001年6月30日とした。

調査内容は、Questionnaire 1として、期間内に診察した自己免疫性肝疾患全員について患者を診断基準に従って診断し、調査票にその数を記入して頂いた。また、Questionnaire 2として、期間内に診察した自己免疫性肝疾患患者のプロフィールを約100項目からなる調査票に記入して頂いた。

A. 研究目的

自己免疫性肝疾患には明確な疾患マーカーが存在せず、世界各国における医療状況の相違や第一線臨床医の本疾患群についての知識の普及も異なることから、国によっては本疾患群の実態は把握されず、また、各国間における本疾患群の罹患率や病像の相違も明らかにされていない。

本研究の目的は、各国の医師が共通のプロトコールに従って同一診断基準にて同一時期にアンケート調査を行い統計学的に処理することで、各国間における自己免疫性肝疾患の罹患頻度、病像の相違を明らかにし、特に日本人における本疾患の特性を明らかにすることである。

B. 研究方法

International Autoimmune Hepatitis Groupによって提唱されたscoring systemにもとづいて作成した自己免疫性肝炎調査票を、参加の意志を示した国内および海外の施設/医師に主にe-mail(他に郵便、FAX)で送付し、一定期間にそれらの施設/医師を受診した自己免疫性肝疾患の全症例について調査票に内容を記載して頂いた。

調査票送付先は、国内は日本内科学会評議員(消化器)、認定内科専門医会(消化器)、日米自己免疫性肝疾患会議会員、国立病院・療養所・肝疾患共同研究班班員であり、国外は、各国内科学会に属している肝臓専門医で、本企画に賛同する医師であった。

C. 研究結果

1. 慢性肝疾患におけるAILDの割合

国内からの登録症例は、72施設より1,960症例であった。B型肝炎、C型肝炎関連の慢性肝疾患症例数はそれぞれ4,573例、17,602例であり、これら全慢性肝疾患症例の中でAILDが占める割合は8.1%であった。これに対し、海外では、7施設より58例の症例が登録された。B型肝炎、C型肝炎関連慢性肝疾患はそれぞれ2,122例、1,321例であり、慢性肝疾患症例の中で1.6%であった。海外の諸国間における分布の差は大きかった。

2. 日本における各県別AILD頻度

AILDの頻度は0.01%から0.22%と各県間で大いに異なっていた。

3. AILD各疾患の頻度

わが国ではAILD中約60%がPBCで30%がAIHと、

PBCとAIHの比が2:1であったが、韓国、インド、エジプトではむしろAIHが多数を占めた。

4. AIH、PBC亜型の頻度

イタリア、エジプトではⅡ型のAIHが一定の割合で認められたが、我が国ではほとんど認められなかった。

5. 無症候性、症候性AILDの割合

我が国では、PBCは無症候性が約80%を占めたが、イタリアを除く回答が寄せられた他の国では症候性がほとんどを占めた。一方、AIHはいずれの国でも症候性の方が多かったが、我が国が最も無症候性の比率が高かった。これを反映して、血清ビリルビン値、AST値も他の国に比較して我が国の症例が最も低かった。

D. 考察

我が国における自己免疫性肝疾患の認識および診断能力の高さや診断のための環境が整っていることが推察された。しかし、国内における地域別の頻度の差の理由については不明であった。

E. 結論

日本人の自己免疫性肝疾患は、PBCとAIHが2:1の割合で存在し、頻度はウイルス性の慢性肝疾患の1割弱であった。他の国に比較し、早期に、無症候性の時期に発見される症例が多く、医療レベルの高さが窺われた。

F. 研究発表（学会発表）

- 1) Ishibashi Hiromi, Takegoshi Kunio, Motoo Yoshiharu, Toda Gotaro, Nishioka Mikio, Morizane Toshio, Yano Michitami: Comparison of prevalence and features of autoimmune liver diseases among various countries in the world - Japan. 26th International Congress of Internal Medicine, May 27, 2002, Kyoto.

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

小児自己免疫性肝炎の全国調査

研究協力者 松井 陽 筑波大学臨床医学系小児科教授

研究要旨：従来の自己免疫性肝炎全国集計は内科系評議員を対象に行われてきた。本研究では、小児自己免疫性肝炎の実態を明らかにするために、小児科医を対象に全国調査を開始した。医学中央雑誌文献検索による予備調査では、12年間で56例の報告があり、診断、治療の両面において小児の特殊性が浮かび上がった。第1回の全国調査（1次調査）により2001年度に新たに発症した新規症例は約20例存在することが判明した。今後、これらの症例を集積し、小児自己免疫性肝炎の診断治療の問題点を明らかにする必要がある。

共同研究者

須磨崎 亮 筑波大学臨床医学系小児科助教授
長谷川 誠 筑波大学大学院医学研究科生化系

A. 研究目的

これまで本研究班で行われてきた自己免疫性肝炎に関する全国集計の対象は、肝臓東西部会内科系評議員が属する医療機関であり、小児科で診療している症例はほとんど調査対象に含まれていなかった。しかし、日本小児栄養消化器肝臓病学会では毎年のように自己免疫性肝疾患に関する演題が並んでおり、論文報告も決して少なくはない。欧米では小児の自己免疫性肝炎についてのまとまった報告もあるが、本疾患は人種差も明らかであり、本邦の小児の自己免疫性肝炎について、とくに診断、治療、予後評価の面で実態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 文献検索レビュー

