

4. 免疫機構とその制御および制御法の開発 12) 肝類洞の抗原提示細胞の機能について (若月芳雄)

経口から投与された蛋白性抗原が抗原活性を失わずに肝臓に到達し、肝臓で抗原特異的な CD4 T 細胞を活性化すること、活性化に伴い、肝臓では FasL/Fas 二重陽性が出現し、不完全なアポトーシスが起り、抗原非特異的に肝炎を抑制する調節性肝 CD4 T 細胞が誘導されることが判明した。

13) PBC における Toll-like receptor を介した単核球活性化の検討 (市田隆文)

①PBC 症例では刺激前の CD3⁺CD56⁺NKT および CD56⁺NK 細胞における CD69、TRAIL の発現が有意に高く (p<0.01, p<0.05)、また活性化 NF- κ B p65 が高値を示し、活性化状態にあると考えられた。②aPBC 症例では PGN、LPS 刺激により TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 産生が健常人に比べて有意に高値であり、PBC の病態初期には TLR を介した自然免疫系の活性化が関与している可能性が示唆された。③sPBC 症例では刺激後も NF- κ B p65 が増加せず、サイトカイン産生もわずかで、エンドトキシントレランスに近い状態にあると考えられ、aPBC 症例とは明らかな反応性の違いが示唆された。

14) 胆管上皮細胞の免疫制御機構の解析 (下田慎治)

胆管上皮細胞に抗原提示細胞としての機能は認められなかった。そればかりではなく、末梢単核球を抗原提示細胞とした場合にも、胆管上皮細胞がその系に同時に存在した場合、通常増殖する T 細胞の増殖が抑制された。T 細胞の増殖が抑制される機序として、胆管上皮細胞が直接抗原提示細胞や T 細胞と接触することによる抑制以外に、液性因子が関与しており、この液性の抑制因子は主に、胆管上皮細胞が産生するプロスタグランジン E2 (PG-E2) であった。また胆管上皮細胞が産生する PG-E2 は、抗原提示細胞や T 細胞が産生する IL-1 β や TNF α などによって制御されていることも明らかとなった。

15) CD8 T 細胞による免疫制御機構の解析 (喜多宏人)

AMA 陽性 PBC と同様に、AMA 陰性 PBC 患者末梢血中にも CD8 陽性自己反応性 T 細胞が存在しており、AMA 陰性 PBC においても、T 細胞レベルでの自己抗原に対する異常反応が病態に関与している可能性が示唆された。AMA 陰性 PBC と AMA 陽性 PBC は自己反応性 T 細胞の活性化という点で共通しており、これらの自己反

応性 T 細胞の制御が病態進展を抑制する治療法につながる可能性が示された。

16) Th1/Th2 バランス制御法の開発 (松下 祥)

異なる iNKT 細胞サブセットが、DC 機能の変化に及ぼす影響を比較検討し、iNKT 細胞サブセットのバランスが末梢における Th1/Th2 応答バランスを制御する重要な要因となり得ることが明らかになった。

5. 治療薬の評価および治療効果の評価法

17) ヒト培養胆管細胞および自己免疫疾患自然発症モデル MRL/lpr マウスにおける PPAR γ リガンドによる抗炎症効果の検討 (原田憲一)

①内因性リガンドである 15d-PGJ2 はチアゾリジン誘導体に比べ細胞毒性が低く、また LPS 誘導性 NF- κ B 活性の抑制も示した。さらに PPAR γ アンタゴニストを用いた検討にて、胆管細胞に対する 15d-PGJ2 の抑制効果は、PPAR γ 依存性のみならず非依存性の系も存在することが明らかとなり、15d-PGJ2 は PPAR γ 発現が低下した PBC 胆管にも抗炎症効果を示しうることが期待された。

②MRL/lpr マウスを用いた実験で、15d-PGJ2 腹腔内投与群では、唾液腺炎、間質性肺炎、膵炎の軽減が見られた。しかし、胆管炎に関しては発生頻度及び炎症の程度に個体差が大きく、15d-PGJ2 の有効性を確認するためには更なる検討を必要とする。

18) 肝臓における脂肪酸の β 酸化能の生体内測定法の開発 (西原利治)

PBC における PPAR- α の活性化の程度を非侵襲的に評価する方法として、肝臓における脂肪酸の β 酸化能を *in vivo* で半定量化する分子イメージングシステムを開発した。

6. 治療法開発のための動物モデルの開発

19) PBC 動物モデルの開発とそれを用いた胆道障害機序の解析・治療法の開発 (松口徹也)

独自に開発した T 細胞特異的なドミナントネガティブ型 MKP-M トランスジェニックマウスは Th1 タイプに偏位した抗原特異的免疫反応を示し、PBC 治療の研究のためのマウスモデルとして有用な可能性があることが判明した。

7. 肝移植、HGF、再生医療による治療法開発

20) 生体肝移植を受けた PBC 症例の中期的状況 (兼松隆之)

PBC 症例に対する肝移植後、中期的には血清学的再発はあるものの肝機能は保持されている。組織学的には明らかな慢性非化膿性破壊性

胆管炎 (CNSDC) と拒絶の判定は困難であった。拒絶や自己免疫性肝炎様の肝障害はステロイドにて改善したが、継続投与が必要であり、肝移植後の組織学的再発防止と免疫抑制薬の関連性が示唆された。

21) 末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF の臨床応用 (坪内博仁)

組み換え型ヒト HGF の急性毒性試験では致死量 >40.0 mg/kg で、特に問題となる所見はみられなかった。反復投与毒性試験では、可逆性の蛋白尿が認められたが、尿中微量アルブミン測定でモニタリング可能であり、腎機能障害をきたす個体はみられなかった。また、肝硬変には組み換え型ヒト HGF の長期投与が必要と考えられるため HGF の徐放化を可能とする HGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを用いた薬効薬理試験を行った。一方、増殖因子である HGF の発癌性を検討するために、肝硬変を背景に肝発癌が誘導されるコリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラットに組み換え型ヒト HGF を反復投与したが、HGF は肝癌および肝前癌病変の発生を促進しなかった。

