

小児 SLE 診断の手引き (厚生省小児膠原病研究班, 1986)

- 1 顔面蝶形紅斑
- 2 円板状紅斑
- 3 光線過敏症
- 4 口腔潰瘍
- 5 関節炎
- 6 胸膜炎または心膜炎
- 7 痙攣または精神病
- 8 蛋白尿または細胞性円柱
- 9 溶血性貧血または白血球減少またはリンパ球減少または血小板減少
- 10 LE 細胞または抗 DNA 抗体または抗 Sm 抗体または梅毒反応生物学的偽陽性
- 11 蛍光抗体法による抗核抗体
- 12 血清補体価の低下

*上記のうち4項目以上を満たす場合には SLE の可能性が高い。

AIH 治療に対する反応の定義 (International Autoimmune Hepatitis Group, 1993)

● 該当する□ にチェックしてください

| 治療に対する反応 | 定義 |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 完全寛解 | <input type="checkbox"/> 1年以内に、症状の著明な改善がみられ、AST or ALT, T-Bil, IgG が完全に正常化し、その後6か月間維持した。 <input type="checkbox"/> 上記項目の期間内の肝生検組織で、大部分は minimal activity の病変であった。 <input type="checkbox"/> 1か月以内に、症状の著明な改善がみられ、AST or ALT, T-Bil, IgG が治療前値と正常上限との差の50%以上改善し* (注: 下記参照)、かつ6か月以内に正常値の2倍以下まで低下した。 <input type="checkbox"/> 1年以内の肝生検組織で、minimal activity のみの病変であった。 |
| 部分寛解 | <input type="checkbox"/> 治療後2か月以内に、症状の改善がみられ、AST or ALT, T-Bil, IgG が治療前値と正常上限との差の50%以上改善し、その後も改善が認められるが、1年後でいまだ AST, ALT が完全には正常化していない。 <input type="checkbox"/> 6か月以内に、症状の改善と AST or ALT, T-Bil, IgG の正常化を認めるが、肝生検組織ではまだ活動性の病変が持続している。 |
| 無反応 | <input type="checkbox"/> 1か月間の治療で症状が改善したにもかかわらず、AST or ALT, T-Bil, IgG が治療前値の50%以上を示す。 <input type="checkbox"/> AST or ALT, T-Bil, IgG の値にもかかわらず、標準的な治療を6か月間行った後の肝生検組織で活動性に变化を認めない。 <input type="checkbox"/> 最初の1~2か月中に AST or ALT, T-Bil, IgG の50%以上の改善を認めるが完全には正常化せず、ステロイドの増量や症状の改善の有無にかかわらず、6か月までにさらなる改善が認められない。 |
| 治療失敗 | <input type="checkbox"/> 疾患の活動性を示すいくつかの項目における改善にもかかわらず、患者の状態が悪化する。 |
| 再燃 | <input type="checkbox"/> 完全寛解後、AST or ALT が正常上限値の2倍以上に再上昇する。 <input type="checkbox"/> 完全寛解後の肝生検組織で活動性病変を認める。 <input type="checkbox"/> 完全寛解後、AST or ALT が上昇し、免疫抑制剤の増量を考慮するのに十分な重度の症状の再出現を認める。 |

(注) 治療前値と正常上限との差の50%以上改善し*: 例えば、治療前の AST が 500IU/l、正常値が 50IU/l の場合、その50%改善値は 275IU/l となる。

III-2. 自己免疫性肝炎

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝疾患におけるレドックス動態の解析

主任研究者 戸田剛太郎 東京慈恵会医科大学内科学講座消化器・肝臓内科 教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変症（PBC）では胆管細胞や肝細胞に酸化ストレス関連物質が過剰に存在することが免疫組織学的検討により示され病態形成への酸化ストレスの関与が示唆されている。筆者らはPBC患者の血中酸化ストレスマーカー8-OHdG、抗酸化物質Mn-SOD、TRXを測定し病態との関連を検討した。また自己免疫疾患の発症に関与するとされるGSTアイソフォーム遺伝子型を解析した。PBC患者の血中8-OHdG、Mn-SOD、TRXは健常人に比しいずれも有意に高値だった。Mn-SOD、TRXはALP、AST、IgMと正の相関を認め、Mn-SODとTRXは正の相関を認めた。またUDCA治療反応例は抵抗例に比し治療前のMn-SODが有意に高値だった。一方GSTアイソフォーム遺伝子型はPBCと健常人で差を認めず、PBCのGSTT1、GSTM1遺伝子欠損群と非欠損群の病態は差異がなかったが、GSTM1、GSTT1遺伝子両欠損群は非欠損群に比しAMA高力価症例が占める割合が有意に高かった。以上よりPBCでの血中酸化ストレス関連マーカー測定の臨床的意義が示され、GSTアイソフォームの遺伝子欠損がPBCの病態に関与する可能性が示唆された。

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 講師

小室 理

東京慈恵会医科大学内科学講座
消化器・肝臓内科 助手

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変症（Primary biliary cirrhosis：PBC）の病態形成機序の詳細は明らかでない。近年、慢性関節リウマチをはじめとする自己免疫疾患において、生体内で生じた酸化ストレスが病態形成に関与することが報告され注目されている。PBCにおいても胆管細胞に対する自己免疫応答が病態形成に関わると考えられていることから、他の自己免疫疾患と同様に酸化ストレスが病態に関わる可能性がある。また慢性C型肝炎などの肝疾患においても酸化ストレスが病態形成に関与することが報告されており、そうした点からもPBCの病態と酸化ストレスの関連は興味深い。

近年こうした酸化ストレス反応に関与する分子として、酸化ストレス状態を反映する活性酸素種による修飾化合物の8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OHdG）、ヒドロキシ-2-ノネナール（HNE）、マロンジアルデヒド（MDA）、活性酸素種の作用を抑制する抗酸化物質のスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）、チオレドキシシン（TRX）などが同定された。これらの分子の一部は血中でも測定できるため、生体内の酸化ストレス動態を末梢血採血により評価することが可能となった。またGSTには遺伝子型が存在し遺伝子型の差異が自己免疫疾患の発症に関与することが報告され、酸化ストレス関連因子が遺伝的にも自己免疫疾患の発症

に関与する可能性が示された。

以上の事実を背景に筆者らはPBC症例の末梢血中の酸化ストレスマーカー8-OHdG、抗酸化物質Mn-SOD、TRXを測定しそれらの血中動態とPBCの病態の関連を解析するとともに、GSTの遺伝子型と病態の関連も解析した。

B. 研究方法

対象は東京慈恵会医科大学附属病院消化器・肝臓内科を受診し肝生検にてPBCと診断された74例（男性6例、女性68例、平均年齢57.4±11.8歳）と健常人60例（男性18例、女性42例、平均年齢57.4±11.8歳）である。これらの症例は全例ウルソデオキシコール酸（UDCA）治療を受けており、治療によりALP値が正常化した症例および治療前値の半分以下に低下した症例を治療反応例、それ以外を治療抵抗例とした。

各症例の治療前の血清を用いELISA法により血中8-OHdG、Mn-SOD、TRXをそれぞれ測定した。測定には8-OHdG高感度測定キット（日本老化制御研究所、静岡）、Mn-SOD ELISA SYSTEM RPJ301（日本油脂株式会社、東京）、TRX ELISAキット（富士レビオ社、東京；京都大学ウイルス研究所・淀井淳司博士、中村肇博士より供与）を用いた。

GSTM1、T1の遺伝子型解析は各症例の末梢血単核球より分離したDNAを用いGSTM1のセンスプライマー5'-GAACTCCCT GAAAAGCTAAAGC-3'、アンチセンスプライマー5'-GTTGGGCTCAAATATAC GGTGG-3'、GSTT1のセンスプライマー5'-TTCCT CACTGGTCCTCACATCTA-3'、アンチセンスプライマー5'-TCACCGGAT CATGGCCAGCA-3'、β-globinのセンスプライマー5'-GAAGAGCCAAGGAC AGGTAC-3'、アンチセンスプライマー5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'を用いてPCRを行った。PCRは0.25mM dNTP、1.5 unitのTaq polymerase（タカラ酒造、東京）、5 pmolの各プライマー、300ng

のサンプルDNAを含有した検体を用いParkin Elmer社のサーマルサイクラーにより35サイクル(94°C1分、55°C45秒、72°C1分)で行った。得られたPCR産物を1 μ g/mlのエチジウムブロマイドを含有する2.5%アガロースゲルを用いて泳動し219bpのGSTM1、480bpのGSTT1を検出しGSTM1、GSTT1の有無を検討した。

測定値は平均値±標準偏差(mean±S.D.)で表記した。有意差検定は2群間の比較はMann-WhitneyのU検定あるいは χ^2 検定にて行い、測定値間の相関性はPersonの相関係数により検討した。P<0.05を統計学的有意差ありと評価した。

なお本研究は東京慈恵会医科大学倫理委員会ならびにヒトゲノム遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得て行い、検体採取に際しては患者に研究内容を文書により説明し署名同意を得た。

C. 研究結果

1) 血中8-OHdGの動態と病態との関連

PBC症例の血中8-OHdG値は健常人に比し有意に高値であった(p<0.001)。血中8-OHdG値と血中ALP、AST、IgG、IgM値間の有意な相関はいずれも認めなかった。また肝硬変の有無、UDCA治療の有効性の有無、抗ミトコンドリア抗体(AMA)抗体価の多寡、他の自己免疫性疾患合併の有無といった病態と血中8-OHdG値の関連は認めなかった。