1990年から2002年までに発表された18歳以下の自己免疫性肝炎の報告（会議録も含む）について、国内医学文献情報データベース（医学中央雑誌）を用いて検索した。

2. 全国調査（1次調査）

2001年1月1日から2001年12月1日の1年間に、新規に診断された18歳以下の自己免疫性肝炎の症例について、全国の大学病院小児科、小児病院内科および300床以上の総合病院小児科（計638施設）を対象としてアンケート調査（1次調査）を実施した。現在、2次調査を進めている。

（倫理面への配慮）

全国の症例を集積する段階で、個人を特定できるような情報ははじめから含まれないようにし、本研究の中で対象患者が診療において不利益を蒙ることのないように配慮した。

C. 研究結果

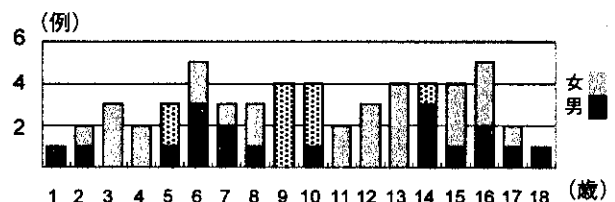
1. 医学中央雑誌で検索した結果、該当文献数は105あり、うち、疑診例や重複発表例を除外した計56例についてまとめた。男女比、年齢分布は図1に示す通

りで全年齢にわたっていた。IgG 2,000mg/dl未満が約20%、自己抗体価40倍以下が約10%の症例でみられた。自己抗体による分類は大部分が1型であったが、2例でANAまたはSMAと同時にLKM1抗体が陽性となっていた。診断時の肝障害の程度は、すでに肝硬変に進行していたものが18%あり、劇症化例が5%にみられた。肝組織所見では、piecemeal necrosisの他に、架橋形成のみられたものが約半数と多く、亜広範性壊死、小葉中心性壊死の認められた例もそれぞれ10%程度あった。治療への反応は、記載のあった範囲では、PSL単独やAZP併用の継続にもかかわらず約3分の1が再燃していた。さらに、治療にかかわらず肝硬変に進行したものが4例、肝細胞癌で死亡が1例、年余に及ぶ経過観察で最終的にPSCと診断され生体肝移植が行われた例が2例あった。

図1

医学中央雑誌検索レビュー結果

該当件数は105件。疑診例や重複発表例を除外した計56例（男：女=17：38）の年齢分布を下に示す。



精査理由は、肝機能異常32例、黄疸19例であった。胃食道静脈瘤破裂でみつかったものが2例あった。

2. 2002年11月に配布した全国調査1次調査（図2）は、大学小児科125施設中89施設（71.2%）、一般病院小児科513施設中315施設（61.4%）から回答が得られ、全体では63%の回収率であった。一般小児科すべてに、小児の肝疾患に専門の医師がいるわけではなく、認識がまだ十分でない可能性もあり、アンケートの解釈には注意が必要である。集積された症例は、大学小児科9施設19症例、一般小児科6施設6症例で、重複している症例を考慮すると1年間に計23症例であった。自己免疫性肝炎が疑われたが診断未確定

の症例は計7症例あった。各症例の詳細(新AIH scoring systemのスコア、病理組織像、治療法、予後)については各施設から情報が得られる見通しであり、2次調査を開始している。

図2 1次調査票(返信はがき)

小児自己免疫性肝炎1次調査

御施設
TELまたはFAX
御芳名

1 昨年1年間(200年1月1日~200年12月31日)に自己免疫性肝炎と新規に診断された症例(18歳以下)はありますか(現在は他院に転院しており経過観察されている症例や、他院から紹介され現在経過観察している症例も含む。)
はい()例 ・ いいえ

2 該当する症例は、肝生検が行われていますか
はい()例 ・ いいえ

3 同じ期間に、上記の症例の他に、自己免疫性肝疾患が疑われたが、診断未確定の症例はありましたか
はい()例 ・ いいえ

4 症例の詳細について2次調査を予定していますが、ご協力していただけますか
(協力していただける場合には、肝組織を久留米大学病理学教室 鹿毛政義教授にみていただく予定です。)
はい ・ いいえ

D. 考察

今回、新たに開始した小児自己免疫性肝炎の全国調査は、まだ2次調査が進行中であるために小児の傾向としてまとめることはできない。全国的にみても小児自己免疫性肝炎の症例数は比較的少ないため、実態を把握し、小児の診断治療の手引きを作成するために今後も数年間にわたり、この方法で症例を蓄積していく予定である。

予備調査として行なった文献検索レビューによると、日本の小児でも2型の自己免疫性肝炎はきわめて稀なものと推定される。現在浮かび上がってきている問題は、1つは診断面で、必ずしもIgGや自己抗体の高値を示さない例や最終的にPSCと診断される例など、variant例ともいえる症例が小児にかなり存在する可能性がある。さらに、原因が特定できない慢性肝炎として経過観察されている症例、もしくは発見すらされていない自己免疫性肝炎の症例がないか、症例発見のためにどのような介入が有効か、考えていく必要がある。2つ目は、その治療効果や予後がはっきり予測できない中で、PSLやAZPなどによる強力な治療を、小児期から成人期という長期にわたって、成長障害などの副作用を最小限にしつつどのように行なったらよいのか、という問題である。今後も、これらの診断治療の問題点に留意しつつ、小児自己免疫性肝炎の実態解明を継続する予定である。

E. 結論

文献検索レビューによると、成人と異なりIgGまたは自己抗体価の低い例が3割も存在し、小児自己免疫性肝炎の多様性の一端を示唆している。肝硬変進展例も比較的多く、早期発見と、治療に際しては肝病変の進行を防ぎつつ成長障害などの副作用を抑えることが重要である。また、小児自己免疫性肝炎全国調査(1次調査)により、1年間の本邦小児の新規患者数が確認できそうである。今後、全国調査により啓蒙を深めると共に症例を積み重ね、初期の臨床経過と予後との関連を明らかにし、治療法の選択に役立つ情報が得られるよう検討を続けていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