22) ヒト幹細胞を用いた肝再生 (石川文彦)

ヒト臍帯血および骨髄細胞から CD34+細胞を純化した後に移植した結果、肝細胞、消化管上皮細胞が再生することが示された。この再生のメカニズムが、細胞融合と分化の両者が含まれ、その比率は組織によって異なることを示した。

また、common gamma 鎖の complete null 変異を NOD-scid にバッククロスさせた新規免疫不全マウスでは、獲得免疫系の不全状態 (T-B-) だけではなく、NK 細胞、樹状細胞を含めた自然免疫系の不全状態を実現することが確認された。このマウスに異種となるヒト造血幹細胞を移植したところ、これまでのマウスと比較して有意に高率な造血・免疫細胞の再構築が認められ、今後のヒト幹細胞研究に有用であることが示された。

D. 考察

PBC の治療に際しては、UDCA が第一選択薬として多くの症例に使用され、副作用もなく良好な治療成績が得られている。しかし、専門医が現場での治療に際して、治療開始時期、UDCA の投与開始量、UDCA で治療効果不良の場合の対策などにどのように対処しているか、実態が明らかでなかった。調査研究の結果、治療に関して明確な指針はないため、具体的な対応については治療者個々人の考えに基づ

いて治療を行っていることが確認された、エビデンスに基づいた治療指針の策定が必要であることが確認された。

AIH では初期の肝生検所見から長期予後を予測することは困難である。肝線維化を進展させる因子としては、初期治療において完全寛解が得られないこと、PSL 治療を中止すること、頻回の肝炎再燃があることがあげられた。経過中に再度の肝生検を施行し、肝組織所見改善の程度が不十分であれば PSL 投与量などを再考し、再燃回数を減らすことで、肝線維化の進展を遅らせ、改善をもたらすことが可能であると考えられた。

PBC の多くの症例は安定した経過をたどるものの、一部の症例は進行し予後不良の経過をたどることがわかっている。しかし、現状では経過や予後を予測することは困難であり、両者を区別することなく治療を行っている。今回、予後予測マーカーとして抗 gp210 抗体が極めて有用であることを明らかにすることができた。今後は、抗 gp210 抗体を血清マーカーとして、予後不良が予測される症例を対象とした新しい治療研究が可能になるものと思われる。一方、肝不全に至った症例のうち約 20%には抗 gp210 抗体が陰性の症例があることから、これらの症例に対しては、新たな予後予測マーカーを同定する必要がある。

IgA クラス抗 M2 抗体の PBC の進展予測因子としての有用に関しては、今回の検討では明らかにすることはできなかったが、IgA クラス抗体は IgG クラス抗 M2 抗体に比べ変動する症例が多く、組織がより進行した症例に陽性率が高い傾向にあったことを考慮に入れると、反復測定により PBC の進展を経時的にモニターできる可能性があると考えられた。

PBC に対する究極的治療法は生体肝移植であり、PBC の病態解明や治療法の開発のためには、これら PBC 進行症例の病理学的解析は極めて重要である。今回の移植肝の検討により、PBC の進展メカニズムの解明のためには移植症例における詳細な経過観察とともに、摘出肝を用いた病理学的解析が大切であることが明らかとなった。

PBC の発現遺伝子プロファイルは自己免疫性肝炎と異なること、病期の進行とともにプロファイルが異なることをこれまでの肝組織を用いた解析で明らかにした。今回、比較的早期の病期における細胞毎の遺伝子発現に注目し、発現遺伝子プロファイルを解析した結果、interferon- γ , 7, 11 などの発現が亢進

し、Stage IIIでは低下していることを明らかにした。こうした初期における遺伝子発現がPBCの成立に重要な役割を演じているものと予想される。

Fibrateの受容体であるPPAR α の発現は、進行したPBC症例で蛋白レベルおよびmRNAレベルの両方で亢進していたがPPAR α の核内発現は伴っていなかった。Bezafibrateは進行したPBC症例で抗炎症作用、線維化抑制、肝細胞再生などの効果を期待できることを示す病理形態学的な結果が得られた。画期的な治療法の一つとして、新たなPPAR α リガンドの開発が期待される。

β -cateninは肝内のbipotential cellから胆管上皮細胞への分化に関与している可能性が報告されており、PBCの早期例では細胆管の増生が旺盛に観察されることを考え合わせると、PBCで β -cateninが細胆管の増生に関与している可能性が示唆され、将来的に β -cateninを通じた胆管再生というPBCの画期的治療法の開発への萌芽となりうる可能性が示唆された。培養胆管上皮細胞を用いたin vitroの系により、Wnt/ β -cateninシグナル伝達経路の胆管上皮細胞分化における役割を、より詳細に検討することが望まれる。

成熟胆管細胞の分化形質・機能は様々な肝転写因子群(HNF1 α , β , HNF3, HNF4, HNF6, CEBP α , β , FXR, 等)の発現, 相互作用, 機能調節で制御, 維持されている。またこれらの制御における各種増殖因子, サイトカインの関与も報告されている。分離ヒト胆管細胞を用いて、胆管細胞/肝細胞障害(胆汁うっ滞を中心に)、増殖時における上記転写因子群, 増殖因子の発現・活性化変化の特異性を解析し、PBCでの慢性肝障害/肝再生病態を、分化・発生学的な分子レベルで評価することは、胆管上皮細胞の再生医療の基礎的検討として有用であると考えられる。