2) 血中Mn-SODの動態と病態との関連

PBC症例の血中Mn-SOD値は健常人に比し有意に高値であった(p<0.001)。血中Mn-SOD値は血中ALP、AST、IgM値とそれぞれ有意な正の相関を認めた(p<0.01)。また肝硬変の有無、他の自己免疫疾患合併の有無による血中Mn-SOD値の差異は認めなかったが、UDCA治療反応例は抵抗例に比し治療前の血中Mn-SOD値が有意に高かった(p<0.01)。

3) 血中TRXの動態と病態との関連

PBC症例の血中TRX値は健常人に比し有意に高値だった(p<0.001)。血中TRX値は血中ALP、IgM、IgG値とそれぞれ有意な正の相関を認めたが(p<0.05、p<0.01、p<0.05)、ALT値とは相関を認めなかった。また肝硬変の有無、UDCA治療の有効性の有無、AMA抗体価の多寡、他の自己免疫性疾患合併の有無といった病態と血中TRX値の関連は認めなかった。

4) 血中8-OHdG、Mn-SOD、TRX値の相関

血中8-OHdG値とMn-SOD値、TRX値の間にはそれぞれ相関を認めなかったが、血中Mn-SOD値とTRX値の間には有意の正の相関を認めた(p<0.001)。

5) GSTM1、T1の遺伝子欠損と病態の関連

PBC症例でGSTM1遺伝子欠損者、GSTT1遺伝子欠損者が占める割合はそれぞれ43.2%、39.1%で、健常人の45.0%、43.4%と比べ有意差はなく、GSTM1、GSTT1遺伝子両方の欠損者の割合も有意差はなかった。PBC症例のGSTM1遺伝子欠損者群、非欠損者群の病態を比較したところ、血中酸化関連マーカー値、ALP値、IgM値、IgG値では差を認めなかったが、AMA抗体価が320倍以上の高値を示す症例が占める

割合はGSTM1遺伝子欠損者群の方が非欠損者群に比し多い傾向を認めた。GSTT1遺伝子欠損者群と非欠損者群の比較ではGSTM1と同様に血中酸化関連マーカー値、ALP値、IgM値、IgG値では差を認めないが、AMA抗体価が320倍以上の高値を示す症例が占める割合はGSTT1遺伝子欠損者群の方が非欠損者群に比し多い傾向を認めた。またGSTM1、GSTT1遺伝子の両方を欠損する症例群の血中酸化関連マーカー値、ALP値、IgM値、IgG値はいずれかが非欠損の症例群に比し差を認めないが、AMA抗体価が320倍以上の高値を示す症例が占める割合はいずれかが非欠損の症例群に比し有意に高値であった。

D. 考察

今回の検討によりPBCでは酸化ストレス関連マーカーが上昇し、その一部は病態を反映することが明らかにされたが、いかなる機序でこれらが上昇するかは不明である。今後はこれら酸化ストレス関連マーカーの肝内局在の検討を行い病態への関与の詳細を明らかにするとともに、肝内における発現の程度と血中の値とを比較検討し末梢血での検討により肝内の事象を的確に評価できるかを明らかにする必要があると思われる。またPBCでは酸化ストレス状態にあることが明らかになったが、肝線維化に中心的な役割を果たす星細胞におけるプロコラーゲン産生は酸化ストレス刺激により増強することが報告されており³⁰⁾、PBCで酸化ストレス状態が持続すると線維化が促進する可能性もある。したがってビタミンEなどの抗酸化物質を用いたPBCの新たな治療も考慮されるべきであろう。

E. 結論

PBCでは血中の酸化ストレス関連マーカーが上昇しその一部は病態を反映することが示され、PBCでは酸化ストレスが病態に関与することが明らかになり、血中酸化ストレス関連マーカー測定の臨床的意義が示された。また抗酸化物質GSTのアイソフォームの遺伝子欠損はPBCの疾患感受性には関与しないが、病態形成には関与する可能性が示された。

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

小室理, 高橋宏樹 他. 原発性胆汁性肝硬変症における血中酸化ストレス関連マーカーの動態 第40回日本消化器免疫学会 2003 8月 東京

論文

小室理, 高橋宏樹 他. 原発性胆汁性肝硬変症における血中酸化ストレス関連マーカーの動態およびGST遺伝子型と病態の関連 投稿中

自己免疫性肝疾患における抗carbonic anhydrase II抗体の臨床的意義の検討

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抗体価の測定において、今迄の報告例における測定条件では不適切であることが示唆された。これは市販の抗原中に微量の不純物が存在しているため、測定条件の設定を困難にしているためで、正確な臨床的意義が見出されていない。そこで、我々は精製した抗原を用いて至適測定条件を検討し、自己免疫性肝疾患患者血清中のIgG, IgM, IgA クラスの抗CA II抗体価の評価を行なった。その結果、正常者群と比較して、原発性胆汁性肝硬変 (PBC)、自己免疫性肝炎 (AIH) などの自己免疫性疾患症例群において各クラスの抗CA II抗体価に有意差がみられた。

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

Carbonic anhydrase II (CA II) に対する抗体が膠原病、自己免疫性の肝疾患や膵疾患において高率に出現する事が今迄に報告されている。ところが、報告例中の測定条件 (ELISA) は一定しておらず、さらに報告例に使用されている市販のCA II試薬中に、IgG様物質の混在が疑われ、過大評価が示唆された。そこで、Protein G Sepharose (Pharmacia Biotech社) によるIgG様物質の除去を試み、得られた粗精製CA IIから至適測定条件の決定を行った事を以前報告した。今回我々は、市販のCA II試薬を液体クロマトグラフィーにおいて精製した抗原を用いて、自己免疫性肝疾患患者血清中のIgG, IgM, IgA クラスの抗CA II抗体価の評価を行なった。

B. 研究方法

1) 市販のCA II (Sigma社) をPBSにおいて溶解後、Protein G Sepharose によるIgGを除去し、除去前後のものをSuperdex 75PC 3.2/30 (Pharmacia Biotech社) において各フラクション (Fr) に分取した。得られた各Frと、ウサギ抗CA II抗体を標準血清として反応させ、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体を反応させ、CA IIの含有しているFrを確認。2) 擬陽性患者血清と分取した各Frと反応させ、反応しているFrを確認、また分子量マーカーからIgG様物質の分子量を予測した。3) 精製CA II抗原 (10 µg/ml) を用いたELISAにおいて、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG, IgM, IgA抗体とそれぞれ反応させ、各クラスの抗CA II抗体価の測定を行った。対象は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) 2例、原発性硬化性胆管炎 (PSC) 3例、ウイルス性肝炎44例と正常人18例。

C. 研究結果

1) 除去前のCA IIの各Frと標準血清との反応により吸光度 (490nm) に2つのピークが確認され、除去後、

単一のピークとなった。2) 擬陽性患者血清と、除去後のCA IIでは反応は観られなかった。3) 患者血清でのELISAの結果、陽性 (正常者の平均値 + 2SD以上) は、IgGクラスの抗体は、AIH 16例中8例 (50.0%)、PBC 26例中11例 (42.3%)、AIC 2例中1例 (50.0%)、PSC 3例中2例 (66.7%)、ウイルス性肝炎44例17例 (38.6%)であった。IgMクラスは、AIH 37.5%、PBC 46.2%、AIC 50.0%、PSC 33.3%、ウイルス性肝炎29.5%、IgAクラスは、AIH 37.5%、PBC 57.7%、AIC 0%、PSC 33.3%、ウイルス性肝炎36.4%であった。PBC, AIHにおいて正常者群と比較して各クラスにおいても有意に陽性率が高かった。 ($P < 0.02$) 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。

D. 考察

胆管上皮細胞にCA II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抗CA II抗体価の上昇した症例が確認された。この事から、抗CA II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、サプレッサーあるいは、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

1) IgG様物質と考えたものは、CA IIにIgGの一部が結合したものであり、過大評価を誘引しているもので、抗原の精製操作は必須である。2) PBCにおいてIgAクラスが57.7%と高率にみられたものの、IgGクラスの抗体価が各疾患群に高い傾向を示した。3) 各クラスにおいてもウイルス性肝炎において、3割程度

の陽性検体がみられ、これらの疾患に共通した免疫異常が考えられた。今後さらに検体数を増やして検討していきたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Detection of autoantibody against carbonic anhydrase II in various liver diseases by enzyme-linked immunosorbent assay using appropriate conditions (Clinica Chimica Acta) 印刷中

2. 学会報告

第40回日本臨床検査医学会総会 (2003 10月)

参考文献

- 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., Quattrocioni-Longe, T.M., Khan, B.A., et al, 1995.
Antibodies to carbonic anhydrase in patients with immune cholangiopathies. Gastroenterology. 108, 1802 - 1809.
- Botre F, Botre C, Podesta E, Podda M, Invernizzi P.
Effect of Anti-Carbonic Anhydrase Antibodies on Carbonic Anhydrases I and II. Clin Chem 2003;49:1221-1223.
- Rouse BT, Deshpande S. Viruses and autoimmunity: an affair but not a marriage contract. Rev Med Virol 2002; 12:107-113.
- Wucherpfennig KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. J Clin Invest 2001;108(8):1097-1104.
- Kiechle FL, Quattrocioni-Longe TM, Brinton DA, Gordon SC, Sykes E, Elkhailifa MY.
Autoantibodies to Specific Enzymes: A Review. Ann Clin Lab Sci 1996;26:195-207.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