小児の自己免疫性肝炎の臨床病理像
筑波大学小児科 長谷川誠、須磨崎亮、松井 陽、
久留米大学病理学教室 鹿毛政義
第6回日本肝臓学会大会 ポスターセッション
平成14年10月24日 パシフィコ横浜

H. 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遺伝子多型の包括的解析

主任研究者 戸田剛太郎 東京慈恵会医科大学 消化器肝臓内科 教授

研究要旨：自己免疫性肝疾患の発症に関与する遺伝子多型を明らかにする目的で、自己免疫性肝炎（AIH）、原発性胆汁性肝硬変（PBC）症例のCTLA-4、IFN- γ の遺伝子多型解析を行ったところ、AIH、PBCともに健常人に比しCTLA-4のG/G遺伝子型、IFN- γ のA/A遺伝子型の発現が多く、PBCでは有意差が認められた。またPBCでCTLA-4のG/G遺伝子型、IFN- γ のA/A遺伝子型をともに有する症例の発症危険率はそれぞれ単独で有する症例に比し相乗的に高いことが明らかとなった。さらにSNPチップを用いて発症に関与する遺伝子多型の包括的ゲノムワイド解析を行なったところ、CTLA-4の遺伝子型が同じでも健常人とPBC症例では遺伝子型が異なる150個以上のSNPsが全染色体にわたり分布しており、またCTLA-4の遺伝子型に関わらず、健常人とPBC症例では遺伝子型が異なる86個のSNPsが全染色体にわたり分布していることが明らかとなった。以上よりPBCの発症にはCTLA-4の遺伝子多型と関連または独立した多くのSNPsが関与する可能性が示された。

共同研究者

銭谷幹男	東京慈恵会医科大学	内科学講座
	消化器・肝臓内科	助教授
高橋宏樹	東京慈恵会医科大学	内科学講座
	消化器・肝臓内科	助手
天野克之	東京慈恵会医科大学	内科学講座
	消化器・肝臓内科	医員

35例、G/AかA/Aの35例の検体を等量混合し各群のDNAプールを作製、Affymetrix社のGeneChip HuSNP™ Mapping Assayキットを用いてSNPsのゲノムワイド解析を行なった。このチップはヒト遺伝子全体にわたり約1~1.22 c M間隔で位置する1500個の既知のSNPsを含むオリゴヌクレオチドをプロットしたものである。

なお、本研究は厚生労働省科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」に基づいて学内倫理委員会の審査、許可を得て施行している。

A. 研究目的

自己免疫性肝疾患は、その発症にさまざまな遺伝因子、環境因子が関与する多因子疾患と考えられる。このうち遺伝因子についてはこれまでに主にHLAに関する研究がなされてきたが、近年の研究によりサイトカイン、補助分子といったHLA以外の分子の遺伝子多型が他の自己免疫性疾患の発症に関与することが明らかにされつつある。しかし自己免疫性肝疾患の発症が単一分子の遺伝子多型のみにより規定されるとは考え難く、複数の分子の遺伝子多型が総合的に発症を規定すると考えるのが妥当である。したがって自己免疫性肝疾患の発症に関与する遺伝因子を明らかにするためには、多くの遺伝子多型をゲノムワイドに包括的に解析する必要がある。そこで本研究ではSNPチップを用いてゲノムワイドな包括的遺伝子多型解析を行なった。

B. 研究方法

対象は採取検体を用いて遺伝子解析を施行することについて文書による説明と同意を得た、診断基準を満たすAIH症例51例、PBC症例101例、健常人94例である。各人の末梢血から通常の方法にてDNAを抽出し、CTLA-4のexon 1のposition 49の遺伝子多型をPCR-RFLP法により、IFN- γ のintron 1のposition 874の遺伝子多型をARMS-PCR法により解析した。さらにPBCのCTLA-4遺伝子型がG/Gの35例、G/AかA/Aの35例、健常人のCTLA-4遺伝子型がG/Gの

C. 研究結果

CTLA-4遺伝子多型の検討では、健常人（A/A：9.6%、A/G：50%、G/G：40.4%）に比しAIH症例（A/A：10.6%、A/G：38.3%、G/G：51.1%）、PBC症例（A/A：6.9%、A/G：36.6%、G/G：56.4%）と自己免疫性肝疾患でG/G型が多い傾向が見られ、PBCでは健常人との間に有意差を認めた（ $p < 0.03$, odds ratio = 1.91, CI, 1.08-3.37）。

IFN- γ 遺伝子多型の検討では、健常人（T/T：0.1%、A/T：17%、A/A：81.9%）に比しAIH症例（T/T：0.1%、A/T：21.5%、A/A：76.4%）、PBC症例（T/T：0%、A/T：34.7%、A/A：65.3%）と自己免疫性肝疾患でA/T型が多い傾向が見られ、PBCでは健常人との間に有意差を認めた（ $p < 0.01$, odds ratio = 2.40, CI, 1.29-4.49）。

また、PBCでCTLA-4遺伝子型がG/G型でなくIFN- γ 遺伝子型もA/T型でない症例の発症危険率を1とすると、CTLA-4遺伝子型がG/G型でIFN- γ 遺伝子型がA/T型でない症例の発症危険率は1.7、CTLA-4遺伝子型がG/G型でなくIFN- γ 遺伝子型がA/T型の症例の発症危険率は2.1、で、CTLA-4遺伝子型がG/G型、IFN- γ 遺伝子型がA/T型である症例の発症危険率は5.4であり、単独で有意に発現率の高い遺伝子多型で