PBCにおける胆管障害の特徴として、肝内胆管のうち小葉間胆管サイズの細胞が選択的に破壊されることがあげられるが、その選択性についての詳細は不明である。肝内胆管細胞には多様性が存在することが知られており、この点についての理解を深めることがPBCの治療に不可欠である。小葉間胆管は再生に乏しい細胞と考えられているが、人為的にEphの発現を調整することにより、胆管再生のために新規の治療法の標的分子としての可能性が提唱された。今後は、siRNAを使用して、その検討を行うとともに、今回確立した手法を用いて、さらに新

規のユニークな蛋白の同定とその解析を行う必要がある。

PBCと関節リウマチの合併を検討した今回の成績では、73名のPBC患者においてRF、抗CCP抗体共に陽性の患者は2名のみであり、抗CCP抗体の特異性、感度を考慮すると、PBC患者のRA合併率は必ずしも高くないことが示唆された。RA症例で血清MMP-3は上昇することが知られているが、PBC患者では有意にMMP-3が上昇しており、病期の進行と共にMMP-3が上昇する傾向がみられた。MMPは肝臓の線維化との関連が示唆されているが、血清MMP-3の上昇と肝炎、肝硬変との因果関係に関しては、まだ報告が少ない。PBCとMMP-3との関連についても報告は少ないが、MMP-3のプロモーター領域の遺伝子多型の解析において、原発性硬化性胆管炎(PSC)症例では、転写活性の高いSNPの頻度が、健常人に比べ高いことが報告されている。今後、PBCの肝組織におけるMMP-3の発現、他のMMPsの変化についての解析が必要と思われる。

昨年までの研究で、経門脈的に肝に流入する抗原により抗原特異的なCD4T細胞の選択と機能的な分化がおこること、選択分化刺激を受けたCD4T細胞の中から、FasL陽性、IL-4, TGF- β , IL-10を産生し免疫調節機能を有する細胞が出現することを明らかにしたが、この免疫調節性CD4T細胞は抗原非特異的にTh1型の免疫反応を抑制するため、PBCにおいても慢性炎症を阻止する細胞機序の一翼をになっている可能性があることが示唆された。

胆管上皮細胞は今までの上皮系細胞で指摘されていたことと同様に、細胞表面に抗原が提示された場合にでも、抗原提示細胞としては機能しないことが明らかになった。これに加えて、他の種類の末梢単核球をはじめとするプロフェッショナルな抗原提示細胞が存在した場合にでも、胆管上皮細胞がその近傍に存在した場合、PG-E2の産生を通じて、積極的に細胞免疫を制御する機能があることが示唆された。したがって、自己免疫反応として、PBCでの胆管炎を考えた場合、一般的な胆管上皮細胞上に自己抗原が提示され、これを自己抗原反応性T細胞が認識するという関係からだけでは、持続する破壊性胆管の障害は説明しにくいものと考えられた。

自己抗原特異的T細胞やNKT細胞を制御することによりPBCの進行を制御することが可能であるかどうか、治療法の開発という観点からも興味あるところである。PBCの自己抗原

である AMA の主たる対応抗原であるピルビン酸脱水素酵素の E2 コンポーネント (PDC-E2) を特異的に認識する CD8 陽性自己反応性 T 細胞が PBC 患者の末梢血及び肝臓に存在するが、これらの CD8 陽性自己反応性 T 細胞がどのような機序により生体内で活性化を受け増殖しているのかは明らかでない。今回の検討で、抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC 患者末梢血中にも CD8 陽性自己反応性 T 細胞が存在していることが明らかにされ、抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC においても、自己抗原に対する T 細胞レベルでの異常反応が病態に関与している可能性が示唆された。

Th1/Th2 バランスは臓器特異的な自己免疫疾患の病態や治療を考える上で重要であり、樹状細胞 (DC) は Th1/Th2 分化に重要な影響を与える細胞の一つである。一方、種々の免疫疾患において、特定のインバリアント NKT (iNKT) サブセットの減少が認められ、これらの疾患の病因、病態に深く関与していることが示唆されている。しかし、ヒトにおいて iNKT サブセットが、DC を介して Th1/Th2 バランスを支配し、免疫応答性をいかにして制御しているのか、詳細な機序については明らかとされていない。今回の検討で、異なるヒト iNKT 細胞のサブセット (CD4/DN) は、DC を介してナイーブ CD4 T 細胞の異なる分化 (Th1/Th2) を誘導する。ヒト iNKT 細胞サブセットのバランス制御による、人為的 Th1/Th2 応答制御の可能性が示唆された。

PBC の障害胆管では抗炎症性分子 PPAR γ の発現低下がみられることから菌体成分に対する感受性の亢進が PBC 胆管炎の発生に加担していることが推察される。胆管細胞に対する内因性 PPAR γ リガンド 15d-PGJ2 の抗炎症作用が PPAR γ 依存性か非依存性かを検討すべく、PPAR γ アンタゴニスト (GW9662) で PPAR γ シグナル伝達を遮断することにより 15d-PGJ2 の抗炎症効果が解除されるかどうかを検討した結果、PPAR γ アンタゴニストの存在下では、15d-PGJ2 の抑制効果は約半分にまで解除された。すなわち、胆管細胞における 15d-PGJ2 の抑制効果は PPAR γ 依存性のみならず非依存性の系も存在することが明らかとなり、15d-PGJ2 は PPAR γ 発現が保持された胆管のみならず、PPAR γ 発現が低下した PBC 胆管にも抗炎症効果を示しうることが期待された。

PBC の治療には UDCA に加えて新たに bezafibrate が広く用いられて始めている。しかし、PPAR- α ligand である bezafibrate を用いた新規治療法の作用機序はいまだ明らか

