

II-3. 原発性胆汁性肝硬変に関する研究

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

原発性胆汁性肝硬変全国調査（第23報）

オブザーバー 廣原 淳子 関西医科大学第3内科 助手

研究要旨：本研究の目的は、原発性胆汁性肝硬変（PBC）全国調査の長期追跡症例の検討により、本邦におけるPBCの実態と予後の変遷を明らかにすることにある。2001年12月末に実施した第11回PBC全国調査で、既登録症例1793例と新規登録769例の報告が得られ、総登録症例は5129例となった。5年生存率はa-PBC 97%、s1-PBC 89%、s2-PBC 54% 10年生存率は各々90%、72%、35%であった。年代別予後解析の結果、a-PBC、s1-PBCおよび軽度（T-Bil値2-5mg/dl、組織学的病期ⅠまたはⅡ）のs2-PBCでは、1990年以降に診断された群は以前の群と比較して予後が有意に改善していた。多変量解析の結果、軽度s2-PBCの群の予後にUDCAの影響が示唆された。しかし、内科的治療により生存期間の延長が十分期待できないT-Bil.5mg/dl以上または組織学的病期Ⅲ・Ⅳ期群では、肝移植適応の検討が望ましい。

共同研究者

仲野 俊成 関西医科大学 大学情報センター
医療情報部

A. 研究目的

本邦における原発性胆汁性肝硬変（PBC）の全国調査は1980年より実施され、その集計・解析を継続して行なってきた。今回は、2001年12月末に実施した第11回全国調査の最終集計結果を報告するとともに、20年以上に及ぶ長期追跡症例の解析から本邦におけるPBCの実態と予後の変遷について検討した。

B. 方法

第11回PBC全国調査は、全国444の既登録施設に対し、1998年12月までの既登録症例の予後調査と1999年1月から2001年12月末までに新たに診断された新規症例についてアンケート調査により報告を求め、これら臨床像と予後について解析した。また、年代別予後解析の検討では、既登録症例5129例のうち解析可能であった4284例を1989年までに診断された群と1990年以降に診断された2群に分けて比較検討した（各々症例数1206例、3078例、平均年齢52.6歳、55.8歳、平均観察期間104.0ヶ月、47.8ヶ月）。生存率はKaplan-Meier法により解析し、多変量解析にはSAS JMP Ver.4を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。なお、研究対象とした登録症例の個人情報漏洩に関しては十分な配慮を行った。

C. 研究結果

1. 第11回PBC全国調査の最終集計結果と病態の変遷について診断年次別に示す。

- 1) 各調査回の新規登録症例数および総症例数（表1）：登録症例総数は5129例、男女比634：4495、診断時平均年齢54.4歳、平均観察期間60.0ヶ月である。
- 2) 年次別発生数（図1）および有病者数（図2）と診断時臨床病期；無症候性（asymptomatic PBC）

- a-PBC)、症候性PBC（symptomatic PBC：s-PBC）のうち皮膚掻痒感のみのs1-PBCと総ビリルビン値（T-Bil）2.0mg/dl以上のs2-PBC別の割合：1990年以降年間発生数は250例前後でほぼ横ばいであるが、有病者数は漸増している。
- 3) 年齢構成および性別（図3）：診断年次別年齢分布比率（図4）をみると好発年齢層が50-60歳代中心であることに変わりないが、50歳未満の割合が減少し70歳以上の高齢者が増加している。診断年次別性別比率（図5）では男女比1：7と大きな変化は認められない。
- 4) 自己抗体陽性頻度：抗ミトコンドリア抗体（antimitochondrial antibody: AMA）陽性率は81.8%、抗核抗体（antinuclear antibody: ANA）42.3%、抗平滑筋抗体（antismooth muscle antibody: ASMA）5.0%で、抗pyruvate dehydrogenase: PDH抗体（表2,3）陽性率は67.2%であった。
- 5) 自己免疫疾患の合併頻度（表4）に既報と差異はない。
- 6) 合併する悪性腫瘍の内訳とその頻度（図6）では肝細胞癌の合併は45例（0.96%）であった。
- 7) Scheuer分類による診断年次別の肝生検組織学的病期（図7）の割合は、大きな変化はない。
- 8) 診断時「早期のPBC」の年次推移：診断時a-PBCのうちAST,ALT<30U/l、T-Bil<2.0mg/dl、ALP<基準値、ScheuerⅠ期、AMA陽性症例を「早期のPBC」としてa-PBCに占める割合を診断年次別に示した。a-PBCの4.9%程度がこの定義に相当するが、ほぼ一定の傾向で存在する（図8）。
- 9) 治療の年次推移（治療薬剤の変遷、内視鏡的静脈瘤治療例数および肝移植数、（図9）：調査開始当初はDペニシラミン投与例が多かったが、1987年以降は飛躍的にUDCAの投与例数が増加している。最近の特徴としてベザフィブラート投与症例数の急増が目される。また、1988年ごろから食道胃静脈瘤に対する内視鏡的治療例が増加し、1996年

からは外科的治療としての肝移植症例も報告されている。

- 10) 予後(表5)と死亡年次別にみた死因(図10): 肝不全と消化管出血が主たる死因であるが、その他の死因による死亡数が増加し、原疾患による死亡数は減少傾向にある。
- 11) 診断時臨床病期別生存率: 診断時a-PBC3114例、s1-PBC699例、s2-PBC470例について各々の5年生存率は97%、89%、54%、10年生存率は90%、72%、35%程度であり、各群相互間に $p < 0.0001$ 以下で有意差が認められた。(図11)

表1. 年度別調査例数

	新規登録例数	総調査例数
第1回調査(1980)	166	166
第2回調査(1982)	95	126
第3回調査(1984)	165	238
第4回調査(1987)	420	572
第5回調査(1989)	569	693
第6回調査(1990)	295	987
第7回調査(1992)	487	1310
第8回調査(1994)	711	2060
第9回調査(1996)	765	2526
第10回調査(1998)	707	2666
第11回調査(2001)	769	2539
	5129	

図1. 年次別発生数

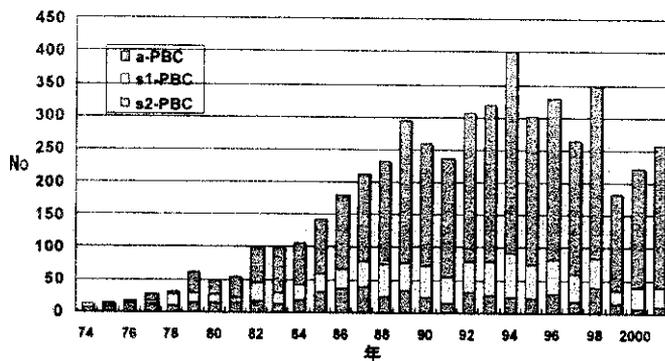
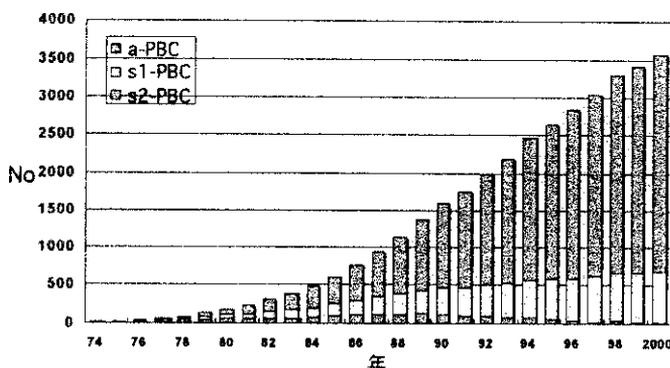


図2. 年次別有病者数



2. 予後の変遷

- 1) 年代別予後解析: 全例での検討(図12)および診断時各臨床病期別(a-PBC、s1-PBC、s2-PBC)での検討(図13)でも1990年以降の群は以前の群に比較して生存率は有意に高かった($p < 0.001$).
- 2) s2-PBCの重症度別にみた年代別予後解析: 診断時T-Bil.5mg/dl以上(図14)、組織学的病期Ⅲ期以上(図15)の群では生存率に年代別有意差は認められなかった。
- 3) 軽症s2-PBC(T-Bil2-5mg/dlまたは組織学的病期I+Ⅱ期)における予後有意因子の検討(表6): 1989年以前に診断された軽症s2-PBC群についてlogistic回帰分析による多変量解析からUDCA使用の有無および門脈圧亢進症(腹水、消化管出血)の存在が有意因子として選択された。