あるCTLA-4遺伝子型のG/G型、IFN- γ 遺伝子型のA/T型を合わせ持つ症例では発症危険率が相乗的に高値を示すことが明らかとなった。

さらにSNPチップを用いた検討により、CTLA-4遺伝子型がG/G型のPBC症例と健常人では第1～22番目の染色体全てにわたり1500個のSNPのうち172個のSNPの遺伝子型が異なること、CTLA-4遺伝子型がA/A型のPBC症例と健常人では第1～22番目の染色体全てにわたり244個のSNPの遺伝子型が異なることが明らかとなった。またCTLA-4の遺伝子型に関わらずPBC症例と健常人で遺伝子型が異なるSNPは第1～22番目の染色体全てにわたり86個存在することが明らかとなった。

D. 考察

今回の検討により自己免疫性肝疾患の発症には複数の分子の遺伝子多型が相乗的に関与することが明らかにされた。またSNPチップを用いたゲノムワイドな包括的遺伝子多型解析により、発症に関与するSNPが全染色体にわたり多数存在することが明らかにされた。しかし今回のSNPチップの検討は複数の検体を等量混合したDNAプールを用いて施行したもので、あくまで疾患と健常をマスとして対比して得られた結果である。したがってPBC群と健常群で遺伝子型が異なるSNPのそれぞれがCTLA-4のG/G型やIFN- γ のA/T型のように独立して発症に関与する遺伝子多型であるかどうかは、それぞれのSNPの個々の症例における遺伝子型を再評価し統計学的検討を行なうべきで今後のさらなる検討が必要である。

E. 結論

自己免疫性肝疾患の発症には複数の遺伝子多型が関与し、それらのSNPは全染色体にわたり分布することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

学会発表

K Amano, H Takahashi et al. HLA and non-HLA genetic susceptibility factors to PBC were associated with clinical features in Japanese patients. 53rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases Boston 2002

論文

K Amano, H Takahashi et al. Synergistic effect of CTLA-4 and IFN gamma gene polymorphism on susceptibility to primary biliary cirrhosis, and its association with clinical manifestations. submitted

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

自己免疫性肝疾患境界病変の発現遺伝子プロファイルを用いた解析

研究協力者 小林 健一 金沢大学大学院がん遺伝子治療学教授

研究要旨：cDNA Microarray法を用いて多数の遺伝子の発現を包括的に解析することが可能となっている。我々が独自に開発したcDNA Microarray tipを用いた自己免疫性肝炎(AIH)と原発性胆汁性肝硬変(PBC)の検討によりこの2つの自己免疫性肝疾患は明らかに群別する事が可能であった。また、AIH-PBC境界病変についてはPBC群に含まれるものの、中でもまとまった一群としてクラスタリングされAIH,PBCとも異なった疾患群としてとらえることが可能であった。異時性にPBCからAIHを発症した症例は経時的に発現遺伝子プロファイルもPBC群からAIH群へと移行しており、診断への有用性が示された。

A. 研究目的

cDNA Microarray法による遺伝子解析の進歩により多数の遺伝子の発現を網羅的に同時に解析することが可能となった。この手法を用いることにより、分子生物学的に疾患の診断、群別化、病期診断、予後予測に極めて有用な手段となりうる。

我々は、自己免疫機序による肝疾患の遺伝子発現プロファイルを解析し、AIH, PBCまた特に境界病変の診断への有用性に関する検討を行った。

B. 研究方法

AIH12例 (international autoimmune hepatitis group によるscoreでdefinite例)、PBC12例 (AMA陽性や組織学的所見より診断)、AIH-PBC境界病変3例、正常肝9例 (Reference 1例を含む) を対象とした。

cDNA microarrayには、我々が独自に開発した1080遺伝子からなるhome-made array (Research Genetics社から購入したIMAGE cloneを日立製SPBIO2000アレイヤーにてスポットし作成) を用いた。AIH, PBCおよび正常肝組織からtotal RNAを抽出し、T7RNA polymerase promoter 配列と oligo dT配列を有するEberwine primerを用いて1回の antisenseRNA増幅を行った。全ての解析において正常肝1例より得た肝組織aRNAを対照とし、cDNAに逆転写する際にCy3にてラベルし、他の症例より得られたaRNAはCy5にてラベルした。この蛍光ラベルcDNAプローブとhome-made arrayのハイブリダイゼーションを行い、遺伝子発現量はGeneral Scanning社 Scan Array 5000にて可視化、Bio Discovery社ImaGene ver3.0にてスポットシグナルを数値化し各遺伝子の対象例に対する発現比 (Cy5/Cy3) を算出した。また階層的クラスタ解析は、Cluster & Tree View software (<http://rana.Stanford.EDU/software/>) を用いて行った。

C. 研究結果

AIH, PBC患者肝と正常肝での遺伝子発現比の階層

的クラスタ解析を全1080遺伝子につき行うことによって、AIHおよびPBCを分類することが可能であった。更に、AIH群は、A2以上F2以上が主たる活動性が高く線維化の進展したAIH-a亜群とA1F1が主たる活動性・線維化が軽度なAIH-b亜群に細分された。同様にPBC群はScheuer分類にてstage II以上が主たるPBC-a亜群とstage I以下が主たるPBC-b亜群に細分化された。興味深いことに、PBC-AIH境界病変はPBC群に含まれたが、更にその中でも全3症例がまとめてクラスタされた。(図1)