になったとは言い難い。標識した長鎖脂肪酸アナログの使用により、*in vivo* の肝臓における脂肪酸の β 酸化能を判定量的に計測する方法を開発した。この方法は非侵襲的であるばかりではなく、再現性に優れ、治療による脂肪酸の β 酸化能の改善が検出できる感度を有していた。今後、PBC 症例における PPAR- α を介するシグナルの活性化の程度を明らかにする上で、この手法を用いた脂肪酸 β 酸化能の検討が望まれる。

TLR からのシグナルはその後の抗原特異的免疫反応を Th1 方向に誘導するため、PBC 発症における TLR シグナルの関与は検討に値する。また、PBC の研究が進みにくい理由の一つとして明確な動物モデルが存在しなかったことがあげられ、適切な PBC 病態モデルの開発が急務である。今回 MAP キナーゼ脱リン酸化酵素である MKP-M が Th1 分化を抑制することを細胞および個体レベルで示した。MKP-M のトランスジェニックおよび KO マウスは、前年度示した Cot/Tp12 KO マウスと同様に、PBC の治療法開発のための疾患モデルマウスとして有望と考えられる。

肝硬変を対象とした組み換え型ヒト HGF の投与は長期にわたることも考えられるため、長期投与に適したドラッグデリバリーシステム (DSS) の開発が望まれる。HGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを用いた薬効薬理試験を行った結果、組み換え型ヒト HGF を背部皮下から 2 週間徐放させると、肝重量や血清アルブミンなどの肝再生マーカーは有意に改善したが、肝線維化は改善するものの有意ではなかった。今後、投与部位や剤型などを検討する必要があると考えられた。また、これまで、臨床用量の HGF では発癌を促進する結果は得られていない。しかし、増殖因子である HGF による発癌性の可能性を完全に否定することは困難である。従って、組み換え型ヒト HGF 投与による発癌促進の可能性はあるというスタンスで、リスク・ベネフィットの観点から被験者の選択規準やプロトコル治療など、十二分に議論を重ねる必要があると考えられた。

ヒト組織中の CD34 陽性細胞移植で、確かに内胚葉系組織の再生が起こることから、再生能力を有する幹細胞の同定と、ヒト造血組織の将来的な応用の可能性が期待された。これまでのマウスでの研究を中心に展開してきた再生医学研究では直接臨床応用を開始することを疑問視する意見も多かったが、われわれのヒト細胞・組織を用いた研究成果は、従来

の再生医学研究の知見を確認するだけでなく、前臨床段階の有意義な知見と位置付けられる。

さらに、新規開発を行った免疫不全動物は、正常造血・免疫系の研究ばかりでなく、これまで細胞株でしか評価できないとされてきた非造血細胞の *in vivo* での動態を解析する上で有用であると考えられた。

D. 結論

1. 現状治療の実態の調査を通して、専門医による PBC 治療の実態を明らかにし、新治療法の開発および治療指針の策定が必要とされていることを確認した。

2. PBC 患者の予後予測、予後不良患者の判別に、抗 gp210 抗体が極めて有用で、治療方針の決定に重要な検査項目となるとともに、治療法開発のターゲットとなる可能性が得られた。

3. 治療標的分子の探索にていくつかの候補遺伝子を同定した。

4. 免疫機構とその制御および制御法の開発では、抗原の経口投与により肝臓で誘導される新規免疫調節性 T 細胞の同定と臨床応用の可能性、自己反応性 T 細胞の制御、ヒト iNKT 細胞サブセットのバランス制御による人為的

Th1/Th2 応答制御の可能性を明らかにした。

5. 治療薬の評価および治療効果の評価法では、内因性リガンドによる PPAR γ の制御の可能性を得るとともに、脂肪酸の β 酸化能を *in vivo* で半定量化する分子イメージングシステムを開発した。

6. 治療法開発のための動物モデル候補を 3 種類開発した。

7. 肝移植、HGF、再生医療による治療法開発では、末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF の臨床応用の可能性を得た。また、幹細胞を用いた再生医療の研究で、純化したヒト臍帯血、骨髄由来幹細胞から肝細胞が再生することを明らかにし、再生医療の可能性を掴んだ。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

別掲

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

特になし

II. 分担研究報告

原発性胆汁性肝硬変に対する治療方針の現状把握のための調査
-肝臓学会西部会評議員に対するアンケート調査のまとめ-

研究協力者 酒井 浩徳 国立病院機構九州医療センター・消化器科 医長

研究要旨： 原発性胆汁性肝硬変の多くの症例は安定した経過をたどるものの、一部の症例は進行し予後不良の経過をたどることがわかっている。しかし、現時点では経過や予後予測することは困難であり、両者を区別することなく治療を行っているのが現状である。治療に際しては、UDCA(ウルソデオキシコール酸)を第一選択薬として多くの症例に使用され、副作用もなく良好な治療成績が得られている。しかし、治療に関して明確な指針はなく、治療開始時期、UDCAの投与開始量、UDCAに対して治療効果不良の場合の対策など、治療者各人の考えに基づいて治療を行っているのが現状である。本研究は、原発性胆汁性肝硬変の治療に対する基本的方針(治療者各人の治療ガイドライン)の現状把握と検証を目的として、肝臓学会西部会評議員の方々のご協力を得て治療方針に関するアンケート調査を行った。原発性胆汁性肝硬変の診断初期よりUDCAを開始し、UDCAによる効果が不十分の場合ベザフィブラートの追加投与が現在最も採用されている治療方針であった。しかし、治療開始時期、治療開始時の選択薬やその投与量、第一選択薬が効果不十分の時の対応などに方針の違いがあることも明らかとなった。