図3. 年齢および性別

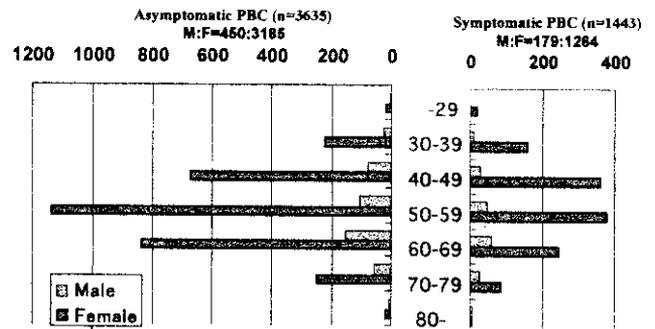


図4. 診断年次別年齢分布比率

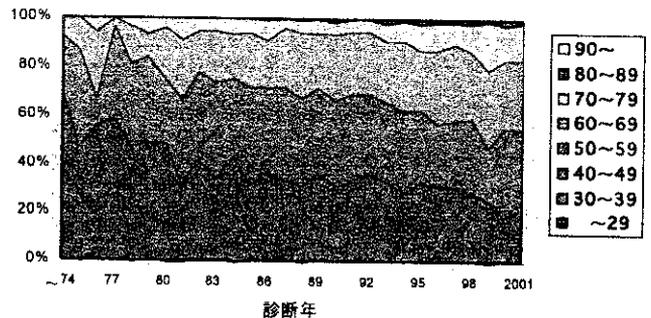


図5. 診断年次別性別比率

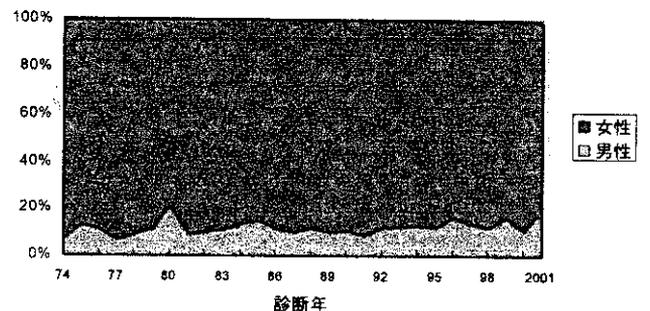


表2. 自己抗体の陽性頻度

	AMA		Total	
	(+)	(-)		
ANA	(+)	1592(34.3)	374(8.1)	1966(42.3)
	(-)	2341(50.4)	337(7.3)	2678(57.7)
ASMA	(+)	134(2.9)	96(2.1)	230(5.0)
	(-)	3799(81.8)	615(13.2)	4414(95.0)
Total	3933(81.8)	711(13.2)	4644(100)	

表3. AMAと抗PDH抗体の陽性頻度
(第7~11回調査例で両者が測定されている1305例)

	AMA		Total	
	(+)	(-)		
PDH	(+)	822(63.0)	55(4.2)	877(67.2)
	(-)	245(18.8)	183(14.0)	428(32.8)
Total	1067(81.8)	238(18.2)	1305(100)	

表4. 自己免疫疾患の合併
(記載のあった4009例中)

Sjögren症候群	645例(13.6%)
橋本病	292例(6.2%)
リウマチ性関節炎	202例(4.3%)
Raynaud現象	146例(3.1%)
強皮症	97例(2.0%)
潰瘍性大腸炎	12例(0.3%)

図6. 悪性腫瘍の内訳 155/4737例, 3.3%

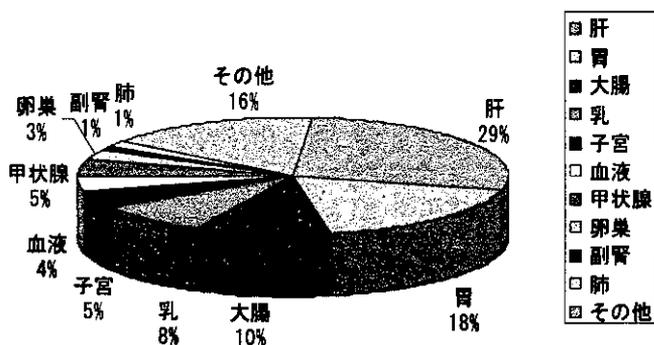


図7. 診断時肝生検組織分類 (Scheue分類)

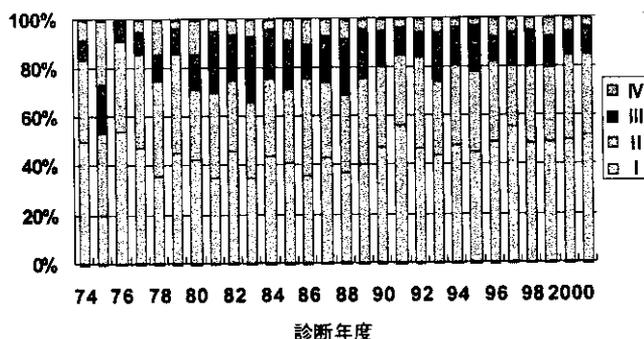


図8. 診断時早期PBCの年次比率推移

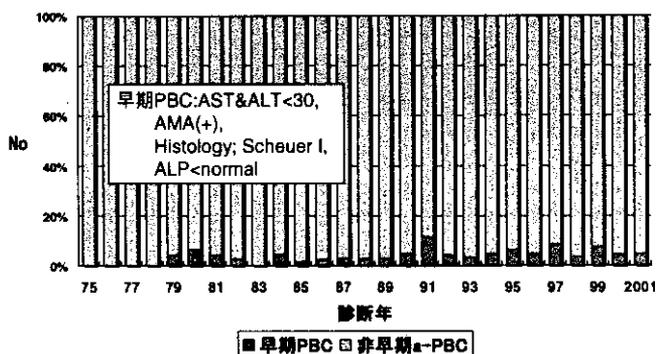


図9. 治療の年次推移

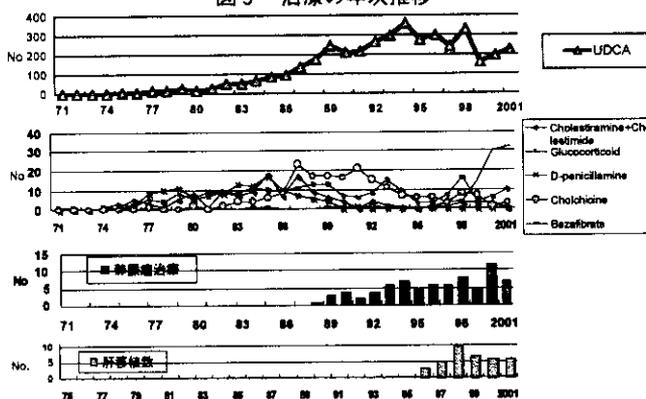
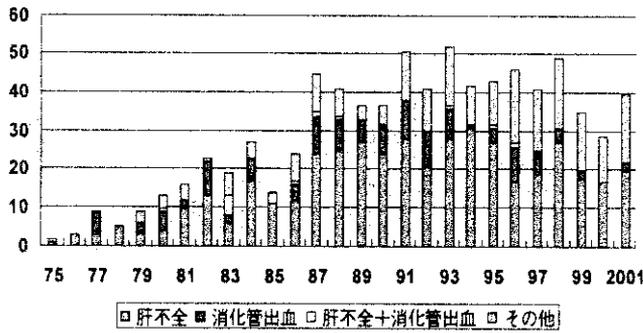


表5. 予 後 (不明を除く4107例)

生存中	3302例
死亡	805例
肝不全	447例
消化管出血	124例
肝不全+消化管出血	12例
その他	222例

図10. 死亡年次別にみた死因



肝不全 消化管出血 肝不全+消化管出血 その他

図11. 診断時臨床病期別にみた予後

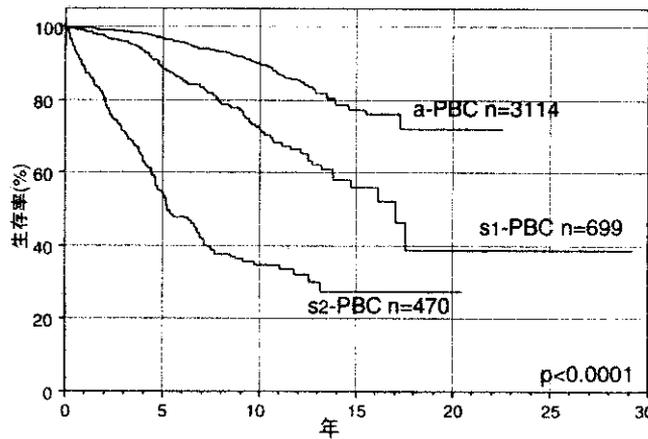


図12. 年代別にみた予後

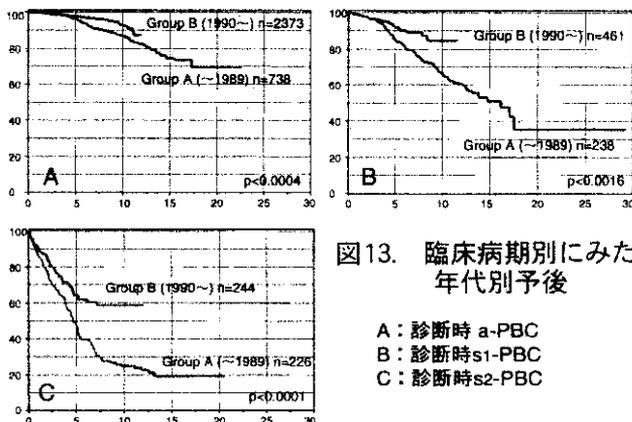
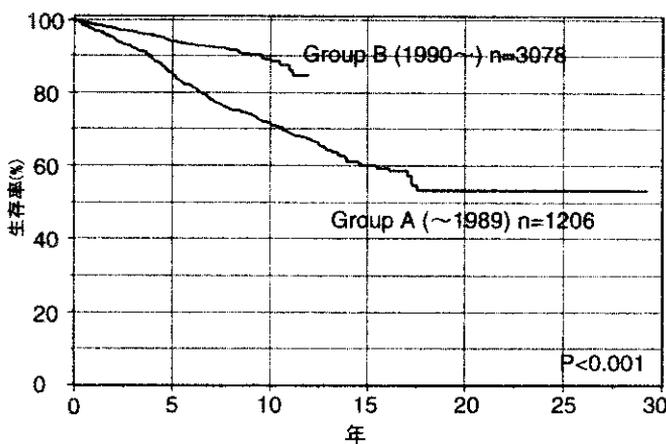


