

図2 アンタゴニストペプチド添加によりPDC-E2特異的CTLの抗原特異的細胞障害性活性が抑制された (文献⁵⁾より引用改変)

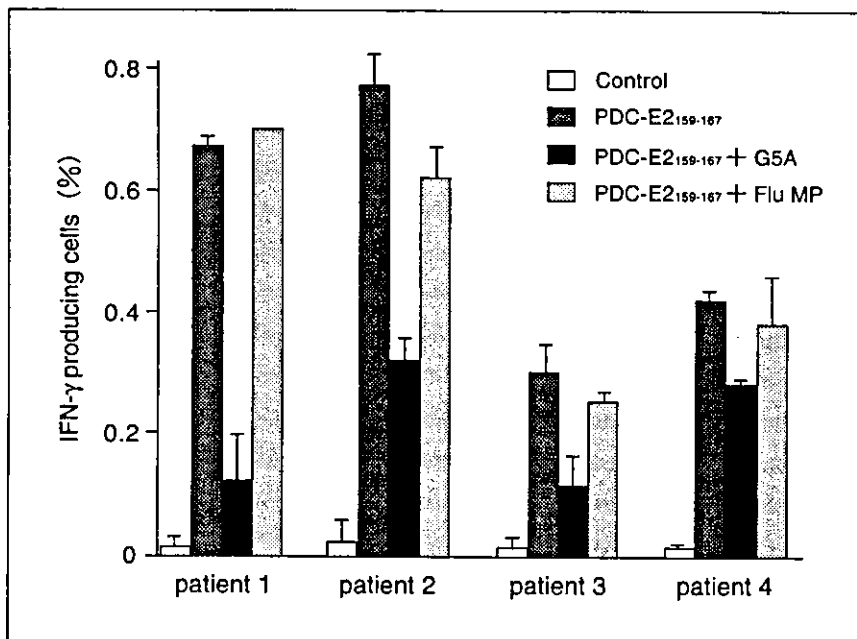


図3 PDC-E2特異的CTLの抗原特異的IFN-γ産生もまた、アンタゴニストペプチド添加により抑制された (文献⁵⁾より引用改変)

サイトカインの産生を抑制することが明らかになった。このようなアンタゴニストの同定は、抗原特異的な免疫制御を行うために重要な知見

となる。ほかの自己免疫疾患、たとえば多発性硬化症においてミエリン蛋白特異的T細胞は多様なTCRを用いていることが知られている。し

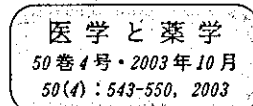
かしながら、ミエリン蛋白エピトープの1アミノ酸を置換したアンタゴニストにより、TCR特異性を有した自己反応性T細胞反応の大部分を阻止できることが示され⁷⁾、また、多発性硬化症のモデルマウスである実験的アレルギー脳脊髄炎でも、多様なTCRレパトアを有するT細胞反応が、一種類のアンタゴニストにより抑制されることが示されている^{8)~10)}。

PBCにおいてわれわれが同定したアンタゴニストが、実際その程度病態を抑制できるのかは今後検討すべき重要な課題である。HLA-A2トランスジェニックマウスを用いてPDC-E2特異的CTLを誘導することで疾患モデルが作成できれば、生体内でのアンタゴニストペプチドの反応の解析が進んでゆくと考えられる。また、アンタゴニストペプチドはアミノ酸断片であり、生体内での安定性は悪い。アンタゴニストペプチドの三次構造を模倣した、より安定な化合物を作成することが、アナログペプチドの治療応用には必要となるであろう。

文 献

- 1) Kita H, Mackay IR, Van De Water J, et al. The lymphoid liver : considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology* 2001 ; 120 : 1485-501.
- 2) Kita H, Nalbandian G, Keeffe EB, et al. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2003 ; 7 : 821-39.
- 3) Kita H, He X-S, Gershwin ME. Autoimmunity and environmental factors in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Ann Med* 2004 ; 36 : 72-80.
- 4) Kita H, Lian ZX, Van De Water J, et al. Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis : T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *J Exp Med* 2002 ; 195 : 113-23.
- 5) Kita H, Matsumura S, He XS, et al. Analysis of TCR antagonism and molecular mimicry of an HLA-A0201- restricted CTL epitope in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2002 ; 36 : 918-26.
- 6) Kita H, Matsumura S, He XS, et al. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 1231-40.
- 7) Kozovska M, Zang YC, Aebischer I, et al. T cell recognition motifs of an immunodominant peptide of myelin basic protein in patients with multiple sclerosis : structural requirements and clinical implications. *Eur J Immunol* 1998 ; 28 : 1894-901.
- 8) Kuchroo VK, Greer JM, Kaul D, et al. A single TCR antagonist peptide inhibits experimental allergic encephalomyelitis mediated by a diverse T cell repertoire. *J Immunol* 1994 ; 153 : 3326-36.
- 9) Nicholson LB, Greer JM, Sobel RA, et al. An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 1995 ; 3 : 397-405.
- 10) Brocke S, Gijbels K, Allegretta M, et al. Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature* 1996 ; 379 : 343-6.

* * *



原発性胆汁性肝硬変の経過観察における 「MESACUP-2 テスト ミトコンドリア M2」 測定の臨床的意義

— 蛍光抗体間接法との比較検討 —

大 曲 勝 久¹⁾・角 川 淑 子¹⁾
石 原 康²⁾・河 野 茂¹⁾

はじめに

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は中年以後の女性に好発する慢性進行性胆汁うっ滞性肝障害で, 原因として自己免疫機序が想定されている。抗ミトコンドリア抗体 (AMA) は, PBC 患者の血清に高頻度かつ高力価に認められる自己抗体であり, 肝組織学的検索と並んで本症の診断に極めて重要である。AMA の対応抗原は M1 から M9 抗原に分類されるが, そのうち PBC に特異的であるのは M2 抗原であり, 2-oxo-acid dehydrogenase complex (2-OADC) という酵素群と同一であると考えられる。2-OADC は pyruvate dehydrogenase complex (PDC), 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (OGDC) および branched chain oxo-acid dehydrogenase complex (BCOADC) からなり, それぞれ E1, E2, E3 のサブユニットから構成

されている。さらに PDC-E1 と BCOADC-E1 は E1 α と E1 β , また PDC には E3 binding protein (E3BP) が存在する。このうち PBC 患者血清中の AMA が特異的に反応するのは PDC-E2, E3BP, BCOADC-E2, OGDC-E2, PDC-E1 α , PDC-E1 β の六つであり, なかでも PDC-E2, E3BP, BCOADC-E2, OGDC-E2 に対する抗体の出現頻度が高い。PBC 患者血清中にはこれらに対する抗体の一つあるいは複数が存在する可能性が極めて高く, PDC-E2 と E3BP 以外はお互いに交差反応を示さないとされている¹⁾。

AMA の測定法には従来の蛍光抗体間接法 (IF 法) の他に, ELISA 法による「抗ミトコンドリア M2 抗体」, Western blotting 法 (WB 法), enzyme inhibition assay (EIA 法) があり, 現在健康保険で認められているのは IF 法での AMA (IF-AMA) と「抗ミトコンドリア

1) 長崎大学医学部第2内科 2) ㈱医学生物工学研究所学術部

Clinical significance of antimitochondrial antibody by ELISA using "MESACUP-2 Test Mitochondrial M2" kit for the diagnosis of primary biliary cirrhosis

Katsuhisa Omagari, Yoshiko Kadokawa, Shigeru Kohno *Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine*

Yasushi Ishihara *Technical Service Department, Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.*

Key words : 原発性胆汁性肝硬変, 抗ミトコンドリア抗体, ELISA 法, 蛍光抗体間接法, 経時的変化

M2抗体」である。WB法はほぼ100%の感度があるが²⁾、手技が煩雑で定量性に乏しく、研究室レベルで行われているのみである。EIA法はAMAがPDC活性を阻害することを利用した測定法でほぼ100%の疾患特異性を有しているが、欧米に比べて抗PDC-E2抗体の出現頻度が低い本邦においては感度が問題となる^{3,4)}。ELISA法による従来の「抗ミトコンドリアM2抗体」は精製PDCを抗原としてIgGクラスの抗体のみを検出するためEIA法と同様その感度が問題であったが、2002年4月から固相抗原にリコンビナントのPDC-E2, BCOADC-E2, OGDC-E2を用い、標識抗体に抗ヒトイムノグロブリン抗体を使用することにより、IgG, IgM, IgAクラスの抗体が検出可能となったELISA法測定キット「MESACUP-2テストミトコンドリアM2」(株)医学生物学研究所: MBL社(本稿ではNew-M2と略す)が使われるようになり、その感度がIF-AMAにほぼ匹敵するようになった^{5)~8)}。しかし、IF-AMAとNew-M2は保険点数が同じで同時算定はできないため、今後臨床の場で両者をどのように使い分けていくかを検討する必要がある。

今回われわれはPBCの診断および経過観察におけるNew-M2測定の臨床的意義をIF-AMAとの比較により検討したので報告する。

I. 対 象

対象は、当科にて経過観察されインフォームドコンセントを得たうえで血清を -80°C で凍結保存されている慢性肝疾患患者124例(男性23例, 女性101例, 平均年齢 58.4 ± 12.2 歳)で、疾患の内訳は、PBC 47例, 自己免疫性胆管炎(autoimmune cholangitis: AIC) 8例, 自己免疫性肝炎(autoimmune hepatitis: AIH) 33例, B型慢性肝疾患(慢性肝炎4例, 肝硬変6例) 10例, C型慢性肝炎17例, 脂肪肝8例, アルコール性肝硬変1例である。PBCは厚生省研究班の診断基準⁹⁾により診断し、経過中少なくとも一度はIF-AMA陽性であり、組織学的に確認された症例のみを対象とした。AICは抗核抗

体陽性かつIF-AMA陰性で、生化学検査および組織学的にPBCに矛盾しないものとした。AIHは国際診断基準¹⁰⁾にてdefinite AIHと診断され、組織学的に確認された症例のみを対象とした。124例のうち57例は1~4年の経過観察中に年1~2回の頻度で血清が保存されており、合計255検体の血清学的検討を行った。