<共同研究者>

国立病院機構 九州医療センター

西 秀博、矢田 雅佳、山下 晋作、日高 仁、
福泉 公仁隆、宮原 稔彦、武元 良祐、
杉山 元、有村 英一郎、井手 誠、井福 正貴

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変症(PBC)は自己免疫性肝炎とともに代表的自己免疫性肝疾患であり、その臨床像や病態はきわめて特徴的である。疾患概念が確立して50年以上経過した今日においても病因が解明されていないこともあり、根本的治療法は未だ確立されていない。PBCに関する知識が医師の間に浸透するにつれて診断される症例は年々増加してきているものの、ウイルス性肝疾患に比べて発生頻度は極めて低く、単一の施設では病因、自然経過の解明、さらには治療法の確立に十分な症例数の集積は困難である。従って、PBC研究の第一歩はきちんとした症例の集積にあると思われ、全国規模の調査が行われている。国立病院機構肝疾患政策医療ネットワークにおいても、構築したPBC症例のデータベースに登録した428症例に対し様々な調査を行ってきた。その結果、多くの症例は安定した経過をたどるものの、一部の症例は進行し予後不良の経過をたどることが明らかとなっ

た。治療に関しても、約80%の症例がUDCAの投与を受けており、副作用もなく良好な治療成績が得られている。しかし、治療の開始時期や開始時の投与量などに一定の方針はなく様々であるのが現状であった。

今回、本研究班に参加するに当たって我々に与えられたテーマは、PBCに対する現行治療法の把握と検証であった。PBCに対する大規模な全国調査がすでに継続して行われ、PBCに対する治療の実態に関しては明らかにされているため、治療実態の調査は必要ないと考えられた。従って本研究では、全国の肝臓専門医がPBCの患者を目の前にしたとき、どういう方針で治療を進めていこうと考えているか(肝臓専門医個人の治療ガイドライン)を把握することを目的に、アンケート調査(意識調査)を行うこととした。石橋大海厚生労働省研究班主任研究者および各務伸一日本肝臓学会西部会支部長のご承諾を得て、肝臓学会西部会評議員の方々にはアンケート調査をお願いしご協力いただいた。

B. 研究方法

肝臓学会西部会評議員(日常診療を行っておられる方を対象とし、病理学教室所属の方は対象から外させていただいた)357名を対象にアンケート調査を行った。アンケートは無記名方式郵送で行い、基本的には回答選択方式で行い、一部回答に関しては具体的内容に関して追加記述をお願いす

る方式とした。アンケートに要する時間は 10-15 分程度とし、負担を極力避ける事を目指した。

アンケート内容としては、①回答者自身に関する項目(年齢、経験年数、勤務状況など)、②診療 PBC 患者数の概数、③診断基準、④日常診療上、経過観察期間、検査項目、⑤各種状況における治療方針、⑥皮膚掻痒症に対する治療、などとした。

C. 研究結果

160 名の方より回答(回収率 44.8%)を得た。集計後に着信した回答に関しては後日さらに追加集計を行う予定である。160 名の平均年齢 49.6 歳、平均経験年数 24.2 年であった。アンケート対象が評議員であったためか 500 床以上の病院勤務者が有効回答のうち 53%(67/126)であり、肝臓専門外来 79 名、消化器専門外来 35 名といった勤務状況であった。診療 PBC 患者の概数は症候性 PBC 患者 545 名、無症候性 PBC 患者 1209 名、計 1754 名であった。症候性 PBC の割合が 31%と、我が国で報告されている症候性 PBC の割合よりも多いのは肝臓専門医をアンケート対象としているためであろう。一人あたりの平均診療 PBC 患者数は症候性 PBC 3.6 名、無症候性 PBC 8.0 名であり、これは 500 床以上の病院勤務医でも、100 床規模の病院勤務医、あるいは診療所勤務医においても大きな差はなく、これは肝臓専門医としての診療患者状況を反映しているものと思われるが、難治性疾患とされる PBC ではあるが、多くは長期安定した経過をたどる疾患であり、特に大きな病院や大学病院に集中しているわけではないことが示されている。従って、PBC に対する調査を行う場合には大学病院や大きな病院のみを対象とせず、広く調査を行う必要があると思われる。日常診療において、PBC 患者の経過観察は、無症候性 PBC に対しては約 70%の回答者が 2-4 ヶ月に一回、20%の回答者は 1 ヶ月に一回であり、症候性 PBC に対しては 70%の回答者が 1 ヶ月に一回行っている。PBC の診断に関しては 149 名の回答者中 143 名が厚生労働省の診断基準に準じて診断しており、59.9%の回答者が肝生検は必ず行うと答えている。治療を行うに当たって治療開始の指針としては胆道系酵素が最も参考とされ、治療開始の基準としては正常値から正常値の 2 倍程度と回答者間で開きがあった。トランスアミナーゼを参考とする場合は正常値を超えた時から 150 程度までと同様に開きがあった。一方、自覚症状はほとんどの場合治療開始の指標とはされていない。大部分の回答者は治療の第一選択薬として UDCA を用いているが、開始の時期、開始投与量に対する考え方には違いが認められる。