図13. 臨床病期別にみた年代別予後

A: 診断時 a-PBC
B: 診断時 s1-PBC
C: 診断時 s2-PBC

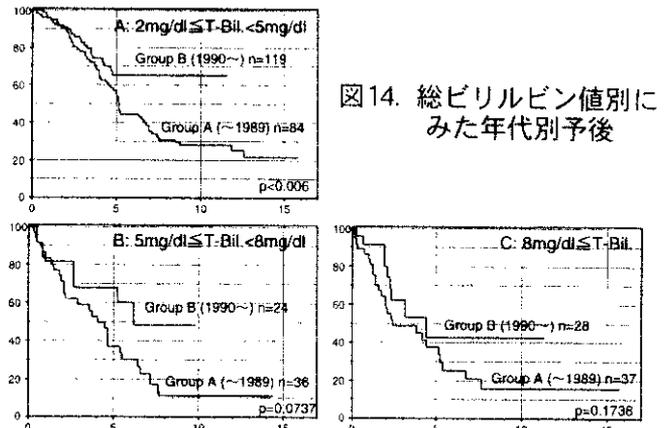


図14. 総ビリルビン値別にみた年代別予後

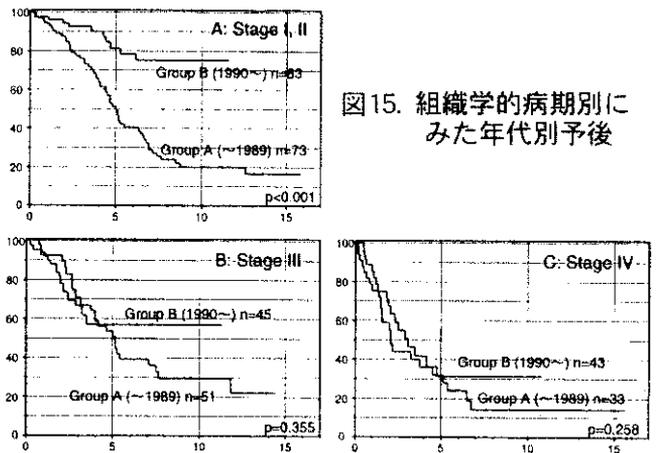


図15. 組織学的病期別にみた年代別予後

表6. 軽症s2-PBCにおける予後因子

診断時T-Bil. 2~5mg/dl群におけるLogistic解析

	β	SE	OR (95%CI)	p value
Alb.(g/dl)	-0.4491	0.3641	0.6382 (0.313-1.303)	0.2174
T-cho(mg/dl)	0.0025	0.0020	1.0025 (0.999-1.006)	0.2229
Use of UDCA	1.0044	0.2218	2.7303 (1.768-4.217)	<0.0001
Portal hypertension	-1.3106	0.2677	0.2697 (0.159-0.456)	<0.0001

組織学的病期Stage I, II群におけるLogistic解析

	β	SE	OR (95%CI)	p value
Age	-0.0459	0.0215	0.9551 (0.916-0.996)	0.0331
T-Bil.(mg/dl)	0.1099	0.0543	1.1162 (1.003-1.242)	0.0431
T-cho(mg/dl)	-0.0032	0.0015	0.9968 (0.994-0.999)	0.0312
Use of UDCA	0.9676	0.2724	2.6316 (1.543-4.488)	0.0004
Portal hypertension	-1.5427	0.2930	0.2138 (0.120-0.380)	<0.0001

3. 肝移植例の予後追跡調査

全国調査登録症例中第10回調査(1998年12月実施)までに肝移植を施行された症例は22例あったが、そのうち今回予後が確認されたのは10例(生存7、死亡3:死因肝不全1、MOF 1、感染症 1)であった。追跡例のうち新たに移植を受けた症例は8例(生存5、死亡1、不明2)で、全例が生体部分肝移植であった。11回新規登録例では14例が肝移植を受けており(生存12、死亡1、不明1)、生体部分肝移植12、脳死肝移植1、ドミノ肝移植1例であった。

4. 家系例一次調査

家系例を保有している施設は13施設、計21家系(姉妹13、母娘5、姉弟1、父娘1、兄妹1例)であった。第10回調査時の一次調査と合わせて25施設39症例の家系例を登録し、発症因子解明のための免疫遺伝学的検討を目的とした二次調査を2002年3月に実施した(集計中)。

D. 考察

第11回調査症例を含む全登録症例の臨床像および予後における年代の変遷に注目して検討した。

診断時年齢の高齢化に伴い死因に占めるその他の割合が増加している。一方、原疾患による死亡数の減少は、内視鏡的静脈瘤治療による消化管出血の管理可能症例が増えたこと、また肝移植例数の増加が肝不全死亡数の減少と呼応しているものと思われる。

最近の疫学的動向としては年間発生数が一定であるのに対し有病者数の増加が顕著であるが、この一因として軽症早期診断例との関連を検討した。診断時a-PBCの占める割合が増加しているものの、診断時組織学的病期割合においてもa-PBCに占める早期PBCの割合を見ても近年特に軽症早期診断例が増加している傾向は明らかではなかった。また、既報(第18報)において統計学的有意差は認められていなかったが、その後の症例数の増加および観察期間延長により、今回の検討では軽症s2-PBCだけでなく、a-PBCおよびs1-PBCにおいても年代別予後が有意に改善されていることが明らかとなった。近年の有病者数の著増は軽症早期診断例の増加よりも、各病期にわたる予後の改善が寄与していることが裏付けられた。

1990年以降の軽症s2-PBC予後の改善には、多変量解析の結果UDCA投与による影響が示唆された。つまり、発黄してもT-Bil. 5mg/dl までまたは組織学的病期I+IIの群では、門脈圧亢進症の合併が認められない限りUDCAにより生存期間の延長が期待される。全国調査における肝移植追跡例数はまだ少数であるもののその予後は良好であるため、内科的治療により生存期間の延長が十分期待できないT-Bil. 5mg/dl以上または組織学的病期III・IV期群では、より積極的な肝移植への対応が望ましいと考える。

E. 結論

第11回PBC全国調査で、既登録1793例と新規登録769例の報告が得られ、総登録症例は5129例となった。5年生存率はa-PBC 97%, s1-PBC 89%, s2-PBC 54% 10年生存率は各々90%、72%、35%であった。近年の有病者数の著増は軽症早期診断例の増加よりも、各病期にわたる予後の改善が寄与していることが示唆された。しかし、内科的治療により生存期間の延長が十分期待できないT-Bil. 5mg/dl以上または組織学的病期III・IV期群では、肝移植の適応を検討することが望ましい。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakano T, Inoue K, Hirohara J et al: Long-term prognosis of primary biliary cirrhosis (PBC) in Japan and analysis of the factors of stage progression in asymptomatic PBC (a-PBC). *Hepatology Research* 2002; 22: 250-260

2. 学会発表

- 1) 廣原淳子、大西三朗、戸田剛太郎: 全国調査にみる原発性胆汁性肝硬変(PBC)の病態と予後の変遷: 第88回日本消化器病学会総会、パネルディスカッション、本邦における難治性肝疾患の実態と変遷、2002.4.25

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得: 無し
2. 実用新案登録: 無し
3. その他: 無し

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

原発性胆汁性肝硬変（PBC）に関する臨床調査個人票の有用性の検討

特定疾患の疫学に関する研究班 森 満 札幌医科大学公衆衛生学 教授

研究主旨：特定疾患治療研究事業で、医療費の公費負担を受けている原発性胆汁性肝硬変症例の臨床調査個人票を有効に利用する方法を、平成13年度に引き続き検討した。今回は調査項目を、原発性胆汁性肝硬変に合併した他の膠原病ごとに集計した。合併していた膠原病はシェーグレン症候群(11.8%)、リウマチ性関節炎(6.7%)、慢性甲状腺炎(4.4%)、強皮症(2.0%)、であった。これらの膠原病を要因として多重比較を行った結果、黄色腫の出現が、リウマチ性関節炎では慢性甲状腺炎よりも有意に多くみられることが示された($P<0.05$)。このように、臨床調査個人票の使用により疾患の特徴を多数例で検討でき、その有用性が示された。

共同研究者

坂内文男 札幌医科大学公衆衛生学 助手

A. 研究目的

特定疾患治療研究事業の対象疾患は、臨床調査個人票に、毎年度、症例の基本的属性及び臨床所見等が記載されている。平成13年度に引き続き原発性胆汁性肝硬変の臨床調査個人票の有効利用法を検討してみた。

B. 研究方法

平成11年度に医療費の公費負担を受けた原発性胆汁性肝硬変患者6,527例の臨床調査個人票の情報をデータ化したファイルを用いた。登録された症例の内、平成11年と平成12年3月までに臨床調査個人票が記載された5,805例を集計した。今回は、調査項目を、原発性胆汁性肝硬変に合併した他の膠原病ごとに集計した。合併していた膠原病はシェーグレン症候群（683例, 11.8%）、リウマチ性関節炎(390例, 6.7%)、慢性甲状腺炎(258例, 4.4%)、強皮症(117例, 2.0%)であった。これらの膠原病を要因として、男女比、平均年齢、自覚症状の出現頻度と臨床検査値の多重比較を行った。なお、平均値の差の検定は一元配置の分散分析、ないしクラスカル・ワリスの検定、比率の差は均一性の検定を用いた。