II. 方 法

1. 蛍光抗体間接法による抗ミトコンドリア抗体(IF-AMA)

ラットの胃と腎を基質として用いた「フルオロAID-1テスト」(MBL社)にて測定し、血清希釈20倍以上で特異蛍光が認められるものを陽性と判定した。

2. 改良ELISA法による抗ミトコンドリアM2抗体(New-M2)

前出の「MESACUP-2テストミトコンドリアM2」(MBL社)にて測定し、Index値7以上を陽性と判定した。この場合、測定する血清は101倍希釈した血清を用いた。

3. 高希釈血清を用いたELISA法による抗ミトコンドリアM2抗体(High-M2)

「MESACUP-2テストミトコンドリアM2」(MBL社)キットの特性としてダイナミックレンジの広い自己抗体群を測定レンジにおさめて直線回帰しているため、吸光度値とIndex値の直線関係は乏しく特に高Index値側の測定値が実際の濃度変化に対して圧縮される。このためキットの検出感度Index値約2.5から考えて40倍希釈してもほぼ信頼性があると思われるIndex値80以上の検体についてのみ通常の希釈倍率よりさらに40倍(原血清からは4,040倍)希釈した場合の測定値を求め、Index値80以下のNew-M2の血清と合わせてHigh-M2値として集計した。

なお、IF-AMA, New-M2, およびHigh-M2はすべて同一検体を用いて一括測定した。

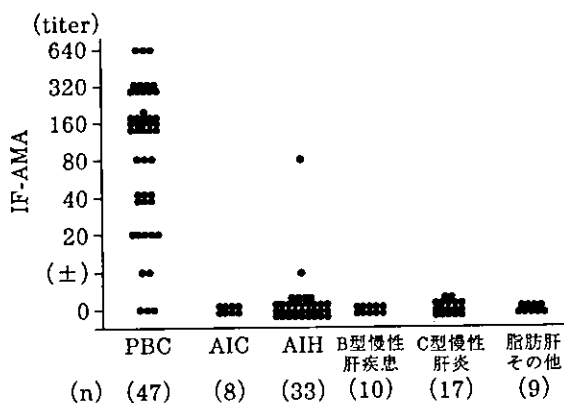


図1 各疾患別のIF-AMAの分布

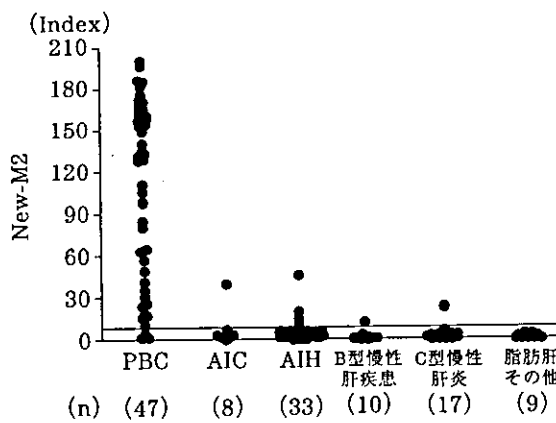


図2 各疾患別のNew-M2の分布

表1 各疾患別のIF-AMAおよびNew-M2の測定結果

疾患	症例数	IF-AMA		New-M2		IF-AMA (+) New-M2 (+)	IF-AMA (+) New-M2 (-)	IF-AMA (-) New-M2 (+)	IF-AMA (-) New-M2 (-)
		(+)	(±)(-)	(+)	(-)				
PBC	47	42	5	44	3	40	2	4	1
非PBC	77	1	76	7	70	1	0	6	70
AIC	8	0	8	1	7	0	0	1	7
AIH	33	1	32	4	29	1	0	3	29
B型	10	0	10	1	9	0	0	1	9
C型	17	0	17	1	16	0	0	1	16
脂肪肝	8	0	8	0	8	0	0	0	8
ALC	1	0	1	0	1	0	0	0	1
計	124	43	81	51	73	41	2	10	71

B型：B型慢性肝疾患 C型：C型慢性肝炎 ALC：アルコール性肝硬変

III. 結 果

1. IF-AMA および New-M2 の感度および特異度

IF-AMA および New-M2 の各疾患別の測定結果の分布を図1および図2に示した。

IF-AMA では、AIH の1例を除き陽性例はPBCのみで、かつ高力価を示した(図1)。

New-M2においてもPBCで高力価陽性例が多かったが、AIHの4例とAIC、B型慢性肝疾患、C型慢性肝炎で1例ずつ陽性例が認められた(図2)。

各疾患別のIF-AMA および New-M2 の判定結果を表1に示す。PBCにおける両者の不一致(乖離)例は6例(12.8%)にみられ、そのうち4例はNew-M2のみ陽性、2例はIF-AMAのみ陽性であった。非PBC群では、両者の不一致例は6例(7.8%)にみられ、全例New-M2のみ陽性であった。また、AIHの1例はIF-AMA、New-M2ともに陽性であった(表1)。

以上よりPBCに対するIF-AMAとNew-M2の感度と特異度を検討すると、感度はNew-M2が93.6%とIF-AMAの89.4%を上回っていたが、特異度はNew-M2がAIHをは

表2 PBCにおけるIF-AMAとNew-M2の臨床的感度および特異度

測定法	感度	特異度	陽性予測力	陰性予測力	真度(正確度)
IF-AMA	89.4% (42/47)	98.7% (76/77)	97.7% (42/43)	93.8% (76/81)	95.2% (118/124)
New-M2	93.6% (44/47)	90.9% (70/77)	86.3% (44/51)	95.9% (70/73)	91.9% (114/124)

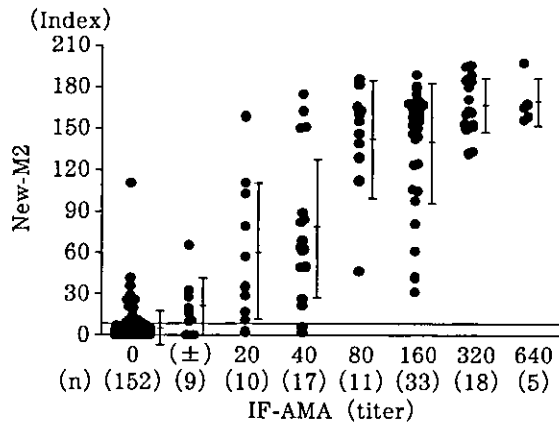


図3 IF-AMAとNew-M2との相関

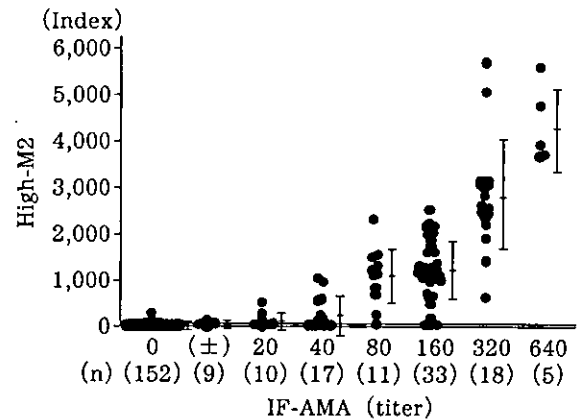


図4 IF-AMAとHigh-M2との相関

じめ他疾患で陽性となることがあるため90.9%とIF-AMAの98.7%より低く、したがって真度(正確度)はIF-AMAがやや優れていた(表2)。

2. IF-AMAとNew-M2, High-M2との相関

測定した合計255検体についてIF-AMAのtiterとNew-M2, High-M2のIndex値の関係を検討した。IF-AMAのtiterと通常の希釈倍率でのIndex値(New-M2値)との相関では、IF-AMAのtiterが高いほどNew-M2値も高くなっていた(図3)。Index値80以上の血清をさらに40倍希釈して算出したHigh-M2値を用いると、さらにその傾向は明瞭となった(図4)。

3. 経過観察例での経時的変化の検討

1~4年の経過観察中に年1~2回の頻度で血清が保存されていた57例(PBC 28例, AIC 8例, AIH 15例, C型慢性肝炎6例, すべて組織学的に確認されている)について、IF-AMAの

titer, New-M2値(あるいはHigh-M2値), 血清アルカリフォスファターゼ(ALP)値, 血清γ-GTP値の経時的変化を検討した。

非PBC症例29例のうち6例でNew-M2が経過中陽性を示したが、いずれもIndex値80以下であった(表3)。AIC 8例のうち1例はIF-AMAが陰性にもかかわらずNew-M2は持続陽性であった。この症例はわれわれが以前検討したWB法にてIgGクラス抗BCOADC-E2抗体単独陽性が確認されている¹¹⁾。AIHでは15例中4例がNew-M2陽性であったが、うち1例はIF-AMAも一時点で80倍陽性であり、PBC-AIH overlap症候群の可能性も示唆された。他の3例はIF-AMA陰性にもかかわらずNew-M2が時に陽性であった。C型慢性肝炎では6例中1例においてIF-AMA持続陰性にもかかわらずNew-M2は持続陽性であった。この症例はWB法にてIgM, IgAクラス抗PDC-E2抗体および抗BCOADC-E2抗体が陽性であった。他の23例ではIF-AMAおよび

表3 New-M2陽性非PBC患者血清の推移

年齢(歳)	性	診断名	採血日	IF-AMA (titer)	New-M2 (Index)
52	F	AIC	1999.10.7	(-)	41.3
			2000.11.17	(-)	34.4
75	F	AIH	2000.11.17	80	45.6
			2002.5.1	(-)	23.0
66	F	AIH	2001.2.14	(-)	8.5
			2002.3.12	(-)	0.7
			2003.3.11	(-)	0.3
69	F	AIH	1999.1.13	(-)	19.3
			2000.2.23	(-)	5.3
			2001.5.24	(-)	8.7
			2002.2.1	(-)	16.3
			2003.2.27	(-)	10.6
40	F	AIH	2000.2.14	(-)	13.8
			2001.2.7	(-)	0.0
			2002.1.10	(-)	2.9
			2003.1.8	(-)	24.1
66	F	C型慢性肝炎	1999.6.16	(-)	23.6
			2001.5.22	(-)	22.5
			2002.7.2	(-)	23.9
			2003.7.8	(-)	26.7