無症候性 PBC であり、しかも γ -GTP が 100 以下と血液生化学的異常が軽度の場合(図 1)、37.2%の

回答者は無治療での経過観察を基本的に考えているが、60.1%の回答者は UDCA の投与を開始する方針である。そのうち 73.2%(全体の 44.0%)は 600mg 投与で開始する一方、26.8%(16.1%)の回答者は 300mg から投与開始すると答えている。中等度の血液生化学的異常の場合($100 \leq \gamma$ -GTP < 300、図 2)、72.1%の回答者が UDCA 600mg によって治療を開始すると回答している。しかし、無治療で経過観察も 5%あり、300mg で治療を開始する回答者も 10%認められる。一方、900-1200mg で治療開始する場合や、ベザフィブラート単独や最初から UDCA+ベザフィブラート併用で治療を開始するとの回答も認められる。血液生化学的異常が比較的高度の場合($300 \leq \gamma$ -GTP、図 3)も、基本的には中等度の場合と同様である。79.4%の回答者が UDCA 600mg で治療を開始するとしている。しかし、14 名(10%)の回答者は、最初からベザフィブラート併用を考えている。UDCA 900mg での治療を開始を考えている人もいる(5 名)一方、無治療で経過観察とする回答者も 3 名認められる。症候性 PBC に対する治療方針を図 4 に示す UDCA 600mg での治療開始が 79.7%など、基本的には血液生化学的異常が比較的高度の場合と大きな差は認めないが、UDCA 900mg 投与やベザフィブラート併用を選択する割合がやや多い傾向であった。UDCA 以外の治療薬の使用経験や効果の感触に関して、ベザフィブラートは 75%の回答者に使用経験があり、そのうち 73%が非常に有効ないし有効例が多い印象を持っている。ステロイド使用経験者は約 50%、15%は有効が多い、18%は無効が多いとの使用経験であった。コルヒチンや d-ペニシラミンに関しては 80%の回答者に使用経験がなく、また投与経験がある場合でも大部分が向こうが多い印象を持っている。フェノフィブラートに関しては使用経験者が 10%不足であり、投与効果の感触はベザフィブラートほどではないと思われる。UDCA 600mg 投与が無効の場合、セカンド・ラインとして選択するのは、ベザフィブラートの追加投与が多く、UDCA の増量を選択した回答者の倍であった。PBC の特徴的的症状であり、患者の QOL に大きく影響する皮膚掻痒症に対しては、確実な対処法はなく、対症的に内服治療を選ぶとの回答が 102 名(66%)、外用治療(27%)であり、何もしないという回答も 10 名からあった。進行した PBC に対する最良の治療は肝移植であるが、これまでに肝移植症例を経験した人は回答者の 28.7%に達している。Mayo Clinic の予後予測を参考に総ビリルビンが 5-10 以上に上昇したときに肝移植を考えると回答が多い。

D. 考察

昨年度の本研究班において我々も示したように、多くの PBC 症例は安定した経過をたどることが明

らかにされてきた。肝機能検査値も長期に渡って同じレベルを保ち、長期間にわたって無症候性 PBC の状態で経過すると考えられる。一方、一部の症例は診断早期から、あるいは長期間安定に経過したのちに症候性 PBC となり、さらに比較的急速に進行し、肝不全のために死亡したり、肝移植を必要とする結果となっている。このような経過をたどる PBC に対し、すべての症例を同等に治療する必要があるか、また、いかに治療するかについてはまだ問題が残されているところである。全国規模の実態調査でも明らかなように、UDCA が標準的治療薬であり、第一選択薬である。国立病院機構肝疾患政策医療ネットワークにおける PBC 症例のデータベースにおいても、登録した 428 症例の約 80.4% が UDCA の投与を受け良好な治療成績が得られている。しかし、投与症例の 24.3% が不変であり、悪化症例(6.5%)や死亡症例(0.8%)があるのも事実である。PBC に対する UDCA 療法のランダム化対照試験は我々が調べた限り 1999 年までに 11 編報告があり、肝機能検査においては明らかな改善が示されている。しかし、経過が長い疾患であるため、長期予後効果に関しては一定の見解が出ていない。UDCA により肝機能が改善しない症例があり、第二選択薬としてこれまでに多くの薬剤に対し臨床試験が行われてきた。その中で有効性、副作用などを考慮し、ベザフィブラートが現在最も使用されている。

現在 PBC の治療に関して、UDCA を第一選択薬として開始し、効果不十分の場合ベザフィブラートの併用療法に移行するか、状況によっては UDCA の投与量を増加するという基本的方針に関しては異論のないところである。しかし、今回のアンケート調査でも明らかなように、多くの症例が長期間進行することなく安定した経過をたどることが明らかである PBC に対し、どの時点から治療を開始するのか、UDCA はどの量から投与を開始するのかなどの関しては一定の見解がないのが現状である。UDCA による治療効果が不十分となった時、UDCA の増量をまず行うのか、ベザフィブラートの追加投与がいいのか、これに関しても現場の主治医の判断で決定されているのが今回のアンケート調査でも明らかである。

今後の画期的治療法の確立まで、肝移植以外に根治的治療法(移植後の PBC 再発に関しても異論があるところである)がない現時点では、これまでの行ってきた UDCA、ベザフィブラートによる治療を有効かつ効率的に行わなければならない。しかし、実際の臨床の場での具体的な治療方針に関しては、まだ確立されてはいないことが今回のアンケート調査により示された。PBC はウイルス性肝疾患と比較すると発生頻度は極めて少ない疾患であり、し

かも多くの症例は極めて安定した経過をたどるため、予後をはじめとして長期の治療効果を明らかにするためには長期にわたって経過を追っていく必要がある。そのため、単一の施設における症例数では不十分であり、ネットワークを用いたデータベースの構築と長期にわたる追跡が不可欠である。

E. 結論

今回 PBC に対する現行治療法の把握を目的に、日常肝疾患診療に従事している肝臓学会西部会評議員を対象に PBC に対する基本的治療方針に関するアンケート調査を行った。UDCA・ベザフィブラートを用いる治療の基本方針は確立していると思われるが、より具体的治療方針に関しては確立したものがなくさらなる検討が必要である。

E. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

図1. 無症候性PBC(γ -GTP<100)

(Nはアンケート回答者の割合、無回答 2.7%)