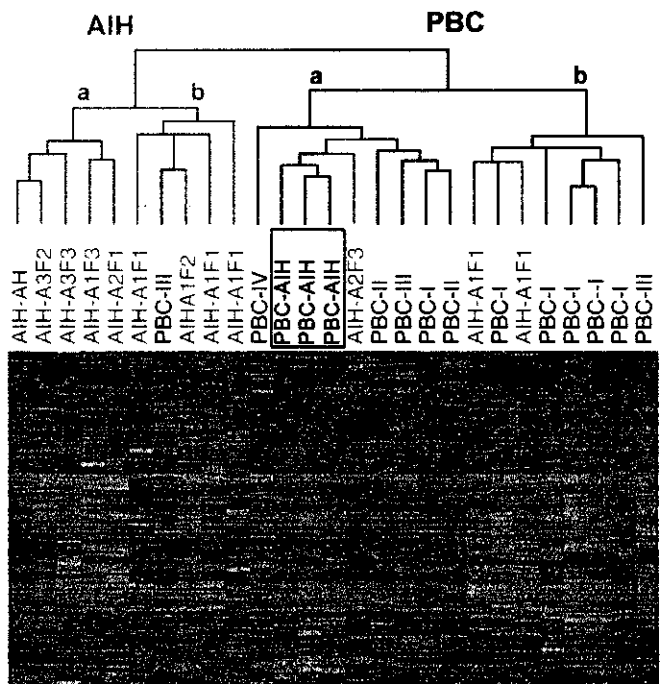


図1. クラスタ解析：AIHとPBC

1080個の遺伝子からAIHとPBCを分別するために有意に発現が異なる85個の遺伝子抽出した。得られた85個の遺伝子を用いて再度全症例をクラスタ解析したところ、AIHとPBCそれぞれの群において1例のみの例外を除いて明確に群別され、これらの遺伝

子が疾患の病態の特徴を反映していると考えられた。更にAIH-PBC境界病変の内、PBCからAIHへと異時性に発症した症例を、このクラスターの中に適合させると、PBCと診断された時点ではPBC群に含まれたものが、その後AIHと診断された時点ではクラスターでもAIH群に移行していた。(図2)

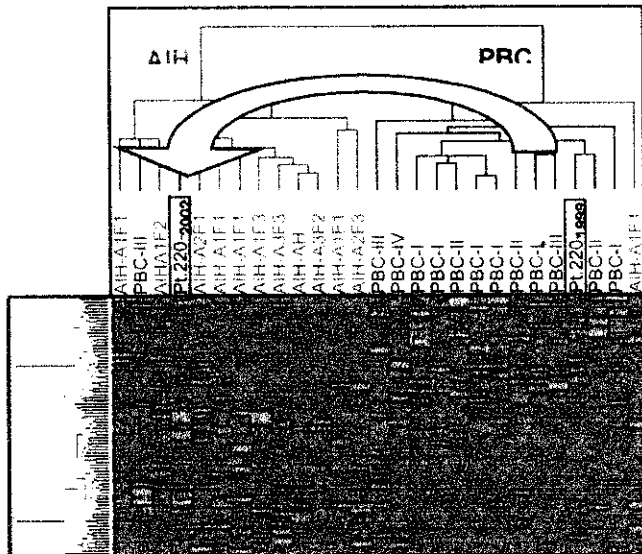


図2. PBCからAIHへの移行例

D. 考察

近年開発された cDNA Microarray 法は多数の遺伝子の挙動の情報を一度に得ることが出来、それを解析することによって、疾患の病態に迫ることが可能となっている。今回の検討から、AIH群とPBC群の遺伝子発現パターンは明らかに異なっており、群別する事が可能であった。更にAIH, PBCともに病期の進行や活動性を表す亜群に細分化することが可能であり、より詳細な各時点での疾患の状態を表していると考えられる。

これまで自己免疫性の診断は、血液生化学検査や血清学的検査、組織学的所見に基づきなされてきた。しかし、診断基準にあわない症例や境界病変など診断に苦慮することも少なくないのが現状である。また、自己免疫性肝疾患境界病変はclassicalなPBCなどと治療法など臨床上の対応が異なるため診断が重要となる。遺伝子発現プロファイリングがこの様な疾患の診断に有用か検討したところ、境界病変はAIHともPBCとも分別することが可能であった。また、異時性の発症についても各時点での病態を明確に診断することが出来た。これらから、発現遺伝子プロファイルが自己免疫性肝疾患の診断に非常に有用であると考えられた。

E. 結論

独自に開発したhome-made cDNA Microarrayを用いてAIH, PBC, AIH-PBC境界病変肝組織における遺伝子発現異常を解析した。

発現遺伝子のクラスター解析によりPBCとAIHは群別され、疾患を鑑別出来るいくつかの遺伝子を同定し得た。これらの遺伝子の発現プロファイリングは実際

の診断にも有用であることが示された。また、同一疾患の中でも活動性などにより亜群に分別できることから、今後治療効果の判定などにも用い得ると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 本多政夫、金子周一、小林健一
cDNAマイクロアレイを用いた自己免疫性肝炎及び原発性胆汁性肝硬変の解析
第88回日本消化器病学会総会 (2002年4月26日、旭川)
- 2) 本多政夫、金子周一、小林健一
自己免疫性肝炎及び原発性胆汁性肝硬変症のExpression profilingの検討
第38回日本肝臓学会総会 (2002年6月13日、大阪)
- 3) 本多政夫、金子周一、小林健一
cDNAマイクロアレイを用いた自己免疫性肝炎及び原発性胆汁性肝硬変の診断
第6回日本肝臓学会大会パネルディスカッション5 (2002年10月25日、横浜)