New-M2は経過中持続陰性であった。

PBC 28例は全例がウルソデオキシコール酸(UDCA)300~600mg/日投与中であり、そのうち20例は1~9年前よりすでに治療されていた。経過観察期間中に黄疸の出現など臨床症状の進行は認められなかった。経過中のIF-AMAのtiter, New-M2値, High-M2値, 血清ALP値, 血清γ-GTP値の推移を表4に示した。7例でIF-AMAのtiterとNew-M2値の経過が一致(低下3例, 不変1例, 変動2例, 増加1例)し, 14例でIF-AMAのtiterとHigh-M2値の経過が一致していた(低下5例, 不変3例, 変動5例, 増加1例)が, このうち6例は図5の例に示すように, New-M2値ではなくHigh-M2値とIF-AMAのtiterの経過が連動していた。New-M2値とIF-AMAのtiter, 血清ALP値および血清γ-GTP値の推移をみると, 3例は四つすべての経過が一致したが(すべて低

表4 PBC経過観察28例の各種検査値の推移

検査項目	低下	不変	変動	増加
IF-AMA	11(陰性化3例)	5	9	3
New-M2	5(陰性化1例)	13	3	7
High-M2	7(陰性化1例)	11	6	4
血清ALP	6	18	1	3
血清γ-GTP	11	12	2	3

下), 9例はIF-AMAのtiterのみ経過が相違し, 6例はNew-M2値のみ経過が相違していた。一方, High-M2値とIF-AMAのtiter, 血清ALP値および血清γ-GTP値の推移を検討すると, 5例が四つすべての経過が一致したものの(低下3例, 不変1例, 変動1例), 6例がIF-AMAのtiterのみ経過が相違し, 4例がHigh-M2値のみ経過が相違していた。ただし, この4例はすべてIndex値80以下, すなわちNew-M2値と同じであり, したがってHigh-M2値のみ経過が相違する症例はなかった。New-M2値のみ経過が不変であった症例およびIF-AMAのtiterのみ低下した症例をそれぞれ図6, 7に示す。

以上より, PBCの経過観察にはIF-AMAのtiterよりもNew-M2値やHigh-M2値, 特にHigh-M2値の経過が血清ALP値やγ-GTP値と連動する場合が多く有用である可能性が考えられた。

IV. 考 察

IF-AMAと感度がほぼ匹敵, あるいはこれを凌駕するNew-M2が臨床の場に登場したことで, この両者をどのように使い分け, どのように役立てるかが問題となっている。IF-AMAは蛍光顕微鏡下に目視で観察するため客観的な判定にはやや熟練を要し, 低力価の場合は抗カルジオリピン抗体や抗LKM-1抗体, 異好抗体, 抗小胞体抗体, 抗リボゾーム抗体などと鑑別が困難な場合がある¹²⁾。New-M2はPBCで出現頻度が高いPDC-E2, BCOADC-E2, OGDC-E2

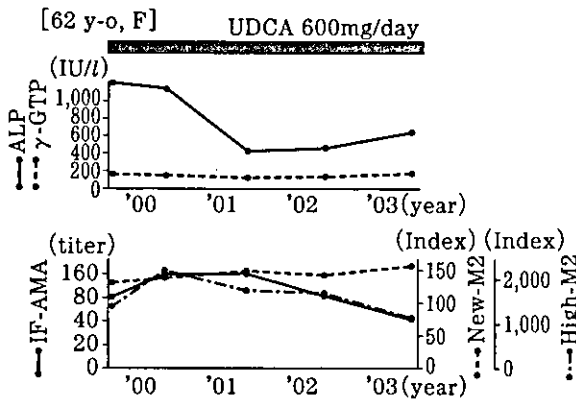


図5 血清ALP, IF-AMA, High-M2値は低下したが, New-M2値は不変であった症例

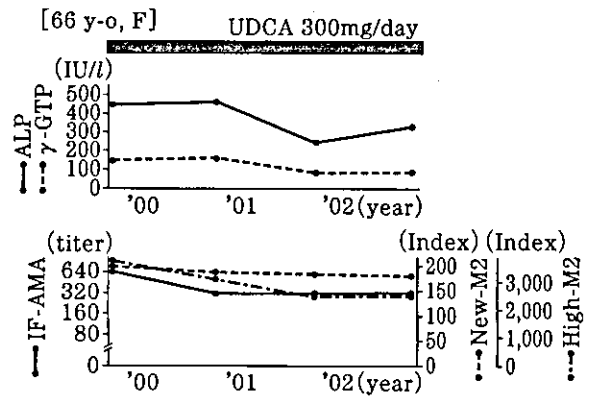


図6 血清ALP, γ-GTP, IF-AMA, High-M2値は低下したが, New-M2値は不変であった症例

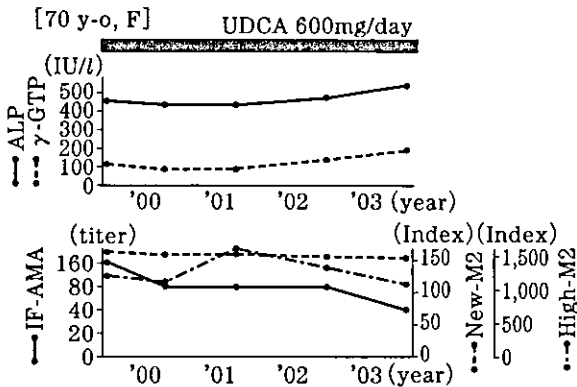


図7 IF-AMAは160倍から40倍に低下したが, 血清ALP, γ-GTP, New-M2値は不変, High-M2値も変動はあるものの不変であった症例

に対する抗体をELISA法で検出するため, 理論上はIF-AMAよりもより直接的・客観的に抗2-OADC抗体の有無を判定できると考えられる。われわれの以前の検討でも, New-M2は従来の「抗ミトコンドリアM2抗体」やEIA法よりも感度がよく, IF-AMAとほぼ同等であった。この中で, PBC 82例中6例(7.3%)がIF-AMAとNew-M2の結果が乖離しており, うち4例がIF-AMA陰性・New-M2陽性, 2例がIF-AMA陽性・New-M2陰性であった。この6例全例がWB法にてIgGあるいはIgMクラスの抗2-OADC抗体陽性であり, したがってNew-M2のほうが検出感度は優れていると思

われた⁸⁾。

今回の検討でNew-M2はPBC以外, 特にAIHで陽性例が認められ, その結果IF-AMAと比較してPBCに対する特異度が低くなった。これが偽陽性なのか真に存在する抗2-OADC抗体を検出しているのかの確認が必要である。今回の検討ではAIH血清に対するWB法での確認は行わなかったが, これまでの報告では, AIHの16~34%にWB法にて抗2-OADC抗体が検出されたとされている¹³⁾¹⁴⁾。さらに, われわれが検討したNew-M2が陽性であったAICの1例とC型慢性肝炎の1例はいずれもWB法で抗2-OADC抗体が陽性であることが以前の検討で確認されており, これらも偽陽性とは考えにくいと思われる⁸⁾。したがって, これらがPBC-AIH overlap症候群や早期(および発症前)PBC¹⁵⁾を表しているのか, あるいはこのAMAが別の意味合いを持っているのか, 詳細な組織学的検討を含めてさらに探求してゆく必要がある。いずれにしても, AMAはPBCのみに特異的に検出されるのではなく, 詳細な検討を行うとAIC¹⁶⁾やAIHなど他の肝疾患でも検出され得る可能性があり¹⁷⁾, この実態と機序が解明されれば, New-M2の特異度はさらに改善される可能性がある。

IF-AMAが希釈倍数で表されるのに対し, New-M2は連続した実数で結果が出るため, より細かい力価の変動が検討できると思われ,

PBCの疾患活動性や治療のモニターにより適していると推測される。今回の検討では、PBCの大半が以前よりUDCAにて治療されていたため治療初期の反応を検討することができなかったが、経過観察期間中IF-AMAのtiterよりもNew-M2値やHigh-M2値、特にHigh-M2値の経過が血清ALP値や γ -GTP値と連動する場合が多かった。従来より、PBCの疾患重症度とAMAの抗体価や出現率には相関がないとされており、また、PBCの疾患活動性を血清ALP値や γ -GTP値のみで判断してよいかどうかは議論のあるところではあるが¹⁸⁾、臨床の現場においてはUDCAの効果は血清ALP値や γ -GTP値の推移で推測することが多く、一方、長期観察例ではIF-AMAのtiterが低下することが観察されており¹⁹⁾、より細かい力価の変動が観察できるNew-M2（およびHigh-M2）は、PBCの経過観察に有用であると思われる。

結 語

新しく開発されたNew-M2はPBCの診断に対してIF-AMAよりも高感度であった。一方、特異度はIF-AMAと比べてやや低かったが、AMAはAICやAIHなどPBC以外の疾患でも検出されることが報告されており、その出現機序が明らかになれば、特異度の評価はさらに改善される可能性がある。経過観察例においては、IF-AMAのtiterよりもNew-M2値やHigh-M2値、特にHigh-M2値の経過が血清ALP値や γ -GTP値と連動する場合が多く、より細かい力価の変動が観察できるNew-M2（およびHigh-M2）は、PBCの経過観察に有用であると思われる。IF-AMAとNew-M2の乖離例について今後さらに詳細に検討する必要があるが、日常診療においてNew-M2（およびHigh-M2）は従来法であるIF-AMAと同等もしくはそれ以上の有用性を有する可能性があると考えられた。