微生物由来CpG DNAを用いた新たな肝関連自己抗体の検索

研究協力者 佐藤由紀夫 福島県立医科大学医学部第二内科 教授

研究要旨：微生物由来のCpGモチーフを有するDNA (CpG DNA) は抗原提示細胞を刺激し多量のIL-12, IFN- α/β を産生させることによりTh1タイプの免疫を活性化する。近年、免疫活性化作用を有するCpG DNAは哺乳類のgenomeにも存在して自己のB細胞を活性化し、自己抗体の産生を誘導することが報告されている。よって、肝細胞由来の蛋白をCpG DNAとともにマウスに免疫することにより、肝関連自己抗体の産生を誘導できるかを検討した。その結果、肝細胞由来の多数の蛋白を認識する自己抗体が誘導され、これらの抗体が認識する自己抗原のひとつはcalreticulin (CR) であることが判明した。抗CR抗体は自己免疫性肝炎(AIH)で出現する自己抗体のひとつであることより、AIHで出現する自己抗体の産生にCpG DNAが関与している可能性が推定された。今後、未同定の自己抗原を解析することにより、新しいAIH関連自己抗体を同定できる可能性がある。

共同研究者

| | | |
|-------|--------------|----|
| 大平 弘正 | 福島県立医科大学第二内科 | 講師 |
| 阿部 和道 | 福島県立医科大学第二内科 | |
| 滝口 純子 | 福島県立医科大学第二内科 | |
| 雷 毅 | 福島県立医科大学第二内科 | |
| 小林 浩子 | 福島県立医科大学第二内科 | 助手 |

A. 研究目的

微生物genome中に存在するCpG DNA [非メチル化シトシンの次がグアニンであるモチーフ (CpG motif) を有するDNA] は直接哺乳類のB細胞、樹状細胞、単球を活性化して種々のTh1タイプの炎症性cytokine (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α) を産生させ、Th1タイプの免疫反応を引き起こすアジュバント作用を有することを、研究協力者は報告してきた (Sato Y, et al. Science, 1996)。

近年、Th1タイプのアジュバント作用を有するCpG DNAと自己免疫疾患との関連が注目されており、自己抗原をCpG DNAとともに免疫することにより自己抗原に対する免疫寛容が破綻し、自己抗体が産生されることが明らかにされている (Bachmaier K, et al: science 283, 1999)。また、免疫活性化作用を有するCpG DNAは哺乳類のgenomeにも存在して自己のB細胞を活性化し、自己抗体の産生を誘導することも報告されている (Leadbetter EA, et al. Nature, 2002)。

以上より、自己免疫性肝炎 (AIH) における自己抗体産生にもCpG DNAが関与するならば、肝細胞由来の蛋白をCpG DNAとともに免疫することにより、AIHで出現する肝関連自己抗体産生を誘導できる可能性がある。今回、ヒト肝細胞由来の蛋白をCpG DNAとともにマウスに免疫することにより、肝細胞由来の蛋白に対する抗体が産生されるかをWestern blotting法にて検討した。さらに、誘導された抗体が認識する蛋白のアミノ酸解析を行うことにより抗原を同定し、その抗原がAIHに出現する自己抗体と反応するかも検討した。

B. 研究方法

正常ヒト肝実質細胞 (Cryo hHEps) からcell fraction kits (Bio Vision) を用いて核成分および細胞質成分の分画を抽出し、抗原として用いた。8週齢のメスBALB/cマウスに50 μ gのCpG DNA (5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3')をアジュバントとして、肝細胞由来の抗原とともに3回皮下注射を行い免疫した。Western blotting法にて、免疫マウス血清およびAIH患者血清と肝由来蛋白抗原との反応を検討した。ついで、免疫マウス血清およびAIH患者血清が同じ泳動部位で反応する蛋白のアミノ酸解析を行い、抗原を同定した。

さらに、同定された蛋白抗原を用いてAIH、PBC患者血清との反応をELISA法にて解析した。

(倫理面への配慮)

実験動物は、当大学の実験動物取り扱い倫理指針を遵守して実験に使用した。

C. 研究結果

1. CpG DNAをアジュバントとした肝細胞由来の蛋白に対する抗体産生

CpG DNAをアジュバントとし、マウスにヒト肝細胞抗原と投与することにより、Western blotting法ではいくつかの抗体が新たに誘導されることが確認された。

2. 誘導された抗体が認識する蛋白のアミノ酸解析

これら抗体のうち、AIH患者血清と同部位に泳動される蛋白のアミノ酸解析の結果、N末端からDPAIYFKENLであり、蛋白抗原としてcalreticulin (CR) が同定された。

3. 抗CR抗体のELISA法による検討

CR蛋白を用いてELISA法にてIgGクラスの抗体陽性率について検討するとAIH 30% (15/50)、PBC 21.3% (10/47)、C型慢性肝炎12.5% (3/24)であった。

D. 考察

AIHの自己抗体に関する研究は、これまで数多くなされてきているが、本研究で用いた微生物由来のCpG DNAをアジュバンドとする自己抗体誘導法はこれまでに報告がない。CpG DNAは、従来アジュバンドとして広く用いられてきたcomplete Freund's adjuvant (CFA)と比較しても自己抗体の産生効率が約3倍高く、これまで検出されなかった自己抗体が新たに検出される可能性が高いと考えられる。

本研究にて、アジュバンド効果を有するCpG DNAをヒト肝細胞由来の抗原蛋白と共に免疫することにより、肝抗原と反応する新たな自己抗体がマウス血清中に検出された。これら自己抗体のうち、AIH患者血清とも反応する対応抗原としてCR蛋白が同定されたことは、非常に興味深い。

CR蛋白は、主として有核細胞の小胞体に存在するCa²⁺結合蛋白である。種々の機能がこれまでに報告されており、細胞内Ca²⁺調節のみならず、ステロイド関連遺伝子や接着分子の発現、T細胞の活性化に関与することが報告されている (Michalak M, et al. Biochem J, 1999)。

さらに、抗CR抗体は、既にSLEやSjögren症候群などの自己免疫性疾患において検出され、AIHやPBCにおいても40-60%の頻度で陽性となることが報告されている (Kreisel W, et al. Scand J Gastroenterol, 1999)。

今後、CR蛋白を含め、CpG DNAをTh1タイプのアジュバンドとして肝抗原と共に免疫することによって、肝細胞に対する免疫寛容を破綻させ、肝炎が誘発されることを明らかにできれば、AIHなどの自己免疫性肝疾患の発症機序の解明に微生物由来CpG DNAが関与していることの有力な証拠となると考えられる。また、この手法は、新たなAIH関連自己抗体の検索に有用と推定される。

E. 結論

微生物由来のCpG DNAをアジュバンドとし、肝細胞抗原と免疫することにより、マウス血清中にAIH患者血清にも検出される抗体の一つとして抗CR抗体が誘導された。今後もAIHにおける自己抗体の産生や発症機序とCpG DNAとの関連について検討する予定である。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし。

G. 研究発表

1. 発表論文

1. Shishido S, Koga H, Harada M, Kumenura H, Hanada S, Taniguchi E, Kumashiro R, Ohira H, Sato Y, Namba M, Ueno T, Sata M: hydrogen peroxidase overproduction in megamitochondria of troglitazone-treated human hepatocytes. *Hepatology* 37, 136-147, 2003.

2. Ohira H, Takeda J, Rai T, Shishido S, Sato Y. Two cases of primary biliary cirrhosis complicated with syringomyelia. *Am J Gastroenterol*, 98, 224-226, 2003.
3. Irisawa A, Obara K, Bhutani MS, Saito A, Shishido H, Shibukawa G, Takagi T, Yamamoto G, Seino O, Shishido F, Kasukawa R, Sato Y. Role of para-esophageal collateral veins in patients with portal hypertension based on the results of endoscopic ultrasonography and liver scintigraphy analysis. *J Gastroenterol Hepatol*, 18, 309-14, 2003.
4. Ohira H, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Rai T, Shishido S, Sato Y. Adhesion molecules and CXC chemokines in endotoxin-induced liver injury. *Fukushima J Med Sci*, 49 (1), 1-14, 2003.
5. Rai T, Ohira T, Yojo J, Takiguchi J, Shishido S, Sato Y, Nozawa Y, Masuda T. A case of hepatic inflammatory pseudotumor with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res*, 26, 249-253, 2003.
6. Nakamura N, Yoshida S, Shinzawa J, Yoshida S, Sasaki Y, Sato M, Ito T, Kumashima S, Sato Y, Abe M. Signet ring cell lymphoma. *J Clin Exp Hematopathol*, 43 (2), 71-76, 2003.
7. Shibukawa G, Irisawa A, Obara K, Takagi T, Yamamoto G, Hikichi T, Oyama J, Sato N, Saito A, Takiguchi F, Sakamoto H, Sato Y. Variceal recurrence after endoscopic sclerotherapy associated with the perforating veins in lower esophagus independently. *Hepato-Gastroenterology* (in press)
8. Ohira H, Takiguchi J, Rai T, Abe K, Yokokawa J, Sato Y. High frequency of anti-ribosomal P antibody in patients with systemic lupus erythematosus-associated hepatitis. *Hepatol Res* (in press)
9. Tojo J, Ohira H, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Rai T, Shishido S, Sato Y, Kasukawa R. Autoimmune hepatitis accompanied by systemic lupus erythematosus. *Internal Med* (in press)

2. 学会発表
なし

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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