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

プロテインチップによるAIHとPBCの特異的蛋白の解析

研究協力者 西口 修平 大阪市立大学大学院医学研究科 肝胆膵病態内科 助教授

研究要旨：大阪市立大学付属病院にて診断されたAIH 3例、PBC 3例、AIC 2例を対象に、プロテインチップを用いて疾患特異的な蛋白の解析を試みた。AIHに共通して存在し、PBCには存在しないかあるいは発現量が少ない蛋白が14種類、逆にPBCに共通して存在し、AIHには存在しないか発現量が少ない蛋白が11種類、両者に共通して同程度の発現が認められる蛋白が13種類検出された。発現量の多いこれらの蛋白は疾患特異的蛋白の可能性があるため、一部の蛋白については、分子量と等電点の情報からTagIdentによって概当する蛋白を検索した。この結果、PBCに共通して発現している分子量9193の蛋白は Haptoglobin-1 precursor であり、AIH に共通して発現している分子量9290の蛋白は Neutrophil activating peptide 2 であると推定された。次に、AICの2例に共通して発現する蛋白を解析すると、AIHに共通する蛋白14種類中1種類が発現し、PBCに共通する蛋白11種類中10種類が発現していた。このためAICはPBCに極めて類似した蛋白発現パターンを呈することが明らかになった。

共同研究者

田守昭博 大阪市立大学 肝胆膵病態内科助手
塩見 進 大阪市立大学 核医学教授
斎藤賢治 サイファージェンバイオシステムズ
(株) 研究員

A. 研究目的

自己免疫性肝炎(AIH)と原発性胆汁性肝硬変(PBC)における疾患特異的蛋白を見出し、自己免疫性胆肝炎(AIC)などの両者の境界病変が発現蛋白パターンからどちらに類似しているのかを明らかにする。本年度は、SELDI-TOF-MSを用いた検出システムによって、血清から疾患特異的蛋白が検出可能か予備的研究を行った。

B. 研究方法

大阪市立大学付属病院にて診断されたAIH 3例、PBC 3例、AIC 2例を対象とした。それぞれの症例の治療前血清10 μ lを実験に供した。変性条件では、Urea bufferで10倍に希釈し、さらに各pHのbinding/washing bufferで10倍に希釈したものを100 μ l陽イオン交換チップ(WCX2)または陰イオン交換チップ(SAX2)に添加した。非変性条件では、PBSでfinal 100倍に希釈したものを100 μ l WCX2, SAX2, IMAC₃-Cuの各チップに添加した。非特異的結合蛋白を洗浄後、シナピン酸等をベースにしたEAM(エネルギー吸収分子=目的蛋白と共結晶を構成しレーザーのエネルギーを吸収してイオン化と固相からの脱離を行う低分子)をかけて乾燥させ、MALDI-TOF型のチップリーダーにて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究の目的、方法、患者の個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、口頭にて同意を得た。

C. 研究結果

AIH, AIC, PBCの各症例の血清を解析した結果、各症例で発現量に差がある蛋白質が複数個認められた(図1)。変性条件の方が非変性条件よりも発現量に差のある蛋白質が多く、チップ別では陽イオン交換チップ(WCX2)のpH4.5, pH6 および陰イオン交換チップ(SAX2)のpH4.5において多かった。

AIHに共通して存在し、PBCには存在しないか発現量が少ない蛋白が14種類、逆にPBCに共通して存在し、AIHには存在しないか発現量が少ない蛋白が11種類、両者に同程度の発現が共通して認められる蛋白が13種類検出された。

発現量の多い蛋白は疾患特異的蛋白の可能性があるため、蛋白の分子量と等電点の情報からTagIdentによって該当する蛋白を検索した。この結果、PBCに共通して発現している分子量9193の蛋白は Haptoglobin-1 precursor が、AIH に共通して発現している分子量9290の蛋白は Neutrophil activating peptide 2 が該当する蛋白であると推定された。AICの2例に共通して発現する蛋白を解析すると、AIHに共通する蛋白14種類中1種類が発現し、PBCに共通する蛋白11種類中10種類が発現していた。このため蛋白の発現パターンからはAICはPBCに極めて類似していた。