文 献

- 1) 大曲勝久, 生野信弘, 木下秀樹 他: 抗ミトコンドリア抗体と病因的意義. 肝胆臓 **39**: 39-44, 1999.
- 2) Kinoshita H, Omagari K, Matsuo I et al: Frequency of IgG, IgM, and IgA class autoantibodies against 2-oxo-acid dehydrogenase complex in 102 Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* **15**: 163-171, 1999.
- 3) Omagari K, Rowley MJ, Jois JA et al: Immunoreactivity of antimitochondrial autoantibodies in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol* **31**: 61-68, 1996.
- 4) Hazama H, Omagari K, Masuda J et al: Automated enzymatic mitochondrial antibody assay for the diagnosis of primary biliary cirrhosis: Applications of a routine diagnostic tool for the detection of antimitochondrial antibodies. *J Gastroenterol Hepatol* **17**: 316-323, 2002.
- 5) 竹村真理, 大矢和彦, 小島和夫: MESACUP-2 テスト ミトコンドリア M2 の基礎的検討. 医学と薬学 **46**: 809-816, 2001.
- 6) 橋本悦子, 島田昌彦, 林 直諒: 原発性胆汁性肝硬変におけるリコンビナント抗原を用いたELISA法による抗ミトコンドリアM2測定 of 診断的意義. 医学と薬学 **46**: 1031-1037, 2001.
- 7) 大矢和彦, 新井次郎: リコンビナント抗原を用いた抗M2抗体の検出試薬の開発—MESACUP-2 テスト ミトコンドリアM2の開発—. *BIO Clinica* **17**: 843-846, 2002.
- 8) Kadokawa Y, Omagari K, Hazama H et al: Evaluation of newly developed ELISA using “MESACUP-2 Test Mitochondrial M2” kit for the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Clin Biochem* **36**: 203-210, 2003.
- 9) 厚生省「難治性の肝炎」調査研究班: 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の診断基準, 1992.
- 10) International Autoimmune Hepatitis Group Report: Review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* **31**: 929-938, 1999.
- 11) Omagari K, Ikuno N, Matsuo I et al: Autoimmune cholangitis syndrome with a bias towards primary biliary cirrhosis. *Pathology*

- 28 : 255-258, 1996.
- 12) 野口英郷, 楠悦子, 水越和則: 抗糸粒体抗体検査と技術 **19** : 1119-1126, 1991.
- 13) Yanagawa T, Miyakawa H, Shibata M et al : Immuno reactivity to pyruvate dehydrogenase complex-E2 in well-defined patients with autoimmune hepatitis : Western blot analysis. *Hepatol Res* **26** : 81-86, 2003.
- 14) 田中 篤, 矢島佐江子, 中島 洋 他 : 自己免疫性肝炎における抗ミトコンドリア抗体の検出—胆管病変との関連はあるのか—. *MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW* **47** : 181-185, 2002.
- 15) Metcalf JV, Mitchison HC, Palmer JM et al : Natural history of early primary biliary cirrhosis. *Lancet* **348** : 1399-1402, 1996.
- 16) Kinoshita H, Omagari K, Whittingham S et al : Autoimmune cholangitis and primary biliary cirrhosis—an autoimmune enigma. *Liver* **19** : 122-128, 1999.
- 17) 大曲勝久 : 「AMA 神話」をめぐって. *診療と新薬* **40** : 279-282, 2003.
- 18) Matsuo I, Omagari K, Kinoshita H et al : Elevation of serum gamma-glutamyl transpeptidase precedes that of alkaline phosphatase in the early stages of primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* **14** : 223-232, 1999.
- 19) 山崎 潔, 中村篤志, 安倍 修 他 : ウルソデオキシコール酸療法は原発性胆汁性肝硬変の抗ミトコンドリア抗体価を低下させる. *消化器と免疫* **33** : 169-172, 1996.

* * *

合併する肝外自己免疫疾患の特徴

中村 陽子*
なかむら ようこ

- 自己免疫性肝疾患には膠原病 (RA, SjS, SSC) の合併が多い。
- PBC には二次性 SjS, 潜在性自己免疫性甲状腺炎が多い。
- PBC においてはレイノー現象で CREST 症候群を考える。
- PSC には炎症性腸疾患や自己免疫性膵炎の合併がある。

Key Words 二次性 SjS, 潜在性自己免疫性甲状腺炎, CREST 症候群, 炎症性腸疾患, 自己免疫性膵炎

はじめに

本稿においては自己免疫性肝疾患に伴いやすい肝外自己免疫性疾患について概説する。

□ 自己免疫性肝炎

autoimmune hepatitis (AIH)

合併しやすい自己免疫性疾患 (表 1) として関節リウマチ rheumatoid arthritis (RA), 慢性甲状腺炎 (橋本病), シェーグレン症候群 Sjögren's syndrome (SjS), レイノー現象, 全身性エリテマトーデス systemic lupus erythematosus (SLE), 混合性結合組織病 mixed connective tissue disease (MCTD), 特発性血小板減少性紫斑病 idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), 自己免疫性溶血性貧血 autoimmune hemolytic anemia (AIHA) などがある。

当院の AIH 27 例中, 上記疾患合併は 10 例あり, 延べ合併例は SjS 6 例, 橋本病 3 例, SLE 3 例, MCTD 2 例, RA 1 例であった。

橋本病, SjS, レイノー現象については PBC 欄で述べるが, 以下他疾患について言及する。

1. 関節リウマチ (RA)

RA は原因不明の全身性自己免疫性疾患で, 慢性, 対称性, そして末梢関節のびらん性滑膜炎が特徴である。大部分では血清リウマトイド因子 (RF) 価も上昇する。合併する関節外病変としては, 皮下結節, 血管炎, 心膜炎, 肺リウマトイド結節, 肺線維症などがある。

朝のこわばり, 3ヵ所以上の関節炎, 手関節炎, 対称性関節炎, リウマトイド結節, RF, X 線異常

表 1 自己免疫性肝疾患に合併する自己免疫疾患

	AIH ¹⁾	PBC ²⁾	PSC ³⁾
症例数	187	1839	192
関節リウマチ	13.4%	4.5%	2.1%
シェーグレン症候群	11.8%	14.4%	1.0%
橋本病	11.8%	5.8%	0.5%
レイノー現象	3.7%	3.2%	
強皮症		1.5%	
潰瘍性大腸炎		0.3%	20.0%
クローン病			1.0%
慢性膵炎			15.0%

所見のうちの 4 項目について該当すれば RA とみなす⁴⁾。しかし本疾患の多くの関節外症状, 特徴的な対称性の炎症, 典型的な血清学的所見, X 線像の変化は疾患初期には明らかでない。

そこで診断の根拠となるのは, 関節液の吸引により滑液の白血球増加を証明し, 結晶の存在を否定することである。また RF は RA 患者血清の約 85% に認められ, 関節外病変, 結節および重症度と関連傾向があるといわれているので, RF を測定することである。ただし RF は健常人の約 3% に検出され, その割合は加齢とともに増加し肝炎などを含む慢性炎症性疾患でも検出されることに留意すべきである。

当院通院中の RA 患者 982 例の検討では肝障害を 11.3% に認め, 薬剤性肝障害がその 38.7% を占めていた。AIH は 1 例, PBC は 5 例の合併を認めた。43 剖検 RA 症例の肝組織の検討では AIH,

* 国立相模原病院 内科 <E-mail: nakamury@sagamihara.hosp.go.jp, tel: 042-742-8311(内 7231)>

PBC 合併はなく、重篤な肝障害はなかった。

2. 全身性エリテマトーデス (SLE)

SLE は細胞核成分に対する抗体の産生と多様な臨床症状の発現とを特徴とする自己免疫疾患である。抗核抗体 (ANA) は、SLE にもっとも特徴的であり患者の 95% 以上で認められるが、ANA のうちで実質的に SLE 特異的なものはわずかに 2 種類だけで、二本鎖 DNA に対する抗体 (dsDNA 抗体) と Sm と呼ばれる RNA 蛋白複合体に対する抗体のみである。SLE における陽性率は dsDNA 抗体は 40%、Sm 抗体は 30% である⁴⁾。

SLE 発症時に出現する全身症状の頻度は、発熱、関節痛や関節炎約 75%、皮膚症状 (蝶形紅斑、光線過敏症など) 約 55%、ループス腎炎約 45%、レイノー現象約 33%、以下中枢神経症状、胸膜炎、心膜炎、胃腸症状、血管炎である。貧血、白血球、リンパ球や血小板減少、ループス抗凝固因子や梅毒反応偽陽性 (VDRL 試験偽陽性)、総溶血性補体活性や補体成分 C3 や C4 値の低下もよくみられる。

上記の診断項目を検討すると、AIH に SLE が合併しているかどうかの診断は非常に困難である。すなわち自己抗体、血液学的異常など類似点が多く SLE の肝障害をみたときに AIH と診断するには肝生検が必須である。

SLE の 52 肝組織を検討した松本ら⁵⁾の報告によればうっ血肝、脂肪肝が多く、chronic persistent hepatitis 6, nonspecific reactive hepatitis 5, nodular regenerative hyperplasia 3 などとなっている。同時に日本の SLE 剖検 1468 例も検討しており、慢性肝炎 2.4%、肝硬変 1.1%、肝線維症 0.8% と報告している。原因肝疾患については不明である。

3. MCTD

SLE、多発性筋炎や皮膚筋炎および強皮症がさまざまな組み合わせで混在しており、nRNP あるいは U1 RNP 抗原に対する抗体が高値陽性を示す。しかし鑑別不能膠原病症候群にも含まれるこの疾患概念はなお論争的である。

4. ITP

血小板減少があるが骨髓低形成の認められないことを特徴とする。自己血小板抗体が血小板減少の主要原因と考えられており、血小板表面上に結合している免疫グロブリン G (platelet-associated

IgG : PAIgG) の測定が重要である。抗核抗体や抗 DNA 抗体などの出現が多く、出血時間の延長はあるが、凝固線溶系は正常である。

5. AIHA

免疫寛容の破綻に起因する抗赤血球自己抗体産生により誘導される溶血性貧血である。血管内溶血も関与するが IgG-Fc レセプタを介した脾臓のマクロファージによる血管外溶血が主と考えられている。直接クームス試験陽性が多く、血清ハプトグロビン減少、網赤血球増加、骨髓赤芽球過形成などがみられる。

□ 原発性胆汁性肝硬変

primary biliary cirrhosis (PBC)

合併しやすい自己免疫性疾患 (表 1) としては SjS、橋本病、RA、レイノー現象、全身性強皮症 systemic sclerosis (SSc) などがあげられる。

当院の PBC 54 例中では橋本病 19 (35.2%)、SjS 6 (11.1%)、RA 6 (11.1%)、MCTD 1 (1.9%)、ベーチェット病疑い 1 (1.9%) の合併がある。