マウス自己免疫性肝炎モデルを用いた病態解析

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)とβ-galの融合タンパク(β-gal/CYP2D6)をマウスの腹腔内に接種することによりCYP2D6に対する特異的免疫反応による肝炎を発症させた。4週間目まで毎週ALT値を測定すると共に肝臓を摘出して組織学的な検討を加えると共に、脾細胞(SP)と肝内浸潤リンパ球(LIL)を採取し、フローサイトメトリーによりCD4+T細胞、CD8+T細胞、CD4+CD25+T細胞の数を測定した。肝内にはCD8+T細胞が優位に浸潤していること、また、CD4+CD25+T細胞にも変動がみられ、肝炎の病態に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。さらに、SPとLILではその動態には大きな差異がある可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでに我々はII型自己免疫性肝炎の対応抗原であるβ-gal/CYP2D6をマウスの腹腔内に接種することによりCYP2D6に対する特異的免疫反応を惹起させ、肝炎を発症させることを報告してきた。今回我々はこのモデルを用いて肝炎の病態の解析を試みた。

B. 研究方法

8週齢のC57BL/6マウスの腹腔内に、β-galまたはβ-gal/CYP2D6+LPSまたはLPSを接種し、4週間目まで毎週ALT値を測定し、一部の血清を凍結保存した。毎週肝臓と脾臓を摘出し、肝臓については組織学的な検討を加えると同時に、脾細胞(SP)と肝内浸潤リンパ球(LIL)を採取した。これらをβ-gal/CYP2D6蛋白と3日間共培養した後MTTアッセイ法を用いて抗原特異的幼若化反応を調べると共に、保存血清を用いて血清中の抗CYP2D6抗体を測定することにより特異的免疫応答の誘導の有無について検討した。さらに、これらのSPとLILを用いてフローサイトメトリーによりCD4+T細胞、CD8+T細胞、CD4+CD25+T細胞の数も測定した。

C. 研究結果

β-gal/CYP2D6+LPSを投与したマウスのALT値は2週目をピークとした軽度の上昇を示した。同時にCYP2D6に対する幼弱化反応の亢進とCYP2D6に対する抗体の出現が観察され、また肝臓にはグ鞘内への炎症細胞浸潤および小葉内のfocal necrosisが散見されたことより、マウスにCYP2D6に対する特異的免疫反応による肝炎が惹起されていることが確認された。CD4/CD8比については、SPを用いた検討ではALT値のピークである2週目に、無処置時の1.56から0.75へと低下した後、肝炎の回復とともに4週目には1.25へと上昇した。一方LILを用いた検討では1週目にはすでに無処置時の5.12から0.57へと著明に減少しており、時間の経過とともに徐々に上昇して4週目には3.3へと回復した(図1)。CD4+CD25+T細胞の割合は無処置時にはSPで1.18%、LILでは0.98%であり両

者間で大きな差は認められなかった。しかしALT値のピークである2週目から3週目にかけてはSP、LILどちらを用いた検討でも約半数へと減少していることが観察された(図2)。

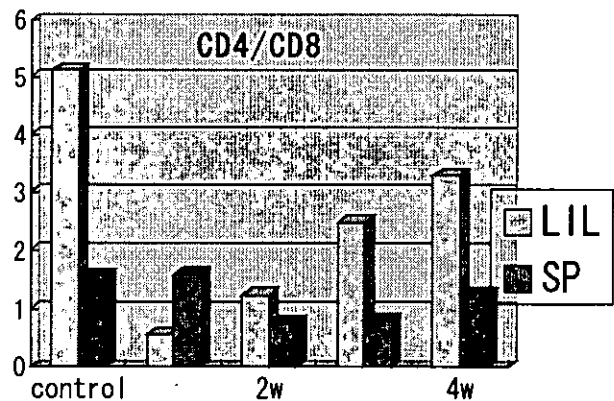


図1. CD4 / CD8 の変化

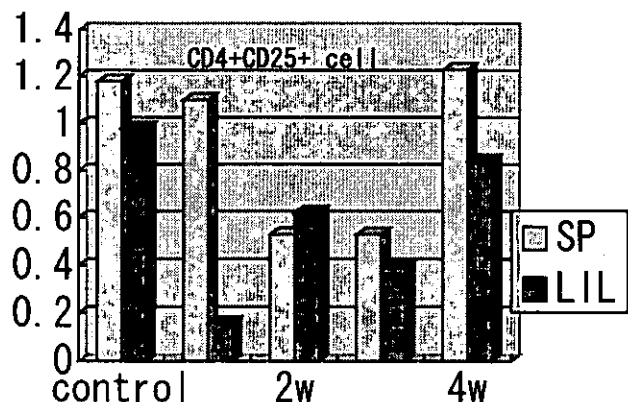


図2. CD4+CD25+ cell の変化

D. 考察

今回我々が用いた肝炎モデルにおいては、CYP2D6特異的免疫応答により肝炎が惹起されていることが再確認された。グ鞘内への炎症細胞浸潤が認められた

が、フローサイトメトリーを用いてLILを分析した結果、肝内にはCD8+T細胞が優位に浸潤していることが明かとなった。また、肝炎の病態と関連してSPとLIL中のCD4+CD25+T細胞の割合に経時的な変動がみられ、この肝炎モデルにおいては制御性T細胞が肝炎の病態に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。さらに、SPとLILではその動態に大きな差異があり、どちらの細胞を用いるかにより解析結果が異なってくる可能性があることが示された。

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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

cDNAマクロアレイを用いた自己免疫性肝疾患類似GVHR肝病変の解析

研究協力者 田中 直見 筑波大学臨床医学系消化器内科 教授

研究要旨：マウスgraft-versus-host reaction (GVHR) モデルにおいて門脈域の炎症細胞浸潤は自己免疫機序が関与して発症し、経時的に改善傾向を示した。そのメカニズムに関与する免疫関連遺伝子群をマクロアレイの手法により包括的に解析し、自己免疫性肝疾患の病態把握や、治療への応用をはかる。

A. 研究目的

マウスのMHCクラスIIの差に基づく移植片対宿主反応(GVHR)において自己免疫機序の関与した肝病変が観察される。肝組織所見ではGVHR導入5日目より門脈域、中心静脈周囲にリンパ球を中心とした細胞浸潤、胆管上皮内リンパ球浸潤を認め、浸潤細胞の多くがrecipient由来である。また、自己抗体の産生も観察された。しかし、このモデルはヒトの自己免疫性肝疾患やGVHR肝病変と異なり、自然経過で炎症細胞浸潤は改善傾向を示し、線維化や肝硬変には至らない。そこで、この自己免疫機序の関与した発症機序とトランス獲得過程に関与する免疫関連の遺伝子群を網羅的遺伝子発現頻度解析により同定することで、ヒトにおける病態診断や治療ターゲット候補の探索に役立つ。

B. 研究方法

(bm12×B6)F1メスマウスに、ナイロンウールカラムを用いて分離したB6 spleen T cellsを 1×10^7 個静注しGVHRを導入。同週令のnormal mouseをコントロールとして用い、門脈域の炎症のピークの2週目、炎症改善の見られる8週目のマウスのwhole liverを摘出する。これより、total RNAを抽出、逆転写の際に³²Pを取り込ませる。このラベルされたcDNAを、あらかじめ514個のgenesで作成されたアレイメンブラン(Panorama™ Mouse Cytokine Gene Arrays)にhybridizationさせる。これをimaging plateを用いてスポット化すると、遺伝子発現頻度の程度がスポットの濃淡で表現され、この濃度の差をArrayVisionで数値化し解析を行う。

(倫理面への配慮)

すべてのマウスは筑波大学動物実験取扱規定に基づき飼育管理された。また、実験の際は頸椎脱臼にて安楽死させたため、倫理面に問題がないと判断した。

C. 研究結果

preliminaryな実験ではGVHR肝病変形成(GVHR2w)に伴って発現が増加するのは66genesで、そのうち20genesは病変が改善する際(GVHR8w)に発現が低下し(group1)、残り(46genes)は変化がみられなかった(group2)。Group1にはTh1 cellsや

Bcellsのリクルートに関与するchemokines (CXCL9, CXCL10, CCL5, BLC/BCA-1)が含まれ、group2にはapoptosis関連のgenes, cytokinesが多く見られた。

D. 考察

GVHRの病勢とともに変化しているgenesは肝病変形成に関与していると考えられ、Th1 cells, B cellsのリクルートに働くchemokinesが重要な働きをする可能性が示唆された。またGVHR2wで発現が増加し病変が改善する際にも変動のないgroupの中には病変形成に関与するもの他病変改善に関与するgenesが含まれると考えられ、apoptosis関連のgenesやIFN- γ , IL-10の他にも複数のcytokinesが見られた。またIFN- γ , JAK1, STAT1系が病態形成に重要な働きをしている可能性が示唆された。

E. 結論

マウスGVHR肝病変において自己免疫機序の関与した発症機序とトランス獲得過程に関与する免疫関連遺伝子群を同定するため網羅的遺伝子発現頻度解析を検討中である。それぞれのメカニズムを明確に同定することはできないが、GVHR肝病変形成にTh1 cells, B cellsのリクルートに働くchemokinesが関与する可能性があり、また病変形成や改善にapoptosisが重要な働きをする可能性が示唆された。また、IFN- γ , IL-10の他にも複数のcytokinesが病態に関与する可能性も示唆された。今後はこれらのgenesに対して個々に検討しそれらの因果関係を明らかにすることが、ヒトへの応用をはかる上で重要と思われる。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし

G. 研究発表

1. 論文発表

R. Unno et al. Progression of autoimmune-mediated hepatic lesions in a murine-graft-versus-host reaction by neutralizing IL-10. (Hepatology 2003;25:423-434)

2. 学会発表

なし

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（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