(倫理面への配慮)

データファイルの管理は厳重に行い、解析時には、個人情報に関するデータは用いなかった。

C. 研究結果

[1] PBCに合併する膠原病ごとの調査項目の比較

1 平均年齢(歳) 平均値±標準偏差
シェーグレン症候群 n=673 60.4±9.1
リウマチ性関節炎 n=389 59.6±9.9
慢性甲状腺炎 n=257 59.1±9.7
強皮症 n=117 59.9±10.0
P=0.22

2 男女比(女性/男性)

シェーグレン症候群 27.1 (651/24例)
リウマチ性関節炎 25.0 (375/15)
慢性甲状腺炎 50.6 (253/5)
強皮症 28.3 (113/4)
P=0.63

3 総ビリルビン値(mg/dl)

平均値±標準偏差
シェーグレン症候群 n=629 1.1±2.9
リウマチ性関節炎 n=367 0.9±1.3
慢性甲状腺炎 n=238 0.9±1.3
強皮症 n=113 0.8±0.7
P=0.21

4 ALP(IU/L) 平均値±標準偏差

シェーグレン症候群 n=665 481.7±456.4
リウマチ性関節炎 n=388 525.1±462.1
慢性甲状腺炎 n=256 452.7±431.4
強皮症 n=117 505.4±449.6
P=0.22

5 γ -GTP(IU/L) 平均値±標準偏差

シェーグレン症候群 n=659 143.9±181.7
リウマチ性関節炎 n=383 160.0±243.3
慢性甲状腺炎 n=258 133.5±185.5
強皮症 n=113 135.8±136.7
P=0.34

6 総コレステロール(mg/dl) 平均値±標準偏差

シェーグレン症候群 n=641 203.4±93.0
リウマチ性関節炎 n=369 216.5±162.5
慢性甲状腺炎 n=243 218.7±154.1
強皮症 n=111 203.3±53.4
P=0.23

7 IgM値(mg/dl) 平均値±標準偏差

シェーグレン症候群 n=543 411.7±340.6
リウマチ性関節炎 n=299 388.6±246.6

慢性甲状腺炎 n=200 435.8±310.0
強皮症 n=91 333.4±204.8
P=0.04
慢性甲状腺炎と強皮症に有意差あり。

8 抗ミトコンドリア抗体陽性率
シエーグレン症候群 82.4% (528/641例)
リウマチ性関節炎 81.5 (304/373)
慢性甲状腺炎 83.1 (201/242)
強皮症 81.1 (90/111)
P=0.95

9 黄色腫の陽性率(%)
シエーグレン症候群 7.7% (47/607例)
リウマチ性関節炎 12.8 (47/368)
慢性甲状腺炎 4.8 (11/228)
強皮症 5.0 (5/100)
P=0.0037
リウマチ性関節炎と慢性甲状腺炎に有意差あり。

10 その他の項目

自覚症状で、皮膚掻痒感、黄疸、脾腫、食道静脈瘤の出現は各膠原病間で陽性率に有意の差はみられなかった。

D. 考察

PBCは合併する他の膠原病により臨床症状が異なるものがあり、いくつかの病態が存在することが示唆された。

E. 結論

臨床調査個人票は疾患の特徴を多数例より検討でき、その有用性が示された。

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

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の家族発症例
-当科における6家系についての検討-

分担研究者 大西 三朗 高知医科大学 第一内科 教授

研究要旨：1982-2002年の20年間に当科を受診したPBC確診例85例中、PBC家族内発症例は5例(5.9%)で、諸外国の結果と大きく変わらず、PBCの家族歴を有することはPBC発症の危険因子になると考えらる。抗ミトコンドリア抗体のプロフィールが多くの家系内発症例で同一であることに関しては、何らかの遺伝的要因あるいは環境因子の存在を想定させるが、今後、多数例での検討が必要である。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の発症には、何らかの環境因子や免疫遺伝学的素因が関連すると想定されるが、本邦では家族内発症の報告は以外に少なく、その発症頻度など詳細は明らかでない。今回、我々が経験したPBC家族内発症例について、臨床的、免疫学的、および文献的な検討を加え報告する。

B. 研究方法

1982年から2002年までの20年間に、当科を受診したPBC確診例85例のうち、家族内にPBCを発症した5家系と関連施設での1家系、計6家系を対象とし、一般肝機能検査、免疫学的検査、HLA、肝組織像等を検討した。また、抗ミトコンドリア抗体のプロフィールを immunoblotting 法で検索する (74kD=PDC-E2, 52kD=E3BP, 50kD=BCOADC-E2, 46kD=OGDC-E2) とともに、抗PDH-E2抗体のPDH酵素阻害活性(EIA)を検討した。

C. 研究結果

6家系の内訳は、姉妹例4家系、母娘例2家系で、各家系に患者が2名の合計12名で全例女性であった。母娘発症の2家系では、娘は母に比し、約20年若年で発症し、臨床症状も重篤であった(家系1:母=a-PBC、娘=S2-PBC、家系2:母=a-PBC、娘=静脈瘤破裂・肝不全)。同胞発症の4家系では、ほぼ同じ年齢(±4年)で発症あるいは診断がなされているが、診断時の Scheuer分類で同一病期の家系は1家系のみであった。HLA (class I, II) は、2家系で完全同一、4家系はその半分が同一であり、免疫遺伝学的背景は類似していた。AMAは3家系で同じ抗体価であり、immunoblotting法 (IgG) による検討では、1家系を除く5家系で、AMAは同一の対応抗原に反応した(家系1:74kD/52kD/50kD、家系2:74kD/52kD/50kD、家系4:50kD、家系5:50kD、家系6:74kD/50kD)。

D. 考察および結論

当科のPBC家族内発症数は85例中5例(5.9%)で、その頻度はTsujiらが広島で行った検討結果(5.1%)とほぼ同じであり、諸外国の結果(1-6%)と大きく変わらない。PBC同胞発症のrelative riskはRA等の他の自己免疫疾患と大差がないとの報告もあり、PBCの家族歴を有することはPBC発症の危険因子となる。抗ミトコンドリア抗体のプロフィールが多くの家系内発症例で同一であることに関しては、何らかの遺伝的要因あるいは環境因子の存在を想定させるが、今後、多数例での検討が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表
無し

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

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

原発性胆汁性肝硬変の胆管病変形成における自然免疫の関与

研究協力者 中沼 安二 金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変(PBC)の病因または病態形成に細菌の関与が示唆されているが、細菌と胆管病変との関連性については不明である。今回、胆管粘膜における自然免疫機構をリポポリサッカライド(LPS)に対する反応性について検討したところ、胆管細胞はToll-like receptor 4 (TLR4), CD14, MD-2を発現しており、さらにLPSは胆管細胞のNF- κ Bの活性化を介してTNF- α 産生を誘導した。また、IFN- γ (Th1型サイトカイン)は胆管細胞からのTLR4, CD14, MD-2発現を亢進させた。胆管細胞はLPSを認識することにより炎症性サイトカインを産生し、またTh1型優位な環境下ではLPSに対する感受性も亢進していることが示唆され、このような現象がPBCの胆管病態形成に加担しているものと推測された。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)の病因または病態形成における細菌感染症や菌体成分の関与が報告されているが、細菌と胆管病変との関連性については不明である。今回我々は、胆管粘膜における自然免疫の基礎的研究として、①胆管細胞におけるToll-like receptor (TLR)-4(グラム陰性菌の主要菌体成分であるLPSの受容体)および関連因子(CD14,MD-2)の発現 ②LPSに対する反応性 ③サイトカイン刺激に対するTLR4および関連因子の変化について検討し、PBC特異的な胆管炎の組織発生と細菌成分との関連性について考察した。

B. 研究方法

1. 培養細胞

マウス培養胆管細胞(BALB/Cマウス肝内末梢胆管由来)および2種のヒト肝内胆管癌由来培養細胞CCKS1とHuCCT1を用いた。

2. TLR4,CD14,MD-2の発現

培養細胞からRT-PCR法にてTLR4, CD14, MD-2 mRNAを検出。また、TLR4抗体, CD14抗体を用いて疫組織化学的染色を行い、細胞内における発現を観察した。

3. LPS刺激に対する反応性

LPS刺激に対する培養細胞の反応性をTNF- α の発現にて評価した。各培養細胞に希釈系列のLPS(100 μ g/ml \sim 0.01 μ g/ml)またはリポテイコ酸(100 μ g/ml \sim 1 μ g/ml)を添加し、12時間後の培養上清中に存在するTNF- α をELISA法にて測定した。また、TNF- α mRNAをRT-PCRにて検出した。

4. TLR4のブロッキングによる反応性の変化

マウス培養胆管細胞の抗マウスTLR4/MD2ブロッキング抗体添加群と非添加群をLPS刺激し、ELISA法にてTNF- α を測定した。

5. NF- κ Bの活性化と阻止

TLR4の下流に存在する細胞内シグナル伝達の一つであるNF- κ B系の活性化を検討するため、HuCCT1, CCKS1のLPS刺激群と非刺激群を作成し、ヒトNF-

κ B p65抗体を用いた免疫染色およびDNA-NF- κ B binding assay (ELISA法)を行った。また、TNF- α の産生が、NF- κ B系を介していることを検討するために、NF- κ B阻害剤(MG132,10 μ M)添加によるTNF- α 発現の変化について検討した。