1. シェーグレン症候群 (SjS)⁶⁾

涙腺と唾液腺の慢性炎症性疾患であり、乾燥性角結膜炎、口腔乾燥症が主症状である。Schirmer 試験第 1 法やローズベンガル試験、唾液腺シンチグラム、唾液腺造影、唾液腺生検で特徴的所見が得られる。SjS 単独のものを原発性、RA や SLE など種々の慢性炎症性結合織病を合併するものを二次性と分類する。特異性の高い自己抗体としては抗 Ro/SS-A 抗体、抗 La/SS-B 抗体がある。抗 La/SS-B 抗体陽性率は抗 Ro/SS-A 抗体陽性率に比し低率であるが抗 La/SS-B 抗体が検出されれば原発性である可能性が高い。

SjS での肝障害は 10% 前後で認められ、脂肪肝などの他、PBC や AIH も報告されている。一方、PBC や AIH に SjS 合併は高率である。二次性 SjS に分類され、原発性に比して、唾液腺の組織所見が軽度で抗 Ro/SS-A 抗体や抗 La/SS-B 抗体、HLAB 8 や DR 3 の検出率は必ずしも高くない。

2. 慢性甲状腺炎

慢性甲状腺炎と橋本病とは同義語であり、甲状腺に対する自己抗体—抗甲状腺マイクロゾーム (甲状腺ペルオキシダーゼ) 抗体、抗サイログロブリン抗体—が陽性でびまん性の甲状腺腫大がある場

合に橋本病とされる。びまん性の甲状腺腫大がない場合を潜在性自己免疫性甲状腺炎（広義の橋本病）といい、成人女性の8.5%、成人男性の4.2%に認められる。

PBCにおいて橋本病の合併率は6%前後といわれている。当院のPBC 54例（平均年齢64.9歳、男女比6対48）および対照例として慢性肝疾患45例（HBs抗原陽性5例、HCV抗体陽性37例、アルコール性肝障害3例）の抗甲状腺抗体を測定した⁷⁾。PBCの抗体陽性率は35.2%で慢性肝疾患例より高率であった。甲状腺自己抗体陽性、陰性とPBCの臨床像（AMAやANA力価、症候の有無など）とは関係がなかった。PBCでは潜在性自己免疫性甲状腺炎が多いことが示唆された。

3. レイノー現象

寒冷曝露などで手足の指の一時的な蒼白化、チアノーゼが出現する状態をいう。血管のれん縮のみならず血管の構造上の障害にも起因し、強皮症やSLEなどの膠原病に多くみられる他、血管障害や神経障害にも合併し得る。

4. 全身性強皮症（強皮症）(SSc)

強皮症はレイノー現象、手指の腫脹、多発性関節炎で発症し、皮膚、消化管、肺、心臓、腎臓などに炎症性変化や線維化をきたす全身性疾患である。診断は皮膚の肥厚、抗セントロメア抗体や抗トポイソメラーゼ抗体の検出、皮膚生検などで行われ、SjS合併が20%にある。

PBCに合併する強皮症の大半が手指に局限する軽症型で、稀に軽度の食道運動障害や肺拡散機能障害を認める。PBCに抗セントロメア抗体が検出される例ではCREST症候群（石灰化、レイノー現象、食道運動機能異常、手指硬化、毛細血管拡張症）の合併を疑うべきである。

□ 原発性硬化性胆管炎

primary sclerosing cholangitis (PSC)

合併しやすい自己免疫性疾患としては（表1）潰瘍性大腸炎、クローン病や慢性膵炎がある。

1. 炎症性腸疾患 inflammatory bowel disease (IBD)

IBD、すなわち潰瘍性大腸炎とクローン病の病因については不明であるが、PSCとの合併においては胆管上皮と腸上皮の共通抗原を標的とする免疫

反応による可能性も示唆されている。IBDには皮膚病変、血管炎、関節炎、眼疾患などの腸管外病変を呈することが多い。

海外ではPSCにIBD（特に潰瘍性大腸炎）の合併は50~100%、本邦では18%前後となっている。潰瘍性大腸炎の10%前後に肝障害が認められるが、海外では3.7%にPSCが認められている。IBD非合併PSC患者は合併例に比して黄疸、痒みが強く、肝外胆管病変が多かったという報告もあるが両群間に差がないという報告もある。

2. 慢性膵炎

PSCに伴う慢性膵炎の成因には膵胆管合流部の機能異常説や自己免疫説などがあげられている。慢性膵炎合併例は比較的高齢で男性に多く、閉塞性黄疸で発症するが比較的前後の良好な例が多い。高 γ -グロブリン血症、自己抗体が出現し、ステロイドが有効で特異な膵組織像を呈する自己免疫性膵炎（自己免疫現象を伴う膵管狭細型膵炎）が最近注目されているが、岡崎ら⁸⁾は21例の自己免疫性膵炎でSjS 15%、硬化性胆管炎20%、RA 10%、橋本病5%合併を報告している。

文 献

- 1) 平成2年度厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究班. 1991
- 2) 平成9年度厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究班の原発性胆汁性肝硬変（PBC）全国調査集計結果（第18報）. 1998
- 3) 滝川 一，他：わが国における原発性硬化性胆管炎の疫学. 肝胆膵 32(1)：13-17, 1996
- 4) アメリカ関節炎財団原著：リウマチ入門（第10版）. 日本リウマチ学会編集，1996
- 5) Matsumoto T, et al：The liver in Systemic Lupus Erythematosus. Hum Pathol 23：1151-1158, 1992
- 6) 土肥和紘，編：シェーグレン症候群. 南江堂，1996
- 7) 中村陽子，他：PBCにおける甲状腺自己抗体陽性例の検討. 診療と新薬 37(6)：758-759, 2000
- 8) 岡崎和一：自己免疫性膵炎. 胆と膵 23(8)：685-691, 2002

Autocrine/Paracrine Regulation of the Growth of the Biliary Tree by the Neuroendocrine Hormone Serotonin

MARCO MARZIONI,* SHANNON GLASER,[†] HEATHER FRANCIS,[†] LUCA MARUCCI,[§] ANTONIO BENEDETTI,[§] DOMENICO ALVARO,[¶] SILVIA TAFFETANI,[†] YOSHIYUKI UENO,^{||} TANIA ROSKAMS,** JO LYNNE PHINIZY,[†] JULIET VENTER,* GIAMMARCO FAVA,* GENE D. LESAGE,^{††} and GIANFRANCO ALPINI*^{·††·††}

*Department of Medical Physiology, Scott & White Hospital and The Texas A&M University System Health Science Center, College of Medicine, Temple, Texas; [†]Division of Research & Education, Scott & White Hospital and The Texas A&M University System Health Science Center, College of Medicine, Temple, Texas; [§]Department of Gastroenterology, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy; [¶]Division of Gastroenterology, University of Rome, "La Sapienza," Rome, Italy; ^{||}Division of Gastroenterology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; **Department of Morphology and Molecular Pathology, University of Leuven, Leuven, Belgium; ^{††}Department of Internal Medicine, Scott & White Hospital and The Texas A&M University System Health Science Center, College of Medicine, Temple, Texas; and ^{†††}Central Texas Veterans Health Care System, Temple, Texas

Background & Aims: The biliary tree is the target of cholangiopathies that are chronic cholestatic liver diseases characterized by loss of proliferative response and enhanced apoptosis of cholangiocytes, the epithelial cells lining the biliary tree. The endogenous factors that regulate cholangiocyte proliferation are poorly understood. Therefore, we studied the role of the neuroendocrine hormone serotonin as a modulator of cholangiocyte proliferation. **Methods:** The presence of the serotonin 1A and 1B receptors on cholangiocytes was evaluated. We then tested whether the activation of such receptors by the administration of the selective agonists modifies cholangiocyte proliferation and functional activity both in vivo and in vitro. In addition, the intracellular signal mediating the serotonin receptor action in cholangiocytes was characterized. We studied the expression and secretion of serotonin by cholangiocytes and the effects of the neutralization of the secreted hormone on the growth of the biliary tree. **Results:** Cholangiocytes express the serotonin 1A and 1B receptors. Their activation markedly inhibits the growth and choleric activity of the biliary tree in the bile duct-ligated rat, a model of chronic cholestasis. Such changes are mediated by enhanced D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate/Ca²⁺/protein kinase C signaling and the consequent inhibition of the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate/protein kinase A/Src/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade. Cholangiocytes secrete serotonin, the blockage of which enhances cholangiocyte proliferation in the course of cholestasis. **Conclusions:** We observed the existence of an autocrine loop based on serotonin that limits the growth of the biliary tree in the course of chronic cholestasis. Our novel findings might open new approaches for the management of cholangiopathies.

The intrahepatic biliary tree is the target of several human diseases defined as cholangiopathies,¹ characterized by chronic cholestasis leading to liver failure.^{1,2} Recent studies have shown that such disorders are responsible for more than 20% of the liver transplantations among adults and for the 50% among pediatric patients in the United States.³ The pathophysiology of cholangiopathies commonly consists of an impaired balance between proliferation and death of cholangiocytes, eg, the epithelial cells lining the intrahepatic biliary tree.⁴ What regulates cholangiocyte proliferation and death and how these mechanisms fail is undefined.^{1,4} Cholangiocyte proliferation (normally mitotically dormant)⁵ is triggered in a number of experimental models,^{5,6} including the feeding of certain bile acids⁶⁻⁸ or the extrahepatic biliary obstruction induced by bile duct ligation (BDL).^{9,10} Cholangiocyte proliferation and the consequent growth of the intrahepatic biliary tree are coupled with enhanced secretin-induced choleresis and intracellular adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) synthesis.^{11,12}

The neuroendocrine system plays a relevant role in the modulation of cholangiocyte biology.^{10,12-16} Insulin inhibits secretin-induced choleresis in BDL rats,¹⁰ whereas the proliferative response of cholangiocytes to the BDL is

Abbreviations used in this paper: BAPTA/AM, bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetra-acetic acid/AM; BDL, bile duct incannulation; BDL, bile duct ligation; BSA, bovine serum albumin; CK-19, cytokeratin-19; DPAT, 2-(di-n-propylamino)-tertrallin; ERK, extracellular signal-regulated kinase; γ -GT, γ -glutamyltranspeptidase; IP₃, D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate; MEK, methylethylketone; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C.