肝細胞アポトーシスによる肝線維化の誘導：a lesson from hepatocyte-specific Bcl-xL-deficient mice

研究協力者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科分子治療学 教授

研究要旨： bcl-x遺伝子に2箇所のloxPサイトを導入したマウス (bcl-x fl/fl) にAlb遺伝子プロモーター制御下にCreを発現するtransgeneを導入したところ、生後早期より散発的な肝細胞アポトーシスが持続的に認められた。このAlb(+)マウスに生じるアポトーシス細胞は隣接する肝細胞や非実質系細胞による貪食により除去され、炎症細胞浸潤はほとんど認めなかった。Alb(+)マウスではコントロールであるAlb(-)マウスと比較し、生後1ヶ月目より肝臓内TGFβの発現が増強し、3ヶ月齢より徐々に中心静脈周囲の肝細胞の周囲に線維化の亢進が認められた。In vitroにおいて初代培養肝細胞やマクロファージはアポトーシス細胞の貪食に伴い多量のTGFβを産生した。本モデルは肝細胞のアポトーシスが肝線維化誘導を引き起こし得ることをはじめて示したものであり、またアポトーシス細胞の貪食に伴うTGFβの産生がアポトーシスと線維化を結びつけるひとつのメカニズムになっている可能性を示唆している。

共同研究者

竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科 助教授

A. 研究目的

実質細胞のアポトーシスとその後の線維の沈着は慢性の臓器障害の際に共通してみられる所見である。一般にアポトーシスはその後に影響を残さない“静かな細胞死”であると考えられているが、このような病理学的な特徴はアポトーシスと線維化の間になんらかの関連があることを示唆している。昨年度、我々は本研究事業において、Cre-loxPシステムを用いてBcl-xLを肝細胞特異的にノックダウンすると肝細胞の持続的なアポトーシスが生じることを報告した。このモデルは長期に持続する実質細胞のアポトーシスが臓器に与える影響を解析する上で格好のモデルである。本年度は、このモデルを用いて肝細胞アポトーシスが線維化に与える影響を解析した。

B. 研究方法

bcl-x遺伝子のプロモーター領域と第2イントロンにloxP配列を有するマウス (bcl-x fl/fl) にAlb遺伝子プロモーター制御下にCreを発現するトランスジーンを導入した。Alb(+) bcl-x fl/+マウスとbcl-x fl/flマウスの交配により、Alb(+) bcl-x fl/flマウスはメンデルの法則に従って出生し、正常の発育を示した。Alb(+) bcl-x fl/flとbcl-x fl/flの交配により得られるAlb(+)マウスとAlb(-)マウスを1, 3, 5, 7ヶ月後に犠死させ実験に供した。肝細胞のアポトーシスは血清ALT値、HE染色、TUNEL染色、活性型caspase 3の免疫染色により評価した。肝臓の線維化はマッソントリクローム染色、銀染色により組織学的に評価し、また肝臓内のハイドロキシプロリン量を測定することにより定量した。肝臓内のTGFβの発現は、組織抽出液をELISA測定することにより行った。Bcl-x fl/flマウスの初代培養肝細胞にCreを発現するアデノウイルス (AdexCre)

を感染させアポトーシス肝細胞を調整した。このアポトーシス細胞と野生型の肝細胞あるいはマクロファージを18時間混合培養し、上清中のTGFβの産生をELISAにて測定した。アポトーシス小体をTAMRAで標識することにより、肝細胞、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を評価した。

C. 研究成果

Bcl-xLのウエスタン解析によりAlb(+)においてBcl-xLが肝細胞特異的にノックダウンされていることが確認された。Alb(+)マウスでは生後1ヵ月後よりALT値の上昇がみられ、少なくとも7ヶ月齢まで持続的な肝障害が認められた。組織学的には散発的な肝細胞アポトーシスが認められ、肝細胞や非実質細胞によるアポトーシス細胞の貪食像が認められた。Alb(+)マウスでは3ヶ月後より、月齢依存的に肝内のハイドロキシプロリン量が増加し、肝細胞周囲、類洞に線維の沈着が認められた。一方、肝臓内のTGFβの発現は生後1ヶ月後より増加を認めた。Invitroにおいて肝細胞およびマクロファージはアポトーシス細胞を貪食し、TGFβを産生した。このTGFβの産生は貪食細胞とアポトーシス細胞をトランスウエルを用いて分離することにより消失した。

D. 考察

実質細胞のアポトーシスが線維化を誘導し得ることについては、1) マウスにアゴニスティックなFas抗体を持続的に投与することにより、肝臓や肺の実質細胞のアポトーシスに伴い線維化の誘導がみられること、2) 胆管結紮やブレオマイシン投与により誘導される肝臓や肺における線維化がFas欠損マウスにおいて減弱すること、などにより示唆されてきた。しかし、Fas抗体の投与は実質細胞のアポトーシスのみならず、内皮細胞の障害も引き起こし、実質内の出血や細胞浸潤を誘導することも知られており、実質細胞のアポトー

シス誘導に関して必ずしも特異性が高くないことが指摘されている。また、Fas欠損マウスでは種々のリンパ系細胞の機能異常が知られており、サイトカイン産生の変化が線維化の誘導に影響を与える可能性がある。今回提示したbcl-x遺伝子を肝細胞において特異的にノックアウトするモデルは肝細胞における純粋なアポトーシス誘導モデルであり、これにより線維沈着がみられることは実質細胞の持続的なアポトーシスが線維化を誘導するのに十分な条件であることをはじめて示したものであるといえる。

また、アポトーシスをおこした細胞は隣接した肝細胞や非実質細胞に貪食されるが、この貪食現象に伴いTGF β が産生されることを示した。TGF β の肝臓における強制発現は肝線維化を誘導することがいくつかのトランスジェニックモデルで明らかにされていることから、このTGF β がアポトーシスが線維化を誘導するひとつのメカニズムになっている可能性がある。アポトーシスとその後の線維化はウイルス肝炎や非アルコール性脂肪性肝炎など多くの慢性肝障害時にみられる所見であり、アポトーシスが線維化を誘導するメカニズムを解明していくことは、今後これらの線維化を抑制する分子治療法を開発していく上で重要な情報を提供してくれるものと考えられる。

E. 結論

Bcl-xLノックダウンにより引き起こされる持続的な肝細胞アポトーシスにより、肝臓内のTGF β の産生が増大し、肝細胞周囲および類洞の線維沈着が誘導された。肝細胞およびマクロファージはアポトーシス小体の取り込みに伴いTGF β を産生し、これが肝線維化に関与していると考えられた。

F. 研究発表

論文発表

- Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Kimura R, Miyagi T, Mochizuki K, Sasaki Y, Hayashi N. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer* 104:354-361, 2003.
- Suzuki T, Takehara T, Ohkawa K, Ishida H, Jinushi M, Miyagi T, Sasaki Y, Hayashi N. Intravenous injection of naked plasmid DNA encoding hepatitis B virus (HBV) produces HBV and induces humoral immune response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 300:784-788, 2003.
- Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on interferon α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: Impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 170:1249-1256, 2003.
- Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Suzuki T, Jinushi M, Sugimoto Y, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. CD1d-mediated stimulation of natural killer T cells selectively activates hepatic natural killer cells to eliminate experimentally disseminated hepatoma cells in murine liver. *Int J Cancer* 106: 81-89, 2003.
- Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, Toyama T, Yakushijin T, Sakakibara M, Takehara T, Fujimoto J, Hori M, Wands JR, Hayashi N. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 97: 3017-3026, 2003.
- Takehara T, Takahashi H. Suppression of Bcl-xL deamidation in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 63: 3054-3057, 2003.
- Hosui A, Ohkawa K, Ishida H, Sato A, Nakanishi F, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Hepatitis C virus core protein differentially regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon- γ stimuli. *J Biol Chem* 278: 28562-28571, 2003.
- Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Suzuki T, Miyagi T, Hayashi N. Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J Immunol* 171: 5423-5429, 2003.
- Takehara T, Hyashi N. Bcl-xL as a critical apoptosis antagonist in hepatocyte and hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Hepatology: Stem Cell and Liver Regeneration*. pp57-64 edited by Okita K. Springer-Verlag Tokyo 2004.

学会発表

- Takehara T, Suzuki T, Ohnishi C, Rucker III EB, Jinushi M, Miyagi T, Hiramatsu N, Hayashi N. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to spontaneous and persistent hepatocyte apoptosis and liver fibrogenic response: in vivo evidence for the link between apoptosis and fibrosis. (217/Presidential Plenary III) The American Association for the Study of Liver Diseases (54th Annual Meeting) October 24-28, 2003; Boston (USA)
- Kanto T, Sato A, Inoue M, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Takehara T, Hayashi N. IFN- γ or IL-15 restores the impaired helper T-cell polarizing ability of blood dendritic cell subsets in chronic hepatitis C. (380/Poster) The American Association for