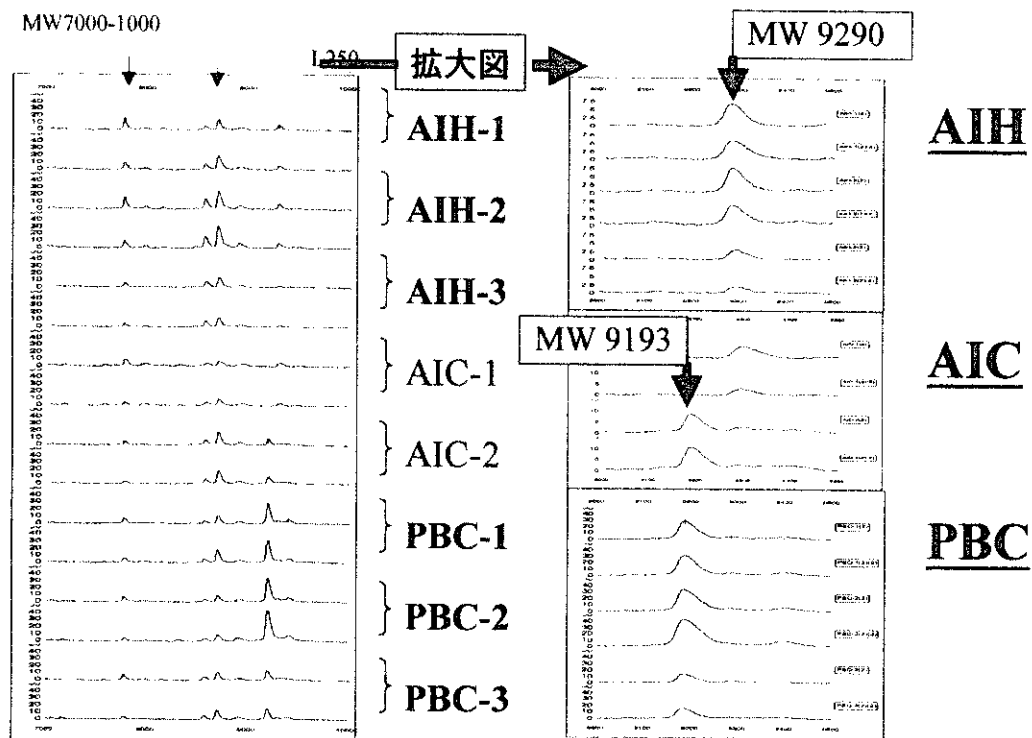


図1. 自己免疫性肝炎 (AIH)および原発性胆汁性肝硬変 (PBC)に共通して認められた蛋白 (矢印↓)。解析条件：陽イオン交換チップ (WCX2)/Urea buffer/pH4.5。

D. 考察

DNAチップを用いたAIHとPBCの発現遺伝子のプロファイリングが行われ、両疾患にそれぞれ特徴的な遺伝子発現が報告されている。しかし、細胞内のmRNAの発現量と蛋白の発現量は必ずしも一致せず、疾患特異性を検討するためには、蛋白の発現パターンを検討することが望ましい。しかし、従来の方法では、複雑な蛋白の前処理が必要であり発現蛋白を網羅的に検索することは困難である。今回我々は、SELDI-TOF-MSを用いたが、このシステムは数種類の特異的チップを用いることにより、前処理なしで特異的蛋白の解析が可能となった。今回得られたAIHやPBCに共通する蛋白は疾患特異的蛋白である可能性を秘めている。PBCの3例に共通して発現していた蛋白は線維化に関連すると考えられている Haptoglobin-1 precursor である可能性が高い。一方、AIHではCXCケモカインである Neutrophil-activating peptide 2と推定される蛋白の発現が認められた。しかし、得られた分子量や等電点の情報のみから蛋白の推定を行うのみでは信憑性に問題があり、今後、個々の蛋白を分離しアミノ酸配列の決定を行い、蛋白を同定することが必要である。

本法の有用性を検証するために、PBCの類縁疾患であるAICの蛋白発現パターンを検討した。この結果、AICは蛋白の発現パターンからはAIHよりもPBCに近似していることが明らかとなった。本研究班では、昨年度自己免疫性肝疾患に対する多変量解析によるロジスティック回帰モデルを用いた論理診断式を作成し

た。この診断式を用いれば非典型的自己免疫性肝疾患の大部分はAIHかPBCのいずれかに分類可能であり、なかでもAICの大部分は論理診断式ではPBCに分類された。今回のプロテインチップの解析結果はこの臨床研究の結果を支持するものである。

E. 結論

AIHとPBCでは、それぞれの疾患に特有の蛋白発現パターンが存在し、プロテインチップを用いた判別が可能であった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表
 2. 学会発表
1. 田守昭博、西口修平 [自己免疫性肝疾患：非典型例をどう取り扱うのか?]. 自己免疫性肝疾患患者血清のプロテインチップによる解析。第89回日本消化器病学会総会パネル。

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容に関しては特になし。

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

自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変の遺伝子発現プロファイルと それを用いた境界病変の診断

分担研究者 小俣 政男 東京大学大学院医学系研究科消化器内科学 教授

研究要旨：本研究は、対象とする難治性の慢性肝疾患（自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変）の病態解明、治療ターゲット遺伝子の探索および遺伝子発現プロファイルを用いた臨床診断、を目的としたものである。2,300既知遺伝子をスポットしたin-house cDNAマイクロアレイを用いて自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変の網羅的な遺伝子発現解析を行い、そこからバイオインフォマティクス的手法を用いて両疾患を有意に区分する33遺伝子からなる遺伝子セットを抽出した。さらにこの遺伝子セットの発現量を用いることで、新たな症例が、臨床的に診断に難渋した例も含めて、比較的信頼性のあるカテゴリーに区分されることが検証された。今後、これらの遺伝子群の発現プロファイルを用いた両疾患の補助的診断が可能になると考えられる。

共同研究者

大塚基之	東京大学大学院医学系研究科消化器内科学
星田有人	東京大学大学院医学系研究科消化器内科学

A. 研究目的

ヒトゲノムドラフト配列発表を契機に生命情報を包括的に解析検討し、生命現象および疾患の病態を解明しようとする試みがなされるようになってきた。

DNAマイクロアレイ技術の登場により、大量の遺伝子発現情報が一度に得られるようになり、病態の違いによる網羅的な遺伝子発現プロファイルを検討することが可能になった。本研究ではマイクロアレイにより得られた情報を生命情報科学（バイオインフォマティクス）の手法を用いて処理し、自己免疫性肝炎(AIH)、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、および境界病変の診断に関する検討を行った。

B. 研究方法

まずAIH、PBCの診断に寄与する遺伝子群を抽出するためにAIH2例、PBC3例の肝組織由来のRNAからそれぞれpoly(A)mRNAを抽出し、cDNAに逆転写する際にCy-3蛍光色素にて標識した。また対照として正常肝組織より得られたmRNAより作製されたcDNAをCy-5蛍光色素にて標識した。これらを約2,300の既知遺伝子のcDNAをスポットしたガラスアレイに競合的にハイブリダイズさせ、2種の蛍光色素のシグナル強度の比を自動検出器にて測定し、遺伝子発現比とした。