© 2005 by the American Gastroenterological Association

0016-5085/05/\$30.00

doi:10.1053/j.gastro.2004.10.002

markedly diminished in rats deprived of endogenous estrogens¹⁴ or chronically treated with antiestrogens.¹³ Gastrin decreases the growth and functions of the biliary tree after BDL^{10,12} and blocks the growth of cholangiocarcinoma cell lines.¹⁵ Interestingly, it has also been observed that cholangiocytes from human livers affected by chronic cholestatic diseases show neuroendocrine features not present in normal livers.¹⁷

Serotonin is a neuroendocrine hormone secreted by enterochromaffin cells throughout the entire gastrointestinal tract.^{18,19} The local release of this hormone leads to marked changes in the functions of gastrointestinal epithelial cells. For example, the application of serotonergic agents enhances fluid and ion secretion of the intestinal mucosa,^{20,21} whereas the paracrine release of serotonin by enterochromaffin cells mediates the pancreatic secretion induced by intestinal luminal factors.^{19,22} In addition to its role as a regulator of secretory processes, serotonin has been found to modulate cell proliferation of vascular smooth muscle cells,²³ valvular subendocardial cells,²⁴ lymphocytes,²⁵ kidney epithelial cells,²³ or, in the gastrointestinal apparatus, hepatocytes.²⁶

It has been recently shown that serotonin is involved in the pathogenesis of certain clinical features of cholangiopathies, pruritus, and fatigue in particular.^{27,28} In animal models of chronic cholestasis, this seems to be due to an enhanced release of serotonin in the central nervous system and its interactions with subtype 1 serotonin receptors.²⁸

Unfortunately, nothing is known about the possible role of serotonin in the pathophysiology of chronic cholestasis. Therefore, in this investigation we posed the following questions: (1) Do cholangiocytes express functional serotonin 1A and 1B receptor subtypes? (2) What is the effect of the activation of these receptors on cholangiocyte proliferation and functional activity in the course of chronic cholestasis? (3) Which intracellular pathways are involved in the transduction of the serotonergic intracellular signal? and (4) Is serotonin involved in the autocrine modulation of the cholangiocyte response to chronic cholestasis?

Materials and Methods

Materials

Reagents were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO) unless otherwise indicated. The monoclonal mouse antibody against proliferating cellular nuclear antigen (PCNA) was obtained from DAKO (Kyoto, Japan). Intracellular cAMP and D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) levels were determined with radioimmunoassay (RIA) kits purchased from Amersham (Arlington Heights, IL). Serotonin receptor selective agonists and antagonists were purchased from Tocris

(Ballwin, MO). Antibodies for immunoblotting and immunohistochemistry were purchased from Santa Cruz Biotechnologies Inc. (Santa Cruz, CA) unless otherwise indicated. The substrate for γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT), *N*-(γ -L-glutamyl)-4-methoxy-2-naphthylamide, was purchased from Polysciences (Warrington, PA).

Expression of the Serotonin 1A and 1B Receptor Subtypes in Cholangiocytes

The expression of serotonin receptors was evaluated by immunohistochemistry in formalin-fixed and paraffin-embedded liver sections. Sections were immersed in 0.01 mol/L citrate buffer (pH 6.0) and irradiated in a microwave oven for 15 minutes. Liver sections were then incubated with or without the polyclonal primary antibody (1:20 dilution in 1× phosphate-buffered saline) for 2 hours at room temperature, and the reactive sites were detected by using a DAKO LSAB kit (according to the manufacturer's instructions) followed by incubation for 5 minutes with 1× phosphate-buffered saline containing 0.06% diaminobenzidine and 0.01% H₂O₂. Slides were counterstained with Harris hematoxylin.

Immunofluorescence was performed in acetone-fixed fresh-frozen liver sections and incubated with either the serotonin 1A or 1B antibody (both diluted 1:20) at 4°C overnight. Thereafter, after several washings, the samples were incubated with Alexa488-labeled secondary antibody (diluted 1:100; Molecular Probes, Eugene, OR) for 2 hours at room temperature. Then, the samples were mounted with antifade (Molecular Probes). These samples were evaluated by using confocal laser microscopy (Bio-Rad, Hercules, CA) with adequate filters.

The expression of the receptors was also evaluated by immunoblots both in whole cells and after subcellular fractionation to separate cholangiocyte basolateral and apical membranes. Basolateral and apical fractions were obtained as previously described.^{29,30}

Experimental Design

In vivo studies. Male Fischer 344 rats (150–175 g), purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA), were kept in a temperature-controlled environment (20°C–22°C) with a 12-hour light/dark cycle and with free access to drinking water and standard rat chow.

To study the effect of serotonin receptor agonist administration on cholangiocyte proliferation and functional activity, our studies were performed in (1) normal rats and rats with BDL^{7,9} (for cholangiocyte purification or liver sections) or bile duct incannulation (BDI; for bile collection) for 1 week⁹ and (2) normal, BDL, or BDI rats that, immediately after BDL or BDI, were treated by intraperitoneal (IP) implanted Alzet (Cupertino, CA) osmotic minipumps with saline, 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)-tertralin (DPAT) (a serotonin 1A receptor agonist^{19,23}; 1 nmol · kg⁻¹ · h⁻¹), anpirtoline (a serotonin 1B receptor agonist³¹; 1 nmol · kg⁻¹ · h⁻¹), or 8-hydroxy-DPAT and anpirtoline together for 1 week. 8-Hydroxy-DPAT and anpirtoline are known to have a very high affinity for their receptors: endogenous ligands do not rep-

resent an obstacle for their binding to the receptors.³² To study the effect of the blockage of endogenous serotonin on cholangiocyte proliferation, normal or BDL rats were treated by IP injections with a serotonin-neutralizing antibody (12 µg/d; Biomed, Foster City, CA) or nonimmune serum for 1 week.

The animals were fasted overnight before each experiment. Before each procedure, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, IP). Study protocols were performed in compliance with institutional guidelines.

In vitro studies. To show that the effects of the serotonin receptor agonists on cholangiocyte proliferation are due to a specific interaction with serotonin receptors on cholangiocytes, pure cholangiocytes from 1-week BDL rats were incubated at 37°C with (1) 0.2% bovine serum albumin (BSA; control) for 5 hours; (2) 0.2% BSA for 1 hour followed by 8-hydroxy-DPAT (a serotonin 1A receptor agonist; 10 µmol/L)^{22,23,25,33} for 4 hours with 0.2% BSA; (3) (S)-WAY 100135 dihydrochloride (a serotonin 1A receptor antagonist; 10 µmol/L)^{22,23} for 1 hour followed by 8-hydroxy-DPAT for 4 hours with 0.2% BSA; (4) 0.2% BSA for 1 hour followed by anpirtoline (a serotonin 1B receptor agonist; 10 µmol/L)^{22,31} for 4 hours with 0.2% BSA; (5) SB 216641 hydrochloride (a serotonin 1B receptor antagonist; 10 µmol/L)^{22,34} for 1 hour followed by anpirtoline for 4 hours with 0.2% BSA; or (6) 0.2% BSA for 1 hour followed by 8-hydroxy-DPAT and anpirtoline together for 4 hours with 0.2% BSA.

To show that the effects of the serotonin 1A and 1B receptor agonists on cholangiocyte proliferation are mediated by the cAMP/protein kinase A (PKA)/Src pathway cells from 1-week BDL rats were also incubated with (1) dybutyryl-cAMP (cAMP agonist; 500 µmol/L)³⁵ for 30 minutes followed by 8-hydroxy-DPAT or anpirtoline for 4 hours; (2) PP2 (a Src inhibitor; 1 µmol/L)¹³ for 30 minutes followed by dybutyryl-cAMP for 30 minutes followed afterward by 8-hydroxy-DPAT or anpirtoline for 4 hours; (3) dybutyryl-cAMP for 30 minutes followed by 0.2% BSA for 4 hours (control); (4) PP2 for 30 minutes followed by 0.2% BSA for 4 hours (control); or (5) PP2 for 30 minutes followed by dybutyryl-cAMP for 30 minutes and subsequently followed by 0.2% BSA for 4 hours (control).

To show that the effects of the serotonin 1A and 1B receptor agonists on cholangiocyte proliferation are mediated by the Ca²⁺/Ca²⁺-dependent protein kinase C (PKC) pathway, we also incubated cells with (1) bis-(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetra-acetic acid/AM (BAPTA/AM) (an intracellular Ca²⁺ chelator; 5 µmol/L)¹⁶ for 30 minutes followed by 8-hydroxy-DPAT or anpirtoline for 4 hours; (2) G06976 (a Ca²⁺-dependent PKC inhibitor; 1 µmol/L)³⁵ for 30 minutes followed by 8-hydroxy-DPAT or anpirtoline for 4 hours; or (3) BAPTA/AM or G06976 for 30 minutes followed by 0.2% BSA for 4 hours (control).

To confirm that the blockage of mitogen-activated protein kinase signals modifies cholangiocyte proliferation,¹³ BDL cholangiocytes were also incubated in the presence of PD98059 (a mitogen-activated protein kinase-kinase [MEK] inhibitor; 50 µmol/L)³⁶ for 30 minutes, followed by 0.2% BSA for 4 hours.

To show that cholangiocytes secrete serotonin and to study the effect of the blockage of cholangiocyte-secreted serotonin on cell proliferation, after purification from normal or BDL rats, cholangiocytes were incubated in the absence or presence of 6.4 µg/mL of the serotonin-neutralizing antibody (Biomed) for 12 hours.

Isolation of Pure Cholangiocytes

Pure^{7,37} cholangiocytes were isolated from the selected group of animals by using a monoclonal antibody (immunoglobulin M, provided by Dr. R. Faris, Brown University, Providence, RI) against an unidentified membrane antigen expressed by all rat intrahepatic cholangiocytes.³⁷ At the end of each procedure, the purity of the cholangiocytes was evaluated by histochemistry for γ-GT,³⁸ a specific marker for cholangiocytes.⁹ Cell viability (>97%) was determined by trypan blue exclusion.