- the Study of Liver Diseases (54th Annual Meeting) October 24-28, 2003; Boston (USA)
3. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Suzuki T, Kanto T, Hayashi N. Autocrine IL-15 is required for MHC class I-related chain A and B expression on monocyte-derived dendritic cells in response to interferon α/β . (382/AASLD Presidential Poster of Distinction) The American Association for the Study of Liver Diseases (54th Annual Meeting) October 24-28, 2003; Boston (USA)
 4. Sato A, Kanto T, Limn K, Komoda Y, Oki C, Inoue M, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijin T, Takehara T, Matsuura Y, Hayashi N. Pseudotype hepatitis C virus infects immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. (644/Poster) The American Association for the Study of Liver Diseases (54th Annual Meeting) October 24-28, 2003; Boston (USA)
 5. Ohnishi C, Takehara T, Suzuki T, Jinushi M, Miyagi T, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N. IL-12 and IFN α gene therapy for hepatic metastasis of colon cancer: Difference in generation of innate and adaptive immune responses. (877/AASLD Presidential Poster of Distinction) The American Association for the Study of Liver Diseases (54th Annual Meeting) October 24-28, 2003; Boston (USA)
 6. Suzuki T, Takehara T, Ohkawa K, Ishida H, Ohnishi C, Jinushi M, Miyagi T, Hayashi N. Long-term productive replication of hepatitis B virus (HBV) in the liver by single intravenous injection of naked HBV DNA in immunocompromised mice. (932/AASLD Presidential Poster of Distinction) The American Association for the Study of Liver Diseases (54th Annual Meeting) October 24-28, 2003; Boston (USA)
 7. Miyagi T, Takehara T, Suzuki T, Jinushi M, Ohnishi C, Tatsumi T, Hiramatus N, Kanto T, Hayashi N. CD1d-mediated stimulation of natural killer T cells selectively activates hepatic natural killer cells in interferon-gamma independent manner and induces the activation of acquired immunity against murine hepatocellular carcinoma. (1268/AASLD Presidential Poster of Distinction) The American Association for the Study of Liver Diseases (54th Annual Meeting) October 24-28, 2003; Boston (USA)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

自己免疫性肝炎におけるGST A1-1抗体の頻度と意義

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：自己免疫性肝炎（AIH）に検出される自己抗体のうち、liver cytosol成分を抗原とする自己抗体が知られている。これらの対応抗原の多くは薬物代謝酵素群に属する。今回、AIHにおける第2相薬物代謝酵素群の1つであるGSTに対する自己抗体を検索し、その頻度と意義を追求した。GST A1-1抗体は、AIHの74例中12例（16%）に検出されたが、対照とした各種肝疾患、SLEや健常人ではPBCの2例を除き検出されなかった。間接蛍光抗体法で観察すると、GST A1-1抗体は既知の自己抗体と異なった染色パターンを呈した。GST A1-1抗体陽性のAIHは陰性例と比べ、発症年齢が若く、生化学・凝固検査値の異常が著しく、肝硬変への進展率が高かった。以上のことから、AIHにおけるGST A1-1抗体は、その検出頻度は低率であったが、予後不良を示す自己抗体であることが示唆された。

A. 研究目的

自己免疫性肝炎（AIH）では抗核抗体や抗平滑筋抗体が高頻度に検出されるが、そのほか、LKM-1抗体やLKM-3抗体など、liver cytosol成分を抗原とする自己抗体が知られている。これらの自己抗体の対応抗原は、薬物代謝系酵素であるCytochrome P450 (CYP) 2D6やUGTA1であることが判明している¹⁾。しかしながら、glutathione S-transferase (GST) に対する自己抗体についての詳細は不明である。今回、第2相薬物代謝系酵素の1つであるGSTもまた自己抗体の対応抗原として機能している可能性を考え、AIHにおけるGST A1-1に対する自己抗体の検索を行い、本抗体の頻度と臨床的意義について検討した。

B. 研究方法

1. GST A1-1抗体の検出：GST A1-1抗体はGST A1-1 recombinant proteinを抗原としたWestern blot法によって検索した。陽性例では、ラット肝腎切片を用いた間接蛍光抗体法によって、染色パターンを検討した。
2. 対象：AIH 74例を対象とした。対照として、PBC 20例、PSC 10例、ウイルス性肝硬変 40例（B型20例、C型20例）、SLE 32例、および健常人20例を用いた。
3. GST A1-1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。

C. 研究結果

1. GST A1-1抗体は、AIH 74例中12例（16%）のみに検出され、対照とした他の肝疾患、SLEや健常人では、PBCの2例を除いて1例も検出されなかった。本抗体が検出されたAIH 12例では、全例、抗核抗体陽性で、7例は抗平滑筋抗体も併存したが、LKM-1抗体やSLA/LP抗体とは併存しなかった。
2. GST A1-1抗体の間接蛍光抗体法による染色パターンを検索した。ラット肝切片では、血管周囲の肝細胞のサイトプラズマに帯状に染色され、その染色性は、血管壁に最も強く、末梢側ほど減弱した。ラット腎切片では、近位尿細管細胞にびまん性に、遠位尿細管細胞にまばらに染色された。これらの染色パターンは既知のLKM-1抗体や抗ミトコンドリア抗体と明らかに相違した。
3. AIH 74例を、GST A1-1抗体陽性12例と陰性62例に分類し、臨床病理像を比較した(表1)。GST A1-1抗体陽性例は、陰性例に比較して、初診時の平均年齢が有意に若く、生化学検査やIgG値が有意に高く、PT活性は低値で、肝組織でも肝硬変への進展率が高く、prednisoloneの反応性も低率であった。

表1 GST A1-1抗体陽性、陰性別の自己免疫性肝炎の臨床病理像の比較

| | Anti-GST A1-1 | | P value |
|---------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| | positive (n=12) | negative (n=62) | |
| Onset age (year old)* | 39±3 | 47±2 | 0.0372 |
| Male : Female** | 2:10 | 10:52 | ns |
| T-Bil (mg/dL)* | 4.3±1.0 | 1.3±1.0 | 0.0391 |
| AST (IU/L)* | 884±51 | 584±51 | 0.0002 |
| ALT (IU/L)* | 950±58 | 590±51 | 0.0001 |
| IgG (mg/dL)* | 3,301±44 | 2,611±31 | 0.0000 |
| PT (%)* | 50±10 | 88±7 | 0.0049 |
| CH : LC** | 4:8 | 59:3 | 0.0000 |
| Response to prednisolone** responder : non-responder | 7:5 | 50:7# | 0.0043 |

GST A1-1 抗体陰性 62 例中 5 例は prednisolone 治療歴なし。
*平均値±SEM で表示し、two-tailed Welch's t test で比較した。
**2 群間の比較は chi-square test によった。

D. 考察

本邦のAIHにおけるGST A1-1抗体の頻度は16%と低率であった。しかしながら本抗体は対照としたAIH以外の疾患ではPBCの2例を除き検出されず、AIHに特異的に検出されることが判明した。

興味あることに、本抗体は抗核抗体、抗平滑筋抗体と併存したが、LKM-1抗体やSLA/LP抗体とは併存しなかった。すなわち、以前、SLA抗体の対応抗原がGSTであると報告されていた²が、両者の自己抗体は相違するものであることが確認された。

本研究で、間接蛍光抗体法によるGST A1-1抗体のユニークな染色パターンが新たに見い出された。このパターンは既知の自己抗体とは明らかに相違していたが、Aguileraらが報告した肝移植後の*de novo* immune hepatitisの一部で検出されるGST T1抗体の染色パターン³とほぼ同様であった。ヒトGSTは、A、M、P、T、Kなど8クラスの存在が知られていることから、他のGST抗体の染色性についても今後さらに検討する必要がある。

本抗体の臨床的意義を明らかにするため、AIHのうち、陽性例と陰性例との間で臨床病理像を比較した。陽性例では、平均年齢が有意に若く、PT活性は低値で、肝組織でも肝硬変への進展率が高く、prednisoloneの反応性も低率であったことから、本抗体は重症例で検出され、予後不良を示すマーカーであることが示唆された。今後、AIH小児例や外国例を含めたより多数例での検討が必要と考えられた。

E. 結論

AIHにおけるGSTA1-1抗体の頻度は16%と低率であったが、本抗体陽性例は早期進展例に多く、予後は不良であった。

参考文献

1. Manns MP, Obermayer-Straub P. Cytochrome P450 and uridine triphosphate-glucuronosyltransferases: model autoantigens to study drug-induced, viral-induced, and autoimmune liver disease. *Hepatology* 1997; 26:1054-1066
2. Klein R, Berg PA. Glutathione S-transferase as a major autoantigen in anti-SLA-positive autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 1015-1016
3. Aguilera II, Wichmann IJ, Sousa M, et al. Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with *de novo* immune hepatitis following liver transplantation. *Clin Exp Immunol* 2001; 26: 535-539

健康危険情報

なし。

研究発表

Kato T, Miyakawa H, Ishibashi M. Frequency and significance of anti-glutathione S-transferase autoantibody (anti-GST A1-1) in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2004 in press

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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

1) 自己免疫性肝炎の疾患感受性と遺伝子多型—IκBL遺伝子多型の解析

研究協力者 清澤 研道 信州大学医学部第二内科 教授

研究要旨：自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis: AIH) は、その疾患感受性にヒト組織適合抗原 (HLA) の遺伝子の関与が示されてきた。わが国では、HLA-DR4抗原を発現する遺伝子に疾患感受性があることが報告されている。昨年は、マイクロサテライト解析から、HLA class III領域のTNF-α遺伝子近傍にもAIHの疾患感受性に有意さを認めたことより、SNP解析として、TNF-αのプロモーター領域の遺伝子多型との相関について検討した。TNF-αの多型とは相関を認めたが、DRB1*0405との層別解析では有意とはいえず、今回はさらに、その近傍にあるIκBL遺伝子の多型についても検討したが相関は認めず、さらに近傍のいくつかの遺伝子を含め検討が必要である。