6. サイトカイン刺激によるTLR発現の変化

HuCCT1,CCKS1を対象に、ヒトリコンビナントIL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL5 (各1000U/ml)を培養上清に添加し、TLR4,CD14,MD-2 mRNAの発現をRT-PCR法にて検討した。

C. 研究結果

1. TLR4,CD14,MD-2の発現

RT-PCR法によりマウス培養胆管細胞,CCKS1, HuCCT1のすべての培養細胞にTLR4, CD14, MD-2 mRNAの発現を認めた。免疫染色により、CCKS1, HuCCT1の細胞表面にTLR4の発現を認め、また、細胞質にも若干の発現を認めた。CD14の発現は、CCKS1,HuCCT1では細胞表面と細胞質に同程度の発現を認めたが、マウス培養胆管細胞では細胞表面での発現が優位にみられた。

2. LPS刺激に対する反応性

各培養細胞にLPSまたはリポテイコ酸を添加したところ、LPS濃度依存的にTNF- α の産生亢進が見られた(図1)。リポテイコ酸刺激でも濃度依存的にTNF- α の産生亢進を認めたが、LPS刺激に比しTNF- α の産生量は低値であった(図1)。また、RT-PCR法でもLPSまたはリポテイコ酸にてTNF- α mRNAが検出されたが、ELISAの結果と同様、リポテイコ酸に比しLPSの刺激で優位な亢進を認めた。

3. TLR4ブロッキング抗体に反応性の変化

マウス培養胆管細胞に抗TLR4ブロッキング抗体を添加した結果、抗体非添加群に比べ、LPS刺激によるTNF- α の産生が29%にまで抑制された。

4. NF- κ Bの活性化と阻止

LPS刺激状態におけるHuCCT1,CCKS1のNF- κ Bは主として核に局在していたが、非刺激群およびNF- κ B阻害剤添加での刺激群では主として細胞質内に局

在したままであった。また、DNA-NF- κ B binding assayでは、LPS刺激による活性の上昇およびNF- κ B阻害剤による抑制が見られ、LPS刺激によりNF- κ Bが活性化していることが示された。また、NF- κ B阻害剤共培養下でLPS刺激によるTNF- α mRNAをRT-PCRで検出したところ、阻害剤添加によりTNF- α mRNAの産生が抑制された。

5. サイトカイン刺激によるTLR発現の変化

ヒトリコンビナントIL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-5のうち、HuCCT1, CCKS1共にIFN- γ 刺激にてTLR4, CD14, MD-2 mRNAの発現亢進が見られた。また、HuCCT1のTNF- α 刺激にてCD14発現の若干の亢進、またCCKS1のTNF- α 刺激にてTLR4発現の亢進が見られた(図2)。

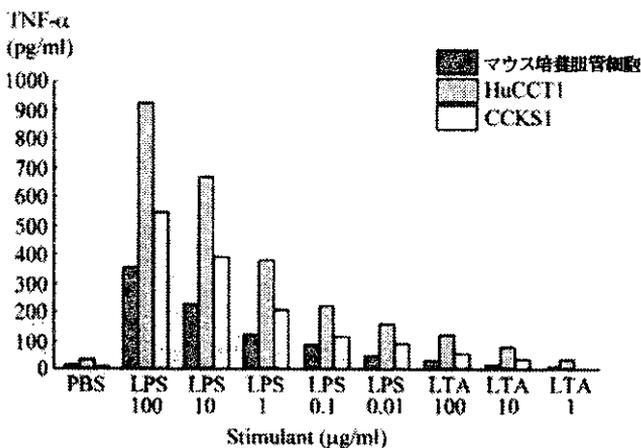


図1. LPSおよびポテイコ酸(LTA)刺激に対するTNF- α の発現

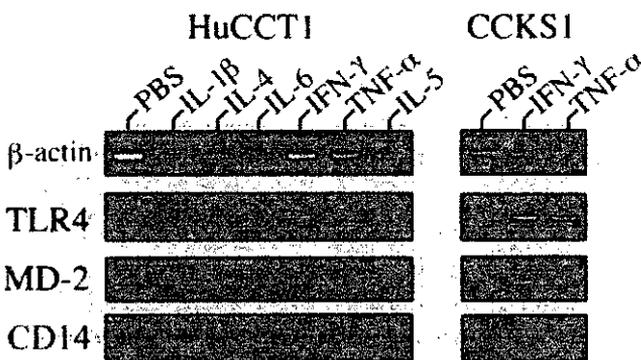


図2. サイトカイン刺激によるTLR4, MD-2, CD14 mRNA発現

D. 考察

自然免疫機構はマクロファージなどの免疫担当細胞のみならず腸管上皮などの上皮細胞も有しており、特にクローン病や潰瘍性大腸炎など慢性炎症性腸疾患での自然免疫の破綻または異常が病態形成に関与していることが明らかとなってきた。

既報によると、PBC患者から得られた胆嚢胆汁からは培養可能な細菌はほとんど検出されないが、細菌DNAのPCRによる分子生物学的検出では種々の菌種が同定されている。このような報告は、胆道系にもな

んらかの自然免疫機能が存在することを示唆するが、未だ詳細な報告はない。今回の検討にて、胆管細胞はTLR4受容体を介してLPSを認識し、TNF- α を産生していることが示され、胆管独自の自然免疫機構が存在することが示された。また、IFN- γ (Th1型サイトカイン)刺激にて胆管細胞のTLR4, CD14, MD-2の発現が亢進したが、IL-4~6(Th2型サイトカイン)やIL-1 β 刺激では明らかな発現の変化は認めなかった。このような結果は、胆汁中サイトカインや胆管周囲の微小環境が胆管細胞のLPSに対する感受性を調節していることを示唆する。PBCの胆管周囲ではTh1型サイトカインがTh2型に比し優位で、Th1型への偏位が胆管炎の発生に関与していることが示唆されているが、Th1型優位の偏位がLPSに対する感受性の亢進、さらに胆管炎の発生に関与している可能性も挙げられた。

E. 結論

胆管上皮は少なくともグラム陰性菌に対する自然免疫機構を有しており、サイトカインによる調節機序の存在も示された。このような胆管粘膜における自然免疫またはその破綻が、PBCの胆管病態形成にどのように加担しているのかが今後の検討課題である。

F. 研究発表

- 論文発表
- 学会発表
 - 原田憲一ら. 肝内胆管細胞におけるToll-like receptor (TLR) の発現. 第5回 日本肝臓学会大会
 - 原田憲一ら. 原発性胆汁性肝硬変の肝内小型胆管におけるToll-like receptor発現の変化. 第91回 日本病理学会総会
 - Harada K, et al. Toll-like receptor expression and its regulation in biliary epithelial cells. 52nd Annual Meeting, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)

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

原発性胆汁性肝硬変における免疫異常の解析

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：本研究の目的は原発性胆汁性肝硬変（PBC）の発症、進展の主因とされる免疫異常を解析して自己免疫応答機構を明らかにし、最終的には抗原特異的な免疫療法を開発することである。本年度は、1)PBC患者由来PDC-E2の抗核抗体対応抗原との交差反応性、2)PBCにおける大腸菌抗原特異的T細胞のヒトPDC-E2抗原認識様式、3)PBCにおけるCD28陰性CD4+T細胞の意義、4)PBC発症におけるIgA抗体の関与、について検討した。その結果、①PBC患者に抗ミトコンドリア抗体（AMA）のみならず抗核抗体も同時に出現する現象の機序として、ミトコンドリア抗原分子と核膜抗原分子との間に分子相同性が関与している可能性が示唆された。②大腸菌抗原特異的T細胞はヒトPDC-E2 163-176ペプチドも認識し、同T細胞がPBCの発症に関与している可能性が考えられた。③PDC-E2特異的T細胞の中でも、肝臓局所に浸潤したCD28陰性細胞がPBCにおける免疫応答において重要な役割を担っていることが想定された。④PBCにおける胆管上皮細胞障害の機序の一つとして、PDC-E2特異的IgAがPBC患者の胆管上皮細胞内に取り込まれ、PDC-E2と複合体を形成し、PBCの病因に関与している可能性が想定された。以上、本年度の研究により、PBCの発症機序、抗核膜抗体出現機序、および胆管上皮細胞障害の機序を示唆する成績が得られた。

共同研究者

下田慎治、福嶋伸良、谷本博徳、河野 聡、
上平幸史（九州大学大学院病態修復内科学）
中村稔（国立病院長崎医療センター）

海外共同研究者

Gershwin M.E.(米国カリフォルニア大学)

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）は胆管上皮細胞が障害を受けることにより慢性胆汁うっ滞を来し、一部の症例は肝硬変へと進行する難治性の自己免疫性肝疾患である。本疾患は疾患特異的ながら臓器非特異的な抗ミトコンドリア抗体（AMA）の出現を特徴とし、さらに約1/3の患者が抗核抗体陽性を呈する。