Evaluation of Cholangiocyte Proliferation

In vivo studies. Cholangiocyte proliferation was evaluated by quantitative immunohistochemistry for PCNA³⁹ and cytokeratin-19 (CK-19), a specific marker of cholangiocytes³⁹ in liver sections,³⁹ by quantitative histochemistry for γ-GT³⁸ from the selected group of animals and by immunoblots for PCNA in isolated cholangiocytes.¹⁰

After staining for PCNA and CK-19, sections were counterstained with hematoxylin and examined with a microscope (Olympus BX 40; Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Data were expressed as the number of PCNA-positive or CK-19-positive cholangiocytes per 100 cholangiocytes counted in 7 different fields. Histochemistry for γ-GT was performed in frozen liver sections as previously shown by us and others.^{5,38} Stainings were then examined with a microscope, and photographs of 7 different fields per group (selected in a blinded, random fashion) were taken. By computerized analysis, we calculated the volume percentage of liver occupied by ducts from the total number of points over hepatic tissue and the number of points over γ-GT-positive ducts, as previously reported.⁵ Immunoblots for the evaluation of the PCNA protein expression were performed as previously described^{10,39} in pure cholangiocytes from the selected group of animals. The comparability of the protein used was determined by immunoblots for β-actin.⁶ The intensity of the bands was determined by scanning video densitometry by using the Chemi-Imager 4000 low-light imaging system (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA).

In vitro studies. Proliferation in the selected experimental condition was assayed by immunoblots for the evaluation of PCNA protein expression,^{10,39} as described previously.

Evaluation of Cholangiocyte Functional Activity

In vivo studies. Cholangiocyte functional activity was evaluated by measuring (1) the basal and secretin-stimulated bile and bicarbonate secretion in BDL rats and (2) basal

and secretin-stimulated cAMP levels in pure cholangiocytes from the selected group of animals.

After anesthesia, animals were surgically prepared for bile collection as described previously.⁹ When steady spontaneous bile flow was reached (60–70 minutes from the infusion of Krebs–Ringer–Henseleit), the animal was infused for 30 minutes with secretin (100 nmol/L) followed by a final infusion of Krebs–Ringer–Henseleit for 30 minutes. Bile was collected every 10 minutes, put in preweighed tubes, and immediately stored at -70°C . Bicarbonate concentration (measured as total CO_2) was determined by a Natelson microgasometer apparatus (Scientific Industries, Bohemia, NY).

Intracellular cAMP levels were measured by RIA in pure isolated cholangiocytes from the selected group of animals.^{7,10,39} After incubation at 37°C for 1 hour,^{5,10} cells (1×10^5) were incubated at room temperature^{7,10,39} with 0.2% BSA (basal) or 100 nmol/L secretin with 0.2% BSA. Intracellular cAMP levels were determined by commercially available RIA kits (Amersham Corp.) according to the vendor's instructions.

In vitro studies. After incubation with the selected agonist/antagonist, intracellular cholangiocyte cAMP levels were measured by RIA as described previously.

Measurement of Protein Kinase A Activity

PKA activity was evaluated by using the PepTag Assay Protein Kinase Kit (Promega, Madison, WI), according to the instructions of the manufacturer, as previously described.¹⁶ After isolation (for the *in vivo* study) or incubation (for the *in vitro* study), cells were resuspended in 1 mL of lysis buffer (20 mmol/L Tris-HCl [pH 7.4], 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid [pH 8.0], 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, and 10 ng/mL aprotinin) and then sonicated 3×30 seconds with a sonic membrane disrupter. Samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes, and the supernatant was retained. The samples were then processed according to the instructions supplied by the vendor. Phosphorylated and nonphosphorylated peptide bands were visualized on a 0.8% agarose gel. The intensity of the bands was determined by scanning video densitometry with the Chemi-Imager 4000 low-light imaging system.

Evaluation of Src and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Phosphorylation and Serotonin Protein Expression

Pure cholangiocytes were resuspended in lysis buffer (20 mmol/L Tris-HCl [pH 7.4], 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid, 1% NP-40, 1 mmol/L aprotinin, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mmol/L leupeptin) and sonicated 3 times (10-second bursts). Proteins (50 μg per lane) were resolved by sodium dodecyl sulfate/7.5% polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred onto a nitrocellulose membrane. After blocking, the membrane was incubated overnight at 4°C with rabbit anti-phospho-Src-Tyr 139, rabbit anti-phospho-Src-Tyr 530, mouse anti-Src, mouse anti-phospho-extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, goat anti-ERK1 or goat anti-ERK2, or mouse anti-serotonin

(Biomedica), followed by incubation with the corresponding secondary antibody. Rat brain and 0.2% BSA were used as positive and negative controls, respectively. After several washes, proteins were visualized with chemiluminescence (ECL Plus kit; Amersham). The intensity of the bands was determined by scanning video densitometry with the Chemi-Imager 4000 low-light imaging system. Serotonin expression in cholangiocytes was also evaluated by immunohistochemistry in formalin-fixed and paraffin-embedded liver sections by using the mouse anti-serotonin (Biomedica) primary antibody.

Measurement of IP_3 Levels

After purification, intracellular IP_3 levels were measured from cholangiocytes (5×10^6) by the IP_3 [^3H] assay system according to the instructions supplied by the vendor (Amersham Corp.).^{16,30}

Measurement of Cholangiocyte Serotonin Secretion

Serotonin secretion was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA), according to the instructions of the vendor. Briefly, 50 μL of standard control serum or sample was placed into the appropriate well. Immediately afterward, 50 μL of serotonin biotin and serotonin antiserum were added before the plate was carefully shaken and incubated overnight at 4°C . After 3 washes, 150 μL of the enzyme conjugate was added to each well, followed by a 2-hour incubation. Finally, 200 μL of p-nitrophenyl phosphate substrate solution was added. The plate was again incubated for 1 hour at room temperature with shaking, and then it was read at 405 nm with the Multiskan Ascent plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland).

Statistical Analysis

All data are expressed as mean \pm SE. For the *in vitro* experiments, data are expressed as percentage of basal value. The differences between groups were analyzed by Student *t* test when 2 groups were analyzed or by analysis of variance if more than 2 were analyzed.

Results

Cholangiocytes Express the Serotonin 1A and 1B Receptors

Both immunohistochemistry and immunofluorescence of liver sections show a positive staining in cholangiocytes with higher intensity in the basolateral domain for both the serotonin 1A and the serotonin 1B receptor subtypes (Figure 1A). This observation was also confirmed by immunoblots that showed that both the serotonin 1A and the serotonin 1B receptor subtypes are localized mostly in the basolateral domain of cholangiocyte membranes (Figure 1B, left). Furthermore, immunoblots showed that the receptor expression is up-regu-

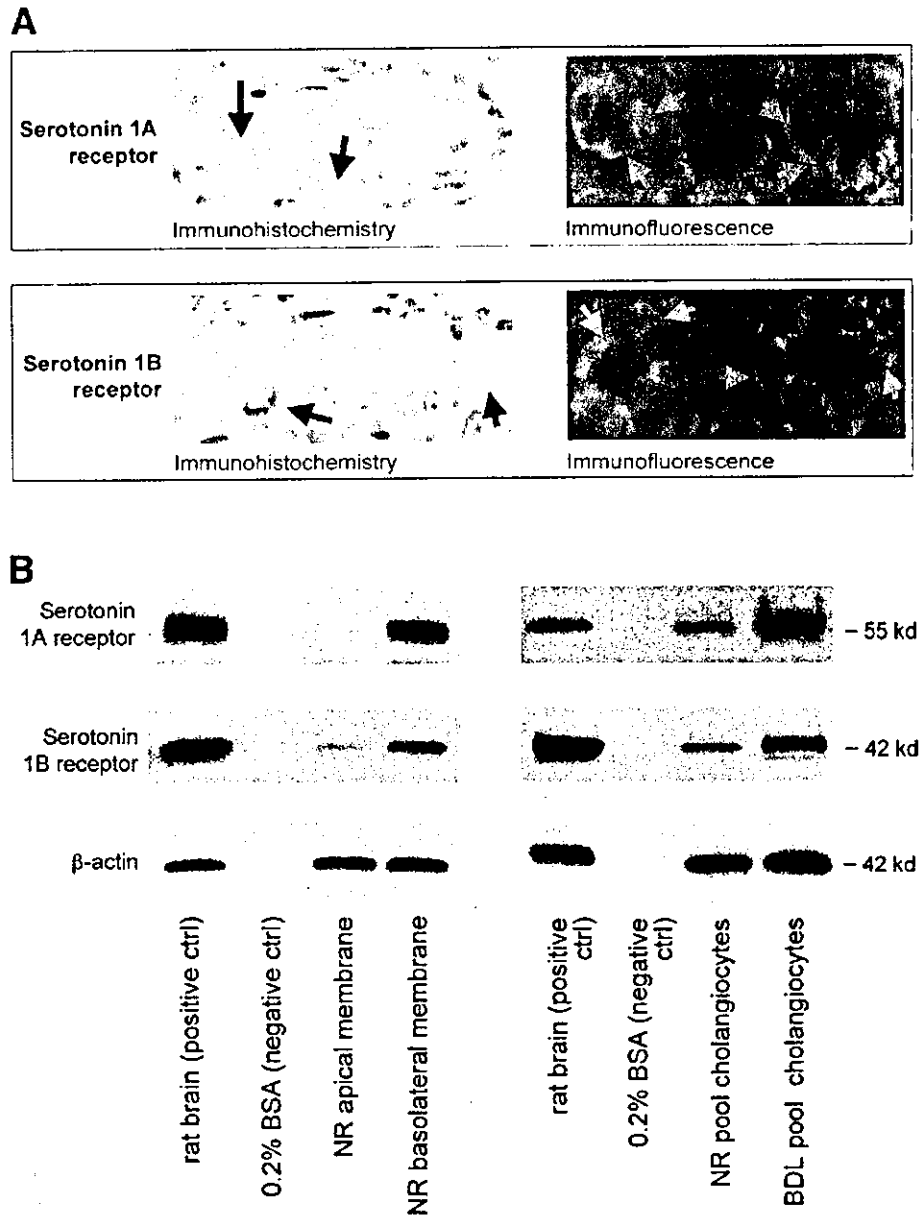


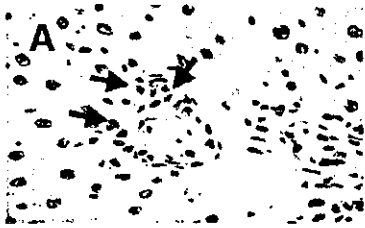
Figure 1. Expression of the serotonin 1A and 1B receptor subtypes (arrows) in cholangiocytes evaluated by immunohistochemistry (left) and immunofluorescence (right) in normal rat liver sections (A) (original magnification, 625 \times) and immunoblots in normal rat pure cholangiocytes (B, left). Normal cholangiocytes express both the 1A and 1B receptor subtypes, localized mostly at the basolateral side of the cell. Immunoblots in normal and BDL cholangiocyte whole-cell lysates show that these receptors are up-regulated in the course of cholestasis (B, right).

lated in the BDL rat, compared with normal (Figure 1B, right).