共同研究者
吉澤 要 信州大学医学部第二内科 講師
太田正穂 信州大学医学部法医学 講師

討では、AIHの疾患感受性と相関を認めなかった。

A. 研究目的

自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis: AIH) は、その疾患感受性にヒト組織適合抗原 (HLA) の遺伝子の関与が示されてきた。わが国では、HLA-DR4抗原を発現する遺伝子に疾患感受性があることが報告されている。しかし、病態の違いやDR4をもたない患者の存在などよりHLA-DR以外の疾患感受性遺伝子の存在が示唆され、多因子遺伝疾患であると考えられている。昨年は、マイクロサテライト解析から、HLA class III領域のTNF-α遺伝子近傍にもAIHの疾患感受性に有意さを認めたことより、SNP解析として、TNF-αのプロモーター領域の遺伝子多型との相関を報告した。今回は、TNF-α遺伝子の近傍にあり免疫応答に重要な核内転写因子NFκBの抑制因子IκBと同様な役割のあるとされるIκBL (inhibitor of κB like protein) 遺伝子のプロモーター領域の多型との相関について検討する。

B. 研究方法

AIH国際診断基準で確診の患者45名、コントロールとして非血縁関係の213名において、血清学的にHLA-A, B, C, DR, DQをタイピングした。さらに末梢血よりDNAを抽出し、DR, DQのDNAタイピングを行った。

IκBLのプロモーター領域の遺伝子多型はPCR後直接シーケンス法にて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は信州大学倫理委員会にて承認を得ており、末梢血よりDNAを抽出し本研究に使用することを患者に説明し、文章にてインフォームドコンセントを行った。コントロールDNAに関しては、血液採取時、同様に承諾を得ている。

C. 研究結果

IκBLのプロモーター領域の遺伝子多型は今回の検

D. 考察

AIHは急激に発症し短期間に肝不全にいたるものから、緩徐に発症するもの、ステロイド治療への反応性の違いなど、また、DR4をもたないものも少数例存在する。このため、HLA-DR以外の疾患感受性遺伝子の存在が示唆され、多因子遺伝疾患であると考えられている。

以上のことを踏まえ、昨年はAIHでの疾患感受性遺伝子の検索をHLA全領域においてマイクロサテライト多型・SNPsを用いた相関解析にて検討した。マイクロサテライト多型を用いた相関解析にてHLA class IIIのTNF-α近傍に有意差を認めたことよりTNF-αのプロモーター領域の遺伝子多型を解析した。haplotype Dが患者に有意に認められたが、DRB1*0405との層別解析では明らかな相関は認められず、今回はさらに、その近傍にあるIκBL遺伝子の多型についても検討したが相関は認めず、さらに検討が必要である。今後、順次HLA以外の遺伝子においてもマイクロサテライトマーカーを用いた相関解析を行い、それによって絞り込まれた領域の遺伝子のSNP解析を行い、AIHの発症、病態の解明を目指す。これにより、患者個々の予後の予測、治療法の決定などが可能となると思われる。

E. 結論

HLA全領域におけるマイクロサテライト多型解析により、HLA class III領域のTNF-α近傍にAIHとの相関が認められたため、IκBL遺伝子の多型についても検討したが、相関は認めなかった。

F. 健康危険情報

ルーチン検査としての末梢血採血時に10mlのサンプルを研究用に使用した。そのため、一般の末梢血採血時における合併症の危険につき説明、理解を得た。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

2) 本邦における自己免疫性肝炎とHEV感染の関連

研究協力者 清澤研道 信州大学医学部第二内科 教授

研究要旨：本邦では、HEV感染症は輸入感染症として散発性に起こるとされてきた。しかし、近年本邦においてHEVが原因不明の散発性肝炎や劇症肝炎の原因の1つになることが明らかにされた。一方、自己免疫性肝炎（autoimmune hepatitis: AIH）は、依然としてその発症機序が不明であるが、ウイルス感染を契機に発症した報告も散見される。そこで、AIH発症とHEV感染の関連を検討した。AIH 60名の発症当時の保存血清にて、HEV-RNA、IgM-HEV 抗体は全例陰性であった。IgG-HEV抗体は8.3%の陽性率であった。一方、検診者において、IgG-HEV抗体とIgM-HEV抗体の陽性率はそれぞれ地域1（C型肝炎多発地域）で6.7%、0.4%、地域2（一般地域）で4.6%、0%でありAIH発症とHEV感染に明らかな関連はなかった。

| | | |
|-------|-----------|-----|
| 共同研究者 | | |
| 吉澤 要 | 信州大学医学部内科 | 講師 |
| 一條哲也 | 信州大学医学部内科 | 助手 |
| 田中栄司 | 信州大学医学部内科 | 助教授 |
| 武田直和 | 国立感染症研究所 | |
| 李 天成 | 国立感染症研究所 | |
| 三代俊治 | 東芝病院研究部 | |

ウイルス感染を契機に発症した報告も散見されるため、AIH発症時の保存血清にてHEVの感染の有無を調べたが一般コントロールと比し有意差を認めず、HEV感染がAIHの引き金になったとは考えにくかった。

E. 結論

AIH発症とHEV感染に明らかな関連はなかった。

A. 研究目的

本邦では、HEV感染症は輸入感染症として散発性に起こるとされてきた。しかし、近年本邦においてHEVが原因不明の散発性肝炎や劇症肝炎の原因の1つになることが明らかにされた。一方、自己免疫性肝炎（autoimmune hepatitis: AIH）は、依然としてその発症機序が不明であるが、ウイルス感染を契機に発症した報告も散見される。そこで、AIH発症とHEV感染の関連を検討した。

B. 研究方法

AIH国際診断基準で診断の患者60名の発症当時の凍結保存血清を用いた。HEV抗体は、HEV遺伝子ORF2の組み換えバキュロウイルスを昆虫細胞にて発現させ、得られたウイルス様中空粒子を固相抗原としてELISA法にて国立感染症研究所で測定した。HEV-RNAは、nested PCR法にて東芝病院研究部で測定した。また、対照として、長野県内の地域検診者のHEV抗体も測定した。地域1（C型肝炎多発地域）478名：男211、女267、平均年齢56.2歳、地域2（一般地域）775名：男190、女585、平均年齢57.1歳

C. 研究結果

AIH60名において、HEV-RNA、IgM-HEV抗体は全例陰性であった。IgG-HEV抗体は8.3%の陽性率であった。一方、検診者において、IgG-HEV抗体とIgM-HEV抗体の陽性率はそれぞれ地域1で6.7%、0.4%、地域2で4.6%、0%であった。

D. 考察

AIHは、依然としてその発症機序が不明であるが、

G. 研究発表

- 論文発表
Tanaka E, Takeda N, Li T-C, Orii K, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Iijima T, Takayama T, Miyamura T, Kiyosawa K. Seroepidemiological study of hepatitis E virus infection in Japan using a newly developed antibody assay. J Gastroenterol 36: 317-321 2001
山浦高裕、吉澤 要、六波羅明紀、西澤好雄、松本晶博、堀内 朗、宮澤幸一、清澤研道 85歳女性に発症した自己免疫性肝炎の1例 消化器病学会雑誌 99: 1498-1502 2002
吉澤 要、清澤研道 臨床医のためのステロイド薬 効果的な選び方・使い方 肝疾患 85-88 2002 総合医学社
吉澤 要、清澤研道、太田正徳 特集 肝臓と免疫 HLA 肝胆膵 45: 709-715 2002アークメディア
- 学会発表
第7回日本肝臓学会大会（2003年10月15日）
当科における自己免疫性肝炎（AIH）・原発性胆汁性肝硬変（PBC）overlap症候群の実態
一條哲也、吉澤 要、清澤研道

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 特許取得
なし。
- 実用新案登録
なし。
- その他
なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

自己免疫性肝炎における末梢血ならびに肝組織内リンパ球のCD25、
CD69陽性率について

研究協力者 渡部 幸夫 国立相模原病院 内科医長

研究要旨：CD25、CD69の末梢血中および肝組織内の陽性率を検討することにより、自己免疫性肝炎の病態をより正確に把握でき、よりの確な治療と結びつく要因があるかどうか、予後に大きく寄与できるかどうかを検討してきた。自己免疫性肝炎の末梢血では陽性率が高いが個体差が大きい。肝組織内の浸潤リンパ球に対する陽性率が高いが必ずしも一定の傾向はない。陽性率に影響するものとしてIgG値の高低、グ鞘域のリンパ球浸潤の強さ、繊維化、ステロイド治療、完全寛解の有無が挙げられるが、ALT値の高低やビリルビン値の高低は関係しなかった。なお末梢血と肝組織内のCD25やCD69陽性率には相関は認めなかった。

共同研究者

中村陽子¹⁾、三富弘之²⁾
国立相模原病院 消化器科¹⁾、病理²⁾

員会の承諾を得ての研究とした。

C. 研究結果

1. 末梢血CD25、CD69陽性率(表1)(表2)

CD25+/CD8+陽性率においてAIH群は健常者群、CH群よりも有意に高かった。CD69+/CD3+、CD69+/CD4+、CD69+/CD8+陽性率においてはAIH群は健常者群や他の肝疾患群よりも高かったが、個人間のばらつきが多く有意差は出なかった。

2. 末梢血ならびに肝組織内CD25、CD69陽性率

同一人において肝生検日と採血日が近似している13症例において、末梢血CD25+/CD3+、CD25+/CD4+、CD25+/CD8+各陽性率と肝組織内CD25、CD69各陽性率、末梢血CD69+/CD3+、CD69+/CD4+、CD69+/CD8+各陽性率と肝組織内CD25、CD69各陽性率との間に有意な相関は認められなかった。

3. 肝組織内CD25、CD69陽性率(表3)