我々は、AMAの主たる標的蛋白であるピルビン酸脱水素酵素E2コンポーネント（PDC-E2）に特異的なCD4+ T細胞クローンを樹立し、抗ミトコンドリア抗体対応抗原のひとつであるPDC-E2におけるエピトープの解析、クローンのT細胞受容体（TCR）の解析、患者・健常者間の頻度の比較、微生物由来抗原などのmimicry peptideとの交差反応性、さらには、ペプチド療法への応用のためのアナログペプチドとの反応性などを検討してきた。その結果、AMAの主要対応抗原であるPDC-E2特異的T細胞クローンは、human PDC-E2 163-176をHLA DR53拘束性に認識する。このクローンには外来抗原である大腸菌OGDC-E2 34-47と交差反応性を示す株が存在することから、このことはPBCと大腸菌感染との関連を分子相同性の機序で説明する手がかりとなる。さらに大腸菌OGDC-E2 34-47 ペプチドを刺激抗原として樹立したクローンは、human PDC-E2 などの自己抗原に対しても交差反応性を示し、分子相同性およびepitope spreadingの機序により複数の自己抗体が出現する可

能性等を明らかにし、報告してきた。

最近の研究により、多発性硬化症や慢性関節リウマチ患者末梢血中にCD28- CD4+ T cellが増加しており、病態形成・維持に関与する可能性が示唆されている。さらに、発症機序の一つとして、粘膜の局所にて惹起された免疫反応に引き続いて自己免疫反応が惹起され、発症することが示唆されている。このことから、同じ自己免疫疾患であるPBC患者における末梢血・肝浸潤リンパ球におけるCD28陰性CD4+T細胞の動態、特に標的細胞である胆管上皮細胞との作用を検討することは興味あることである。さらに、粘膜局所においてはIgAが主な抗体のアイソタイプであることから、IgA型AMAの発症機序あるいは組織障害機序への関与の可能性が考えられる。

以上の背景のもとに、本年度は次の項目について検討を行った。

1. PBC患者由来PDC-E2特異的T細胞クローンの抗核抗体対応抗原との交差反応性
2. 大腸菌抗原特異的T細胞クローンのヒトPDC-E2抗原認識様式
3. PBCにおけるCD28陰性 CD4+T細胞の意義
4. PBC発症におけるIgA抗体の関与

B. 研究方法

1. PBC患者由来PDC-E2特異的T細胞クローンの抗核抗体対応抗原との交差反応性
2名のPBC患者より計5株のヒトPDC-E2 163-176反応性T細胞クローンを樹立した。今までにPBC患者で出現することが報告されている抗核抗体に対応する様々なヒト核タンパク（NUP 214, SP 100, Centromere Protein C, GP 210, Lamin B receptor, Major centromere autoantigen B, or Nuclear pore glycoprotein P62）由来のペプチドPDC-E2 163-176

と分子相同性 (ExDK, EIExDモチーフ) を有するペプチド41種のペプチドを合成しPDC-E2 163-176反応性クローンとの交差反応性を検討した。

2. PBCにおける大腸菌抗原特異的T細胞のヒト

PDC-E2抗原認識様式

E.coli OGDC-E2 34-47特異的T細胞クローンを樹立し、同ペプチドおよびhuman PDC-E2 163-176の認識様式をより詳細に解析した。抗原提示細胞としてPBMCあるいはL cellを用いて、抗原特異的な増殖を³H-Thymidineの取り込みにて測定した。抗HLA-DP・DQ・DR抗体でブロックすることによりHLA拘束性を検討した。

3. PBCにおけるCD28陰性CD4+ T細胞の意義

FACSにて、PBC患者・健常者・慢性ウイルス性肝炎患者のPBMCのCD4+ T細胞中CD28陰性T細胞の頻度を比較した。肝臓浸潤リンパ球を肝移植時のレシピエント肝より採取し、同様にFACSにてCD28陰性CD4+ T細胞の頻度をPBC患者・慢性ウイルス性肝炎患者間で比較した。

4. PBC発症におけるIgA抗体の関与

バキュロウイルス発現システムによって、PDC-E2特異的な二量体のヒトIgA遺伝子組み換えモノクローナル抗体を2種類作成し、その特徴を解析した。

C. 研究結果

1. PBC患者由来PDC-E2特異的T細胞クローンの抗核抗体対応抗原との交差反応性

抗核抗体対応抗原の中から最低1株のヒトPDC-E2 163-176反応性クローンを活性化しうる8種類のペプチド抗原を同定し得た。5種類の核抗原はGP 210由来、1種類はNucleoporin NUP214由来、1種類はSP 100由来、そして1種類はCentromere protein C由来であった。それぞれのクローンで反応するペプチド抗原のパターンや程度はすべて異なっていた。また、Lamin B receptor、Nuclear pore glycoprotein p62あるいはMajor centromere autoantigen Bに反応するクローンは1株もなかった。

2. PBCにおける大腸菌抗原特異的T細胞クローンのヒトPDC-E2抗原認識様式

大腸菌 OGDC-E2 34-47は大腸菌抗原特異的T細胞クローンによって、HLA・DR53拘束性に認識された。

3. PBCにおけるCD28陰性CD4+ T細胞の意義

早期 (非肝硬変) のPBC患者では、他群と比し有意にCD28陰性CD4+ T細胞の頻度が高かった。PDC-E2特異的CD4+ T細胞クローン (以下PDC-E2・TCC) のCD28の発現の有無をFACSにて検討した。6株中4株はCD28の発現を認め、2株は発現を認めなかった。PDC-E2・TCCはすべてHLA-DR53拘束性であった。CD28陰性PDC-E2・TCCはcostimulation signalを有さないL cell-DR53 (HLA-DR53 transfected mouse L fibroblast) を抗原提示細胞 (APC) として、抗原特異的増殖を示したが、CD28陽性PDC-E2・TCCは、L cell-DR53をAPCとすると増殖不能であり、CD28陽性PDC-E2・TCCの増殖にはcostimulation

moleculeを要することが示唆された。CD28陽性PDC-E2・TCCは、増殖時 (APC: 抗原負荷 HLA-DR53陽性PBMC) にCTLA4を一過性に発現したが、CD28陰性PDC-E2・TCCでは発現しなかった。

抗原ペプチドを負荷した胆管上皮細胞 (HLA-DR53陽性PBC患者移植時のレシピエント肝より採取) との共培養後に、irradiated PBMCをAPCとして用いた場合のcloneの増殖反応を検討した。CD28陽性PDC-E2・TCCは抗原特異的増殖反応を失ったが、IL-2 100U/ml下では良好な増殖を示し、anergy状態にあると考えられた。一方、CD28陽性PDC-E2・TCCは抗原特異的増殖反応を保っていた。

4. PBC発症におけるIgA抗体の関与

作成した組み換え抗体が、元来の抗体が持つPDC-E2に対する特異性を保持していることを、ELISA、イムノプロットイング、Hep2細胞染色、肝組織免疫染色によって確認した。さらに多価免疫グロブリンレセプター (pIgR) を発現しているMDCK細胞を用いたトランスサイトーシスに関する実験によって、一つの遺伝子組み換えIgA抗体が、細胞質内のPDC-E2と同じ部位に高い割合で局在することが示された。

D. 考察

1. PBC患者由来PDC-E2特異的T細胞クローンの抗核抗体対応抗原との交差反応性

PBC患者由来PDC-E2特異的T細胞クローンは数種の抗核抗体対応抗原に対して交差反応性を示した。一般に自己抗体の出現を認めたとき、その自己抗原に特異的な免疫応答が生体内で惹起されていると考えられる。しかし、PBCにおける複数の自己抗体の同時性出現を考えた場合、生体内におけるミトコンドリア特異的抗原の認識に引き続き、分子相同性の機構によって核抗原に対する免疫反応が誘発され、抗核抗体も同時に産生されている可能性が考えられた。

2. PBCにおける大腸菌抗原特異的T細胞クローンのヒトPDC-E2抗原認識様式

大腸菌 OGDC-E2 34-47は明らかにHLA・DR53拘束性に認識される。しかし抗DR抗体にて抑制されず、またDR53を有しないPBMCでも増殖がみられることから、他のHLA (DP or DQ) にも拘束性があると考えられた。Human PDC-E2 163-176はDR53拘束性ではなくDP拘束性に認識された。健常人と比べてPBC患者の末梢血および肝臓においてE.coli OGDC-E2 34-47特異的T細胞の頻度が高いことから、このT細胞の多様なペプチド認識様式がPBCの発症に関与している可能性が考えられた。

3. PBCにおけるCD28陰性CD4+ T細胞の意義

肝臓浸潤リンパ球中のCD28陰性CD4+ T細胞の頻度は有意に増加しており、特に障害胆管周囲にCD28陰性CD4+ T細胞がみられた。PDC-E2特異的CD4+ T細胞クローン (PDC-E2・TCC) 6株中4株はCD28の発現を認め、すべてHLA-DR53拘束性であった。

CD28陰性PDC-E2・TCCはcostimulation signalを有さないL cell-DR53を抗原提示細胞 (APC) として、抗原特異的増殖を示す一方、CD28陽性PDC-E2・TCC

の増殖にはcostimulation moleculeを要することが示唆された。

CD28陽性PDC-E2・TCCはCD28陰性PDC-E2・TCCと異なり、増殖時(APC:抗原負荷 HLA-DR53陽性PBMC)にCTLA4を一過性に発現した。HLA-DR53陽性PBC患者移植時のレシピエント肝より採取し、抗原ペプチドを負荷した胆管上皮細胞の共培養後に、PBMCをAPCとして用いてクローンの増殖反応を検討した結果CD28陽性クローンは抗原特異的増殖反応を失ったが、IL-2存在下では良好な増殖を示したことから、anergy状態にあることが想定された。一方、CD28陰性クローンは抗原特異的増殖反応を保っていたことより、CD28陰性PDC-E2特異的T細胞クローンはPBCにおける免疫応答において重要な役割を担っていることが想定された。