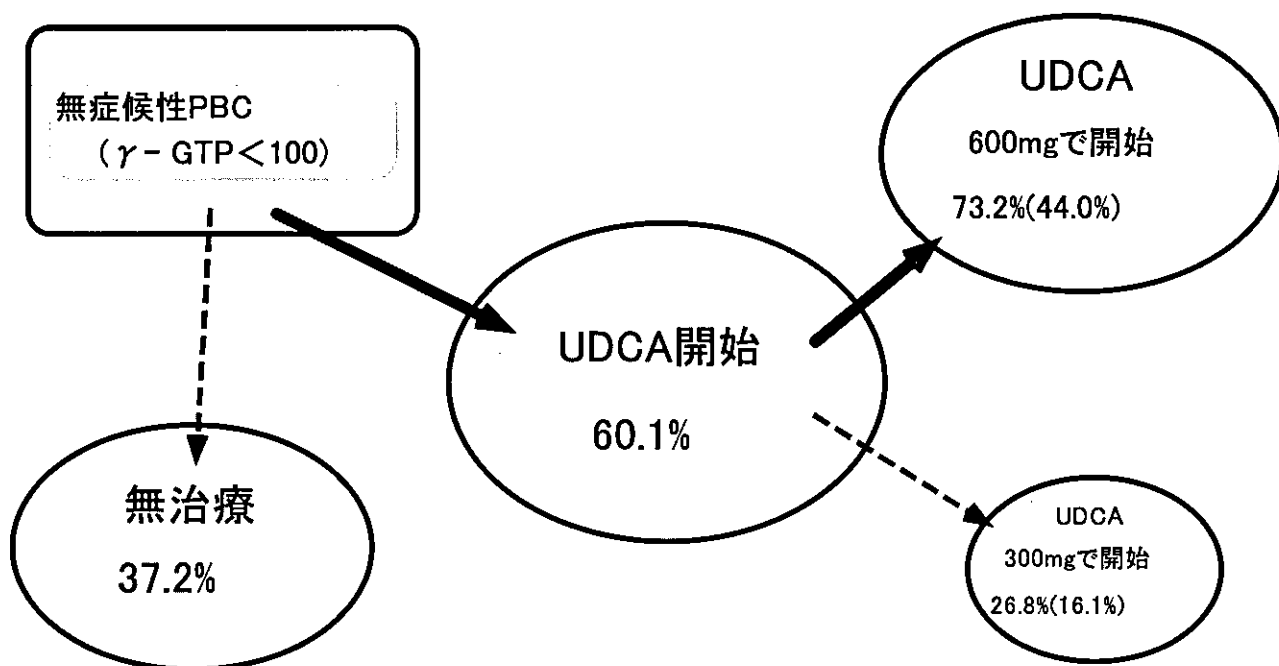


図2. 無症候性PBC($100 \leq \gamma$ -GTP < 300)

(nはアンケート回答者数)