正常肝に対するAIHおよびPBCの肝組織中での2,300遺伝子発現比を用い平均リンケージ法にて階層クラスタを描出した。またAIHとPBCの両群を有意に区分けしている責任遺伝子群を探索するため、各遺伝子において10,000回のサンプル名の無作為入れ替えをベースにしたアルゴリズムを用いて遺伝子群を抽出し、その上で抽出法の信頼度を検討するため、サン

ブルの1つ抜き交差検定を行い最も信頼性の高い方法で選択された遺伝子セットに残った遺伝子に関して検討を行った。

この方法にもとづいて選択されたAIH、PBCの群分けに寄与すると思われる遺伝子群の診断能の正確性を検証するために、任意の数種の遺伝子について、新しい症例AIH3例、PBC1例のサンプルを用いて半定量的なRT-PCRを施行しその結果を数値化して平均リンケージ法にて階層クラスタを描出した。さらに臨床的にAIHとPBCの診断に難渋した症例についてこの方法での診断の可能性について検討した。

C. 研究結果

今回検討した2,300遺伝子の発現比を用いた平均リンケージ法による階層クラスタでもAIHとPBCは群別されたが、偶然による群分けの可能性も否定できないため、sampleのrandom permutation testやleave one out class validationを用いた検討を加えて、最もAIHとPBCの2群の判別に有意に寄与する遺伝子を抽出した。その結果、2300遺伝子のうちから33遺伝子が抽出された。その内訳はAIHで発現亢進が27遺伝子、発現低下が6遺伝子であった。PBCに比してAIHで亢進している遺伝子の内訳はRNA修飾(SFRS5)、細胞内輸送(XK, ABCB1, TM9SF2, SLC11A2, SYX)、核酸代謝(ADA, PRPS2)、蛋白代謝(CCS, FTHFD, PSMC2, UBE2A)、脂質代謝(PXMP3)、細胞外基質(DPT)、胆汁分泌(CCK)、NOS阻害(PIN)、その他(SNTB1, ST13, GPM6B, THPO, DMRT2, CTNNAP1, RD, ENTPD, CYP21A2, DHPS, HSS1, CBX1, ILVBL)であった。AIHで低下している遺伝子はRNA修飾(HNRPA2B1)、蛋白代謝(RPS29, BENE)、転写因子(TAF10)、細胞内飲食(ARF6)であった。選択された遺伝子を用いた階層クラスタでは2,300遺伝子を用いた場合に比し明らかにAIH群とPBC群を遠い距離にクラスタリングし、より明確に区分しえた。

次にこの抽出された遺伝子のうち任意の7遺伝子

(ADA, CCK, RSP29, FDPS, ZYX, IGFBP5, ORM) について、遺伝子の抽出に用いたのとは異なる新しいサンプル(AIH3例、PBC1例)についてRT-PCRを行いその結果を数値化してクラスタリング解析を行なったところ、両群を群分けすることが可能であった。さらに臨床的に両疾患の境界と思われる症例(72歳 男性、GOT346, GPT 314, IgG 4628, 抗核抗体陰性、抗ミトコンドリア抗体陽性)の組織を用いて同様の解析を行なったところ、AIH群に近い位置に位置づけられ、実際本症例はステロイドが奏功しており、臨床的な診断の一助となる可能性が示唆された。

D. 考察

AIHとPBCの肝組織における遺伝子発現は比較的大幅に異なっており、無作為に選択された2,300遺伝子によっても判別が可能であった。しかしながら、これではたまたまこの2300遺伝子が偶然今回用いた症例を群分けした可能性が高いため、このなかから真に両疾患の群分けに寄与する遺伝子群をバイオインフォマティックスの手法を用いて抽出し33遺伝子を同定した。これらの遺伝子の内容は、免疫応答や炎症に関わる遺伝子の発現差が認められなかったいっぽうで、細胞内輸送や核酸、蛋白、脂質代謝に関わる遺伝子が多く認められた。したがって、これらの遺伝子は時系列で変動するALTや γ -GTPに代表される肝炎の活動度の指標とは独立して、AIHとPBCの恒常的な病態の相違を示している可能性がある。実際に、これらの遺伝子群を用いてクラスタリングすることで、さらに明確に両疾患を区分することができるようになった。そのうえで、この遺伝子群の診断能を検討する目的で新しいサンプルを用意し、この抽出遺伝子群が新たなサンプルでも両疾患を区分することが可能であることも検証しえた。さらには、境界型と思われる症例もこれらの遺伝子発現の近似性をもとにどちらの疾患群に近いかをクラスタリングで明らかにすることが可能であった。今回の検討で、両疾患を区分するのに用いることのできる遺伝子群が33遺伝子に絞れたことで、マイクロアレイを用いなくとも、RT-PCRのレベルでも診断が可能となりうることが示され、実際に臨床応用しうる方法として現実的になりつつあるものと思われる。ただし、今回抽出された遺伝子群が、マーカーとしての「両疾患を区分する遺伝子群」にすぎないのか、あるいは「疾患感受性遺伝子」でもあるのかという点については、今後検討する必要がある。

E. 結論

In-houseのcDNAマイクロアレイを用いてAIHとPBCの遺伝子発現解析を行った。網羅的な遺伝子発現解析から適切に絞り込んだ遺伝子セットを用いることにより、遺伝子発現プロフィールを臨床診断に用いることも可能になると考えられる。