肝組織内CD3、CD4、CD8、CD20、CD56、CD25、CD69陽性率をAIH群と他の肝疾患群とで比較した。CD4、CD20、CD56はPBC群で高く、他のCDはAIH群で高かった。AIH群において、CD3ではB-CH群やC-CH群と、CD4ではPBC群と、CD25ではPBC群やB-CH群と、CD69ではB-CH群と有意差を認めた。

表1. AIHと他の肝疾患における末梢血CD3、CD4、CD8それぞれのCD25陽性率(%)

| | | CD25*/CD3* | CD25*/CD4* | CD25*/CD8* |
|------|----|------------|------------|------------|
| 健常者 | 5 | 12.6±5.4 | 22.7±8.6 | 1.3±1.2 |
| AIH | 12 | 16.9±6.7 | 21.1±8.3 | 9.4±16.6 |
| PBC | 3 | 14.1±9.2 | 18.6±13.0 | 2.9±1.3 |
| CH | 7 | 13.6±6.4 | 21.1±9.6 | 2.0±1.2 |
| AH | 7 | 16.2±8.9 | 23.8±12.6 | 3.3±2.4 |
| Drug | 4 | 13.6±6.4 | 19.4±9.3 | 5.1±4.1 |

Mann-Whitney検定 * P<0.05

A. 研究目的

CD25、CD69は早期活性化マーカーであり、自己免疫性肝炎(AIH)初期に末梢血において陽性率の高い症例が散見される。AIHの病態と末梢血および肝組織内CD25、CD69陽性率の関連について臨床的に検討したので報告する。

B. 研究方法

末梢血リンパ球活性化マーカー測定については以前の報告と同様のFACSを用いてCell Questにて解析した。対象は健常者5例、AIH12例、原発性胆汁性肝硬変(PBC)3例、ウイルス性慢性肝炎(CH)7例、ウイルス性急性肝炎(AH)7例、薬剤性肝障害(Drug)4例であり、各症例の末梢血リンパ球のCD3、CD4、CD8それぞれに対するCD25とCD69の陽性率を解析した。肝組織内リンパ球の解析対象はAIH18例(標本数は27標本)、PBC5例、B型慢性肝炎(B-CH)5例、C型慢性肝炎(C-CH)5例、ウイルス性急性肝炎(AH)1例であった。AIHの対象例は18例全例女性であり、肝生検回数は1回が9例、2回が8例、3回が1例であった。治療としては、ステロイド使用例が17例あり、うち1例は免疫抑制剤併用例であった。未治療例が1例あった。

肝組織は免疫酵素抗体(間接法)でCD3、CD4、CD8、CD20、CD56、CD25、CD69を染色した。1組織切片内のグ鞘領域でリンパ球浸潤の強い方から一定区域を3カ所選択し、800倍で検鏡して浸潤細胞数に対するCD25、CD69陽性細胞数の割合をカウントし、その平均を肝組織内陽性率とした。小葉内のリンパ球浸潤は検討から除外した。

統計処理については対応のある2群間ではWilcoxon検定、対応のない2群間ではMann-WhitneyのU検定を用いた。

(倫理面の配慮)

可能な限りの対象患者に同意を得た。当院の倫理委

表2. AIHと他の肝疾患における末梢血CD3、CD4、CD8それぞれのCD69陽性率(%)

| | | CD69 ⁺ /CD3 ⁺ | CD69 ⁺ /CD4 ⁺ | CD69 ⁺ /CD8 ⁺ |
|------|----|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 健常者 | 5 | 4.9±1.2 | 2.8±0.2 | 13.6±2.8 |
| AIH | 12 | 12.2±14.8* | 8.8±11.5* | 19.8±17.4 |
| PBC | 3 | 2.5±0.6 | 1.3±0.3 | 8.1±0.9 |
| CH | 7 | 6.7±2.8* | 3.3±1.8* | 14.5±7.4 |
| AH | 7 | 6.8±7.7 | 4.3±5.7 | 14.4±14.1 |
| Drug | 4 | 5.5±4.6 | 2.2±1.4 | 18.6±21.8 |

Mann-Whitney検定 * P<0.05

表3. AIHと他の肝疾患における肝組織内CD3、CD4、CD8、CD20、CD56、CD25、CD69陽性率(%)

| | | CD3 | CD4 | CD8 | CD20 | CD56 | CD25 | CD69 |
|------|----|------|-------|-------|------|------|------|-------|
| AIH | 27 | 67.5 | 40.4 | 36.0 | 32.5 | 19.0 | 35.7 | 40.1 |
| PBC | 5 | 60.8 | 51.6* | 45.0 | 59.4 | 49.8 | 23.1 | 37.6* |
| B-CH | 5 | 53.6 | 35.1* | 46.5 | 24.5 | 24.0 | 19.3 | 27.6 |
| C-CH | 5 | 45.6 | 38.0* | 34.4* | 29.1 | 22.9 | 29.1 | 33.6 |
| AH | 1 | 62.8 | 45.0 | 34.2 | 23.9 | 14.5 | 19.7 | 60 |

Mann-Whitney検定 * P<0.05 † P<0.01

AIH群において、臨床データと肝組織内CD25、CD69陽性率とを比較検討した結果では、一般肝機能検査ALT値およびT.Bil値の高低でCD25、CD69陽性率に有意差はなかった。免疫グロブリンIgG値の高低(2500mg/dl以上または2500mg/dl未満)における検討では、IgG高値の方がCD69陽性率が有意に高かった。AIHにおける肝組織所見との比較検討をするため、組織のActivity(A0,1またはA2,3)、Fibrosis(F0,1またはF2,3)別に群別した。Activityの強いA2,3の群ではCD25、CD69いずれもA0,1群に比べて有意に高かった(図1)。また、Fibrosisの進行しているF2,3群においては、繊維化の軽いF0,1群に比べてCD25には差はないものの、CD69は有意に高かった(図2)。ステロイド投与の有無によって肝組織内のCD25、CD69陽性率を比較検討したところ、ステロイド治療のない群はステロイド治療をしている群に比べてCD25、CD69陽性率は共に有意に高かった(図3)。肝組織内CD25、CD69陽性率を同一症例において2回の生検標本からステロイド治療前後の推移を検討した。完全寛解持続例ではステロイド治療前に比べて治療後のCD25、CD69陽性率は共に有意に低下した。一方再燃例では治療前後での有意差はなかった(図4)。

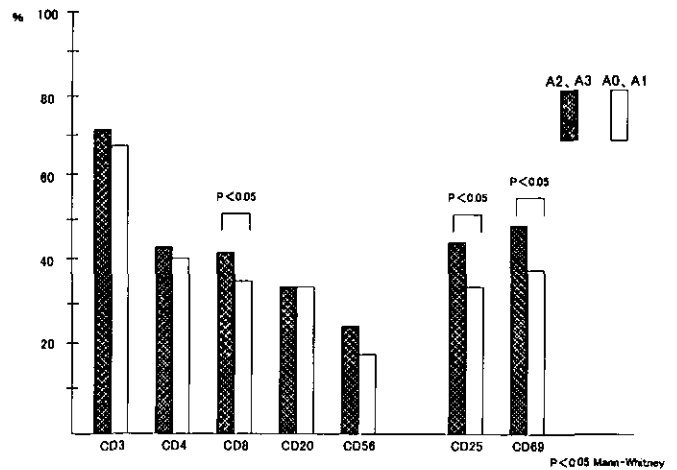


図1. 組織のActivityと肝組織内CD陽性率の比較

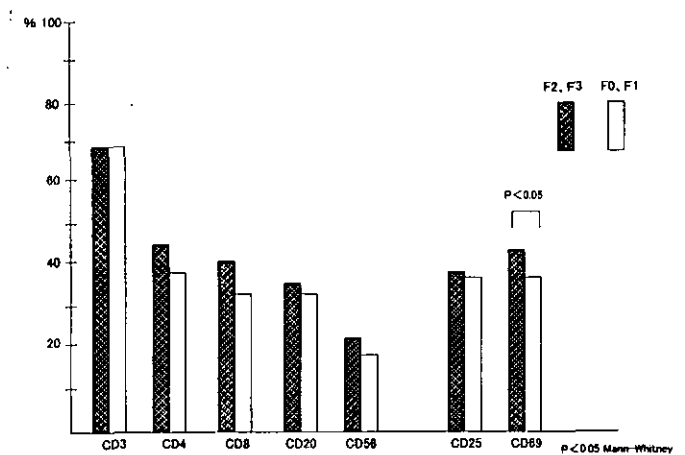


図2. 組織のFibrosisと肝組織内CD陽性率の比較

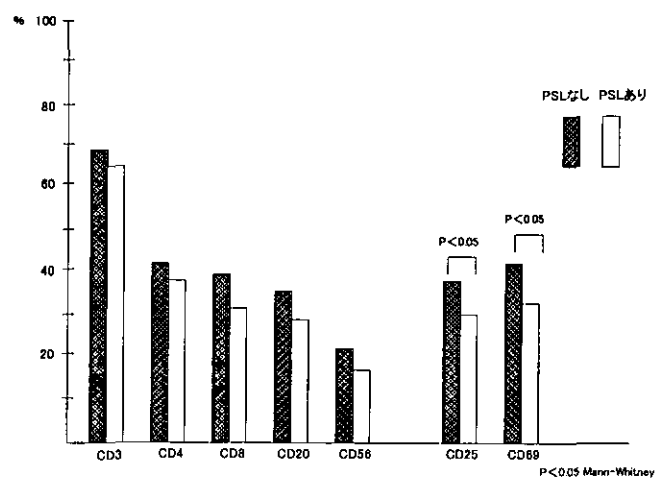


図3. PSL治療の有無と肝組織内CD陽性率の比較