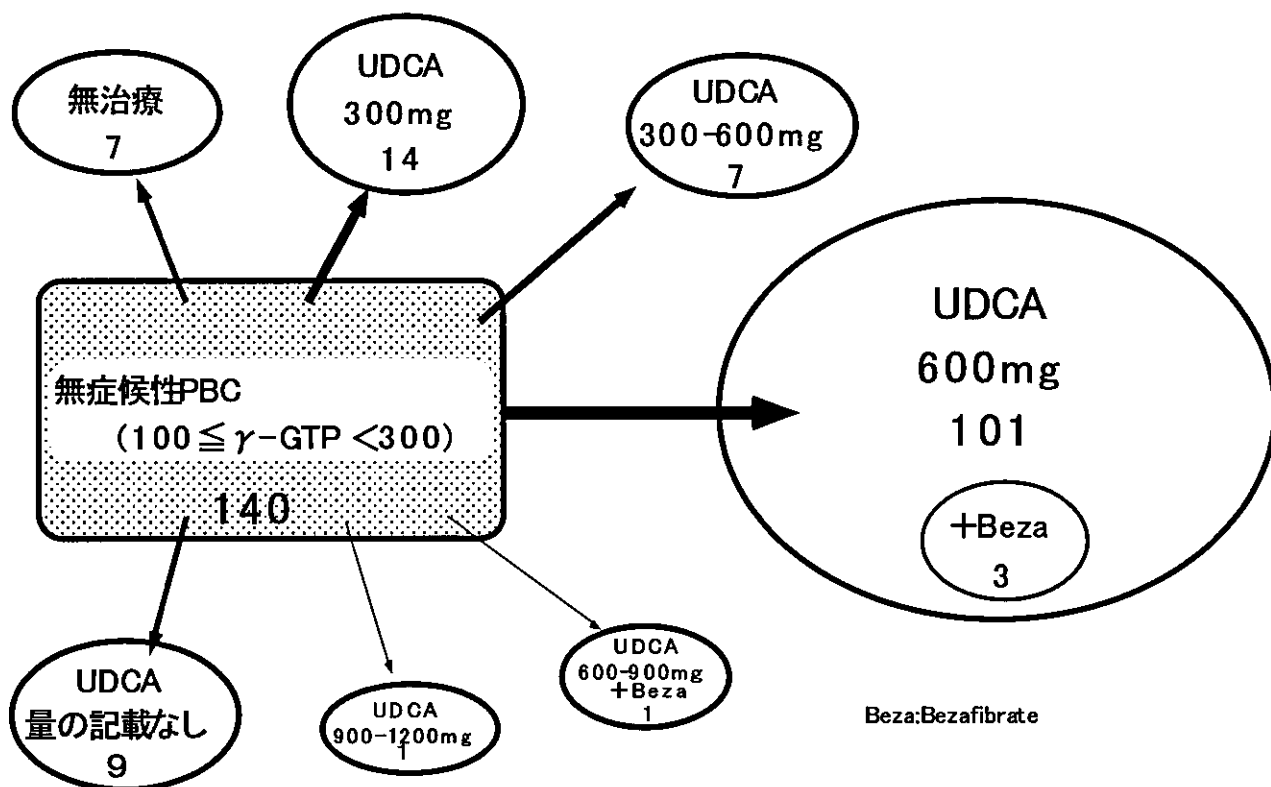
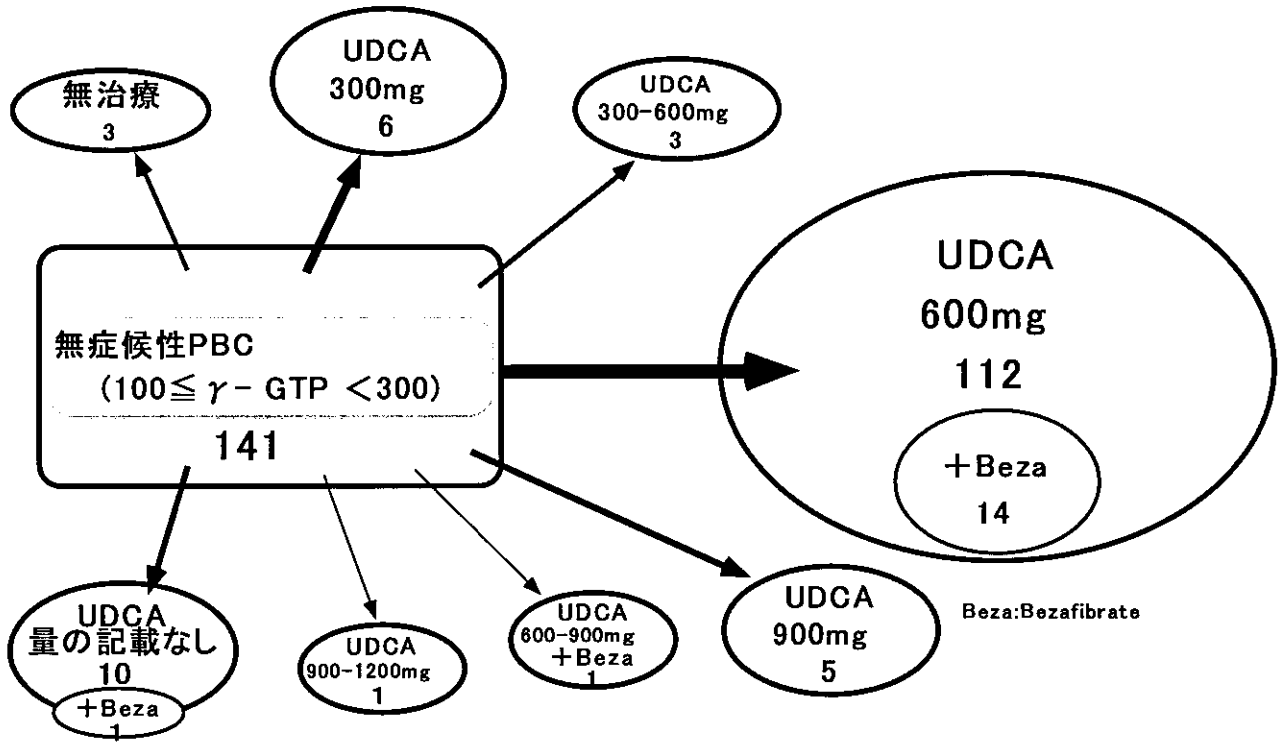


図3. 無症候性PBC($300 \leq \gamma\text{-GTP}$)

(nはアンケート回答者数)



複数回生検からみた自己免疫性肝炎の治療効果

分担研究者 渡部 幸夫 国立病院機構相模原病院・地域医療・研修部長

研究要旨： 1) 1998年以後国立病院機構政策医療肝疾患ネットワーク参加施設で自己免疫性肝炎（AIH）新規症例を登録してきた。登録症例 391 例のうち肝炎ウイルス合併例を除いた 265 例を調査対象として、予後調査を施行し、初期診断が慢性肝炎であった 225 例中予後調査時に臨床的に肝硬変へ進展していた症例は 12 例（5.3%）であった。
2) AIH 症例のうちどのような症例が肝硬変へ進展するのか、その要因を検討し、どのような治療により AIH の予後が改善されるのかを検討するため、私たちは今まで複数回肝生検例を調査、検討してきた。治療前後に複数回肝生検を施行している 4 施設より肝組織標本を検討しえた 39 例について肝組織変化と臨床経過を比較した。コルチコステロイド剤（PSL）治療で完全寛解を維持している症例では肝組織 4 項目（線維化、グ鞘炎、interface hepatitis、小葉炎）ともすべて改善したが、炎症所見に比して線維化の改善は遅れる傾向があった。
3) 複数回生検症例のうち生検間隔が 0.5 年以下および生検間未治療例を除いて、最終生検時の肝線維化別に F0-1（軽度）、F2（中等度）、F3-4（高度）の 3 群に分けて検討した。最終生検時に F2 群、F3-4 群では interface hepatitis とグ鞘炎の改善が F0-1 群と比べて乏しかった。AIH では初期の肝生検所見から長期予後を予測することは困難である。肝線維化を進展させる因子としては、初期治療において完全寛解が得られないこと、PSL 治療を中止すること、頻回の肝炎再燃があることが挙げられた。経過中に再度の肝生検を施行し、肝組織所見改善の程度が不十分であれば PSL 投与量などを再考し、再燃回数を減らすことで、肝線維化の進展を遅らせ、改善をもたらすことが可能であると考えられた。

<研究協力者>

中村陽子 国立病院機構相模原病院消化器科
三富弘之 国立病院機構相模原病院病理
大黒 学 国立病院機構長崎医療センター消化器科

A. 研究目的

AIH の長期生命予後を改善するには肝硬変への進展を阻止し、肝不全死を減らすことが重要と考える。よりの確な治