The Serotonin 1A and 1B Receptor Agonists Inhibit Cholangiocyte Proliferation in the Course of Chronic Cholestasis

After 1 week of administration to the BDL rat, both 8-hydroxy-DPAT (serotonin 1A receptor agonist) and anpirtoline (serotonin 1B receptor agonist) inhibited cholangiocyte proliferation. Specifically, a marked reduction of the number of PCNA- and CK-19-positive

cholangiocytes and of the bile duct mass was found in liver sections of rats treated with 8-hydroxy-DPAT or anpirtoline compared with BDL control rats (Figure 2A-C). The inhibitory effect of 8-hydroxy-DPAT and anpirtoline on cholangiocyte proliferation was also confirmed by the decreased PCNA protein expression in cholangiocytes isolated from BDL rats treated with both serotonin receptor agonists compared with cholangiocytes purified from BDL control rats (Figure 2D). No changes in cholangiocyte proliferation were observed in



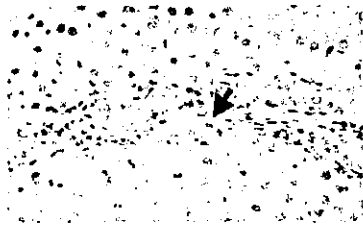
BDL + saline 1 week



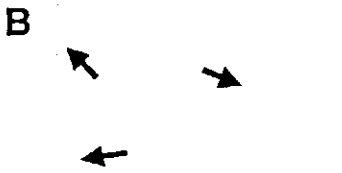
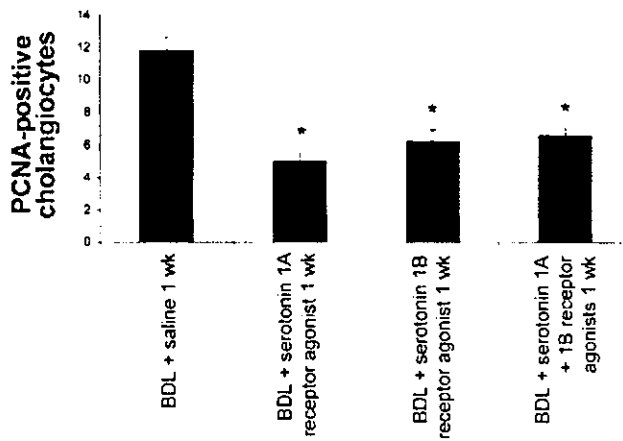
BDL + serotonin 1A receptor agonist 1 week



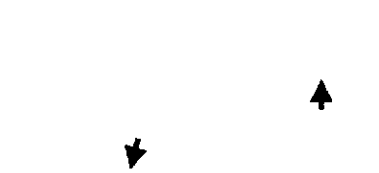
BDL + serotonin 1B receptor agonist 1 week



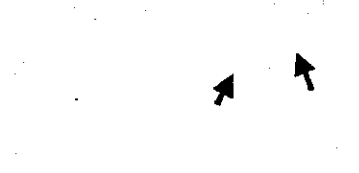
BDL + serotonin 1A + 1B receptor agonists 1 week



BDL + saline 1 week



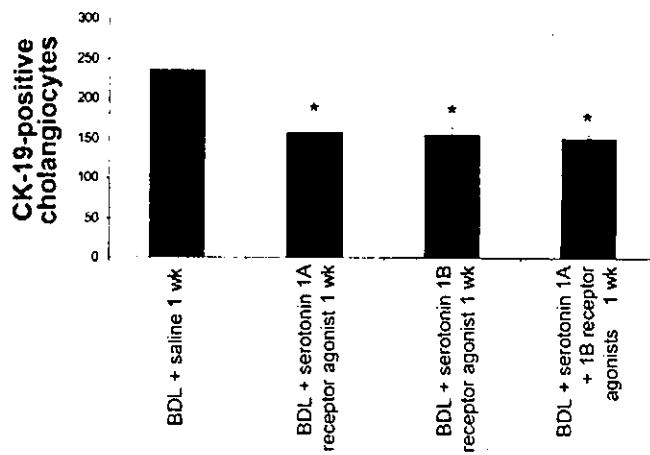
BDL + serotonin 1A receptor agonist 1 week



BDL + serotonin 1B receptor agonist 1 week



BDL + serotonin 1A + 1B receptor agonists 1 week



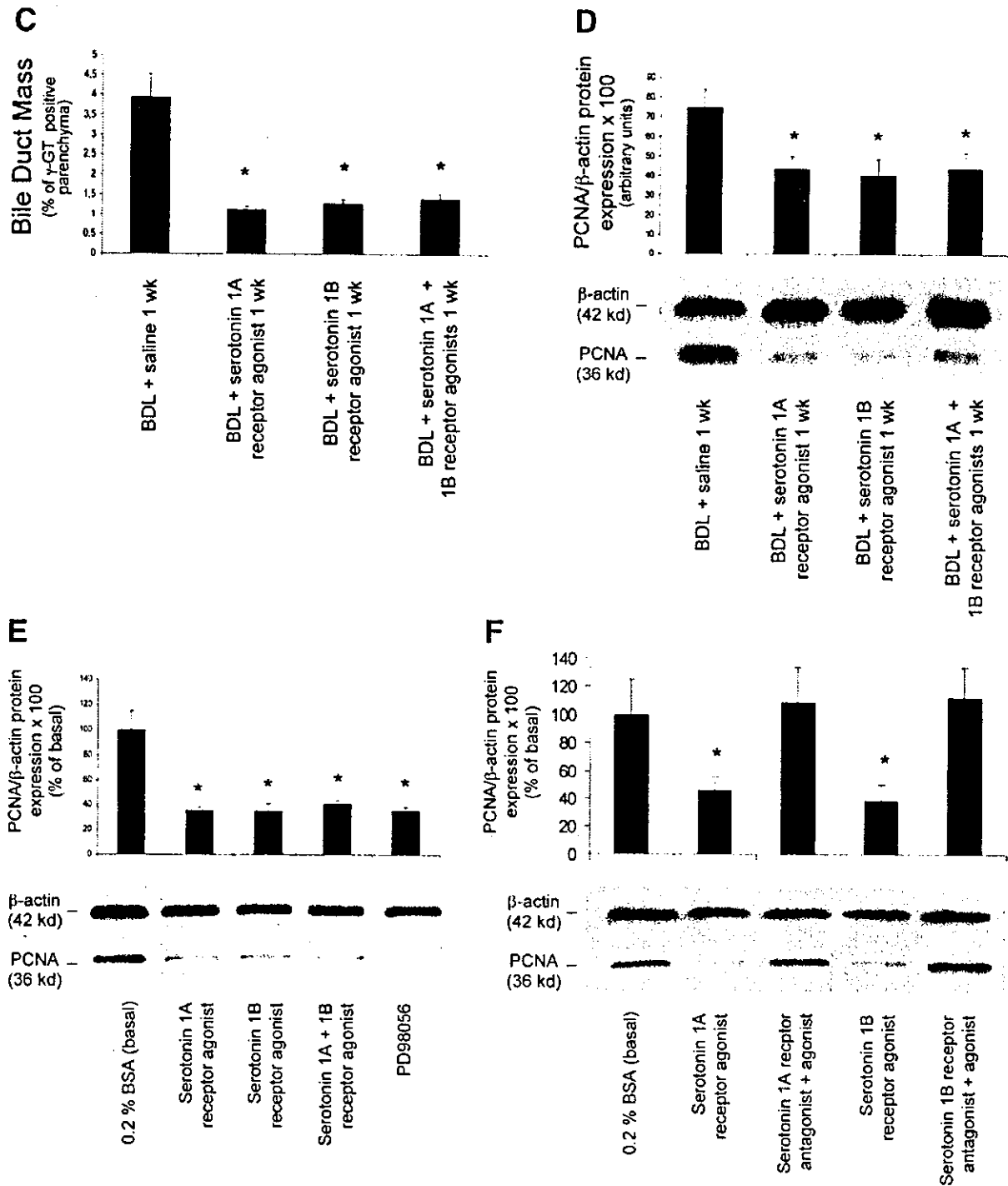


Figure 2. Effect of the serotonin 1A and 1B receptor agonists on cholangiocyte proliferation. Quantitative immunohistochemistry for PCNA (A) and for CK-19 (B) shows that, in vivo, chronic administration of the serotonin 1A and 1B receptor agonists to the BDL rat inhibits cholangiocyte proliferation (arrows indicate positively stained cells; $*P < .01$ vs. BDL; data are mean \pm SE of 3 experiments (original magnification, 1000 \times). Such results are confirmed by measurement of the bile duct mass (C) ($*P < .01$ vs. BDL; data are mean \pm SE of 3 experiments). Immunoblots were similar for the PCNA protein in pure cholangiocyte lysates (D) ($*P < .01$ vs. BDL; data are mean \pm SE of 3 experiments). Such effects are dependent on the specific agonist/receptor interaction in cholangiocytes, because in vitro the inhibitory effect of the serotonin 1A and 1B agonists is abolished by preincubation with the corresponding receptor antagonist (F) ($*P < .05$ vs. the other groups; data are mean \pm SE of at least 3 experiments). In the same fashion as in vivo, the simultaneous in vitro administration of both receptor agonists did not have an additive effect; PD98059, the MEK inhibitor, inhibits the PCNA protein expression to an extent similar to the serotonin 1A and 1B receptors (E) ($*P < .05$ vs. basal; data are mean \pm SE of at least 3 experiments).