4. PBC発症におけるIgA抗体の関与

遺伝子組み換えIgA抗体が、細胞質内のPDC-E2と同じ部位に高い割合で局在することが示されたことよって、PDC-E2特異的IgAがpIgRを介してPBC患者の胆管上皮細胞内に取り込まれPDC-E2と複合体を形成し、PBCの病因に関与している可能性が想定された。この組み換え抗PDC-E2モノクローナル抗体は、PBCの病因における抗PDC-E2 IgA抗体の役割を決定するのに有用な手段となると考えられる。

E. 結論

①PBC患者に、AMAのみならず抗核抗体も同時に出現する現象の機序として、ミトコンドリア抗原分子と核抗原分子との間にみられる相同分子のCD4+T細胞による交差認識が関与している可能性が示唆された。

②大腸菌抗原特異的T細胞はヒトPDC-E2 163-176ペプチドも認識し、同T細胞の多様なペプチド認識様式がPBCの発症に関与している可能性が考えられた。

③PDC-E2特異的T細胞クローンの中でも、肝臓局所に浸潤したCD28陰性細胞がPBCにおける免疫応答において重要な役割を担っていることが想定された。

④PBCにおける胆管上皮細胞障害の機序の一つとして、PDC-E2特異的IgAがPBC患者の胆管上皮細胞内に取り込まれ、PDC-E2と複合体を形成する可能性が想定された。

以上、本年度の研究により、PBCの発症機序、抗核抗体出現機序、および胆管上皮細胞障害の機序を示唆する成績が得られた。

F. 研究発表(学会発表)

1) 下田慎治、中村稔、重松宏尚、谷本博徳、河野聡、上平幸史、林田一洋、石橋大海
PBC患者から樹立したPDC-E2特異的クローンの抗核抗体対応抗原との交差反応性について、第38回日本肝臓学会総会、大阪、2002.6.13

2) 増田淳一、大曲勝久、大場一生、坂座真博明、角川淑子、木下秀樹、林田研司、林田一洋、石橋大海、中沼安二、河野 茂：原発性胆汁性肝硬変(PBC)における2-oxo-acid dehydrogenase complexに対す

るIgA class抗体出現と組織学的進行度の関係、第38回日本肝臓学会総会、大阪、2002.6.13

3) 下田慎治、中村稔、石橋大海、半田瑞樹、上平幸史、河野聡、原田実根：原発性胆汁性肝硬変の自己抗原反応性のCD28分子発現について、日本免疫学会、東京 2002.12.4

4) 河野 聡、下田慎治、中村 稔、上平幸史、半田瑞樹、林田一洋、石橋大海、原田実根：原発性胆汁性肝硬変(PBC)における大腸菌抗原特異的のHLA拘束性の多様性、日本免疫学会、東京 2002.12.4

5) 上平幸史、下田慎治、河野聡、半田瑞樹、林田一洋、原田実根、中村稔、石橋大海、松下祥：原発性胆汁性肝硬変(PBC)患者におけるCD28陰性 CD4+ T細胞の増加とCD28陽性CD4+T細胞との性質の差異について、日本免疫学会、東京 2002.12.4

G. 研究発表(誌上発表)

1. Fukushima N, Nalbandian G, Van de Water J, White K, Ansari AA, Kenny T, Kamita SG, Hammock BD, Coppel RL, Stevenson F, Ishibashi H, Gershwin ME: Characterization of recombinant monoclonal IgA anti-PDC-E2 autoantibodies derived from patients with PBC. *Hepatology* 36:1383-1392, 2003

2. Tanimoto H, Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Kawano A, Kamihira T, Matsushita S, Gershwin ME, Harada M: Promiscuous T cells selected by E. coli antigen in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmunity*, 2003 in press

3. Ishibashi H: Cloning of murine PDC-E2 gene and generation of PDC-E2 over-expressing cell line - a key step to clarify the pathogenesis of PBC? *J Gastroenterology* 37(6):494-495, 2002

4. Dohmen K, Shigematsu H, Miyamoto Y, Yamasaki F, Irie K, Ishibashi H: Atrophic corpus gastritis and Helicobacter pylori infection in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 47: 162-169, 2002

5. Yano K, Kato H, Morita S, Ishibashi H, Furukawa R: Is bezafibrate histologically effective for primary biliary cirrhosis? *Am J Gastroenterol* 97 (4): 1075-1077, 2002.4.

6. Ishibashi H, Shimoda S, Shigematsu H, Nakamura M. Induction of T cell Anergy by Antigen Peptide Analogue in Primary Biliary Cirrhosis. In: *General Aspects of Molecular Biology and Immunology for the treatment of Intractable Liver Diseases*, Tsuji T, Meyer zum Büchenfelde KH (eds), Tokyo: Elsevier Science BV, pp255-261, 2002

7. Gershwin ME, Nishio A, Ishibashi H, Lindor KD: Primary biliary cirrhosis. In *Liver Immunology* (Gershwin ME, Vierling JM, Manns MP (eds), Hanley & Belfus, Inc. Philadelphia, pp311-327, 2002

8. Ishibashi H, Nakamura M, Shimoda S,
Gershwin ME: T cell immunity and primary
biliary cirrhosis. *Autoimmunity Reviews* 2(1): 19
– 24, 2003

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

抗ミトコンドリア抗体及び食道静脈瘤発現とPBCstaging, polyIC投与による自己免疫性胆管炎マウスの作戦

研究協力者 恩地 森一 愛媛大学医学部 第三内科

研究要旨：(1)抗ミトコンドリア抗体陰性の原発性胆汁性肝硬変について新規ELISAキット、Immunoblot法でPDC抗体の検索を行った。Immunoblot法でのみ陽性のPBCが存在し、またすべてのPDC抗体陰性のPBCが存在する。(2)食道静脈瘤を合併した無症候性PBCについての臨床病理学的な検討を行った。Varixを合併したPBCは予後が不良で、6症例のうち3例が症候性PBCに移行し、varixを考慮したPBCの病期分類の必要性が示唆された。(3) poly IC投与による自己免疫性胆管炎モデルマウスの作成。C57BL/6マウスに対して、polyI:Cを週2回腹腔内投与。胆管周囲を主体とした門脈周囲への単核細胞浸潤が観察された。

1) 抗ミトコンドリア抗体陰性の原発性胆汁性肝硬変に関する検討

A. 研究目的

通常のIIF法でのAMAが陰性のPBCが存在することが知られているが、新たに作成されたELISA法、Immunoblot法での検討をまだ少なく、その臨床的な特徴および臨床像についての検討を行った。

B. 研究方法

組織学的にPBCと診断されるが、IIF法で陰性の14人のPBCについて、従来のELISAキット、新規のELISAキットおよびImmunoblot法でのPDC抗体の検索を行った。Immunoblot法については抗原の供与および手技の御指導は帝京大学宮川浩先生を頂いた。

C. 研究結果

14例のIIF法陰性PBCのうち、immunoblot法で陽性になったものが10例、10例のうち従来のELISAキットで陽性が4例、新規ELISAキットで2例が新たに陽性となり6例で、ELISA法では陰性でimmunoblot法でのみ陽性が4例。

D. 考察

IgGクラス以外も測定可能になった新規のELISAキットによって、新たにPDC抗体陽性となるPBCがあるが、Immunoblot法でのみ陽性になるPBCもあり、またすべてのPDC抗体が陰性のPBCも存在することが確認された。Immunoblot法での検索は今後も必要であることが示唆されると同時に依然としてPDC抗体陰性PBCがあることも念頭においておく必要があると思われる。

E. 結論

Immunoblot法でのPDC抗体検索は今後必要であり、PDC抗体陰性のPBCも存在する。今後さらに症例を積み重ねて検討を行う予定である。

2) 食道静脈瘤発現を考慮に入れたPBC stagingについて

A. 研究目的

現在の病期分類では無症候性PBCになるが、繰り返しVarix治療のため入院が必要となるPBCが存在する。そこで varixを合併したa-PBCの臨床病理学的検討を行った。

B. 研究方法

当科で診断をおこった112症例のPBC患者のうち、a-PBCにもかかわらず、varixを合併したPBC症例とvarixを合併しないa-PBC症例で臨床病理学的検討を行った。

C. 研究結果

Varixを合併したa-PBCは6症例であった。6例のうち3例が3年後s-PBCに移行した。Varixを合併したa-PBCは生命予後が不良であった。

D. 考察

従来の病期分類ではa-PBCに分類されるも、門脈圧亢進症に伴うPBCでは繰り返し入院治療が必要となる症例があり、問題となっている。本研究でもvarixを伴う無症候性PBCは高頻度に症候性PBCになること、生命予後も不良であることから、従来の病期分類に加えてvarixを考慮する必要性が示唆された。

E. 結果

従来の病期分類に加えて、varixも考慮した病期分類の必要性が示唆された。

3) Polyinosinic polycytidylic acid(polyI:C)投与によるマウス自己免疫性肝疾患

A. 研究目的

当科において、以前より、18ヶ月齢以降の雌性C57BL/6マウスに原発性胆汁性肝硬変(PBC)類似の胆管炎が自然発症することを報告してきた。一方、自己免疫疾患でインターフェロン投与による増

悪、発症が報告されている。そこで、1型インターフェロンの誘導作用を持つPolyinosinic polycytidylic acid polyI:Cの投与が、C57BL/6マウスの胆管病変に与える影響を検討した。

B. 方法

C57BL/6マウスに、polyI:Cを週2回、4ヶ月間腹腔内投与。コントロール群には、等量のPBSを投与した。投与後、経時的に肝の組織学的検討を行った。

C. 結果

投与開始後、2ヶ月時点から、経時的に増強する胆管周囲を主体とした門脈周囲への単核細胞浸潤が観察された。

D. 考察

自己免疫疾患において、血清 α -インターフェロンの高値、病変組織中でのインターフェロン産生細胞の存在が近年報告されている。また、PBC患者においても、インターフェロン投与による増悪、発症が報告されている。1型インターフェロンを誘導するPoly.ICの投与によって、胆管病変が早期に発症、増悪することが示唆された。

E. 結果

polyI:Cの投与によって、C57BL/6マウスに自己免疫性肝疾患の発症が早期に誘導されることが示唆された。

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

肝内胆汁うっ滞疾患における肝組織中アルカリフォスファターゼ(ALP)の局在の検討

研究協力者 向坂彰太郎 福岡大学医学部第3内科

研究要旨：胆汁うっ滞性疾患の肝組織におけるアルカリフォスファターゼ(ALP)の局在を検討した。対象)原発性胆汁性肝硬変(PBC)9例、C型慢性肝炎10例、正常肝2例であった。方法)肝凍結切片に、抗ヒトALP抗体及び蛍光色素標識2次抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。結果)正常肝、C型慢性肝炎では、ALPは肝細胞膜のapical siteと門脈域の胆管の内腔側に認められた。PBCでは、ALPは肝細胞膜のapical siteとbaso-lateral siteならびに門脈域の胆管細胞の細胞質全体に認められ、正常肝、C型慢性肝炎との肝内ALP局在の相違が認められた。

A. 研究目的

アルカリフォスファターゼ(以下ALP)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(以下 γ -GTP)は、胆汁うっ滞性肝疾患の臨床マーカーとして診療の場で広く用いられている。しかし、これらの酵素の肝組織における局在や、さらに、各種病態における機能については明確でない。胆汁うっ滞性疾患における血清ALPの上昇の機序としては、胆管内圧の上昇による毛細胆管膜上のtight junctionの破綻、細胞障害性胆汁酸による誘導などが推定されているが、詳細は不明である。一方、ALPには胆汁分泌を抑制する作用や、胆管腔を縮小させる作用、 γ -GTPを誘導する作用が知られているが、その機能についても不明な点が多い。また、これらの実験報告はほとんどが動物実験によるものであり、人間の肝組織における検討は極めて少ない。人間の肝組織において、疾患による障害部位や機序の相違を解明する事は、疾患の病態を理解する上で非常に有用であると考えられる。今回我々は、胆汁うっ滞疾患の肝組織におけるALPの局在を検討した。

B. 研究方法

対象は、原発性胆汁性肝硬変(PBC)9例、C型慢性肝炎10例、正常肝2例の肝生検標本を用いた。アセトン固定肝凍結切片に、抗ヒトALP抗体及び蛍光色素標識2次抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ALPの局在を評価するために、DPPIV, Na-K ATPase, サイトケラチン19との二重染色を施行した。

C. 研究結果

正常肝、C型慢性肝炎では、ALPは肝細胞膜のapical siteと門脈域の胆管の内腔側に認められた。PBCでは、ALPは肝細胞膜のapical siteとbaso-lateral siteの両側と門脈域の胆管細胞全体に認められ、正常肝、C型慢性肝炎との肝内ALPの局在の相違が認められた。

D. 考察

本研究は、胆汁うっ滞状態下におけるALPのヒト

肝組織内の超微形態の観察である。今回の検討では、PBCにおける肝組織内ALPの局在は正常肝、C型慢性肝炎と異なる分布を示し、また、その発現が亢進している事が確認された。局在の変化については、胆管内圧の上昇によって毛細胆管膜上のtight junctionが破綻し、ALPが肝細胞膜のapical siteからbaso-lateral siteに移行した可能性が考えられる。また、胆汁うっ滞時には肝細胞のpolarityの変化がみられる事に伴う変化とも解釈できる。ALPの発現の増強については、何らかの機序によりALPが誘導されている可能性が想定される。今後、肝組織内蛋白の定量的評価と、mRNA発現の評価を行い、検討を進めていく予定である。

以上の事により、私共の研究室でこれまで研究されてきた肝細胞の各種トランスポーターやtight junctionの変化と、ALPや γ -GTPなどの胆道系酵素との関連を総合的に理解できるようになり、従来より臨床マーカーとして広く普及し、すべての医学書に記載されている両酵素の肝における意義を初めて理解できるようになる。また、それにより将来、このような難治性肝疾患の治療の開発にむすびつける事ができると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表
肝内胆汁うっ滞疾患における肝組織中アルカリフォスファターゼ(ALP)の局在の検討
第11回肝病態生理研究会(2003年5月21日
予定)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

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

原発性胆汁性肝硬変における胆管上皮細胞特異的遺伝子発現の解析

研究協力者 白鳥 康史 岡山大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変(PBC)の胆管上皮細胞(BEC)に特異的に発現されている遺伝子の解析を試みた。1) Laser captured microdissectionにより選択的にBECを採取し、total RNAを抽出、T7 RNA polymeraseにより増幅後、DNA microarrayを用いて解析した。約1000個のBECからaRNAの増幅及びDNA microarrayによる解析が可能であった。2) BEC特異的に発現する分子の一つとして、stromal derived factor-1(SDF-1)を同定した。SDF-1は正常肝では陰性または微弱の発現であるが、種々の肝疾患において発現が増強されていた。末梢血中のSDF-1濃度はPBCを含む肝疾患において増加していた。また肝内浸潤リンパ球はSDF-1のレセプターであるCXCR4を高発現していた。以上より、SDF-1/CXCR4は炎症細胞の遊走及び胆管障害に関与している可能性が示唆された。

共同研究者

山本 和秀、岩崎 良章

A. 研究目的

1) Laser capture microdissection (LCM)/DNA microarrayによる遺伝子発現解析

原発性胆汁性肝硬変(PBC)の胆管上皮細胞(BEC)における標的抗原を同定する目的で、BEC特異的に発現されている遺伝子を検討する。ヒトの肝組織よりBECを純粋に集め解析することは従来困難であったが、LCMが開発され、単一の細胞レベルで細胞を回収することが可能となった。^{1,3)} またPCRやRNA amplificationとDNA microarrayを用いることで、微量mRNAの解析が可能となっている。そこで、正常およびPBCのBECを選択的に集め、両者を比較することでPBCのBECに特異的に発現されている遺伝子を解析することを試みる。

2) Stromal derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4発現の検討

SDF-1は造血、B細胞分化、リンパ球の遊走に重要なケモカインであるが、^{4,5)}肝組織における発現について知られていない。またSDF-1に対するレセプターはCXCR4であり、末梢血リンパ球及び肝組織中リンパ球における発現を検討する。

B. 対象と方法

1) LCM/DNA microarrayによる解析

微量サンプルからのマイクロアレイの解析のため、polymerase chain reactionによる指数関数的増幅ではなく、T7 RNA polymeraseを用いた線形増幅を利用した。この方法による微量RNAの増幅について、human ovary RNAを用いて基礎的検討を行った。またC型慢性肝炎およびPBCの肝生検組織を用いて凍結切片を作成し、70%エタノール固定後、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、LCM (Arcturus Engineering, Inc.)によりBECを選択的に収集した。採取組織よりtotal RNAをtotal RNA Microprep kit

(Stratagene)を用いて抽出し、oligo dT primer (SuperScript, Life Technologies)を用いてcDNAに変換した。その後、T7 RNA polymerase (Ambion)を用いてantisense RNA (aRNA)を作成した。ランダムプライマーを用いてcDNAに変換時に蛍光色素でラベルしDNA Microarray (Takara IntelliGene Human Chip)にハイブリダイズした。

2) SDF-1/CXCR4発現の検討

正常肝、PBC、自己免疫性肝炎、ウイルス性肝炎肝組織のパラフィン包埋切片を作成し、抗原賦活化後、抗SDF-1、抗CD4、抗CD8、抗CD79a抗体と反応後、Envision (DAKO)を用いて免疫染色した。またLCMを用いてBECのみを採取し、RT-PCRによりSDF-1のメッセージ発現を検討した。さらに正常及びPBCを含む各種肝疾患の血中SDF-1濃度をELISAにより検討した。

またPBC、自己免疫性肝炎、ウイルス性肝炎症例について、末梢血(PBL)及び肝生検組織浸潤リンパ球(LIL)を分離し、flow cytometryによりCD19+B細胞、CD3+T細胞におけるCXCR4の発現を解析した。

C. 研究結果

1) LCM/DNA microarrayによる解析

LCMにより生検肝組織よりBECのみを採取することが可能で、1症例から約1000個のBECが採取された。

total RNAを抽出、cDNAに変換後T7 RNA polymeraseによる増幅によりhybridizationに使用するprobeの作成が可能であった。またT7 RNA polymeraseによる増幅は元の遺伝子プロファイルを大幅には変化させないことが示された。

現在、PBC及び正常肝のBECにおける遺伝子発現プロファイルを比較検討し、PBCのBECに特異的に発現している遺伝子を解析中である。

2) SDF-1/CXCR4発現の検討

免疫染色では、SDF-1の発現は正常肝では陰性ないし弱陽性であった。一方、PBC肝ではBEC特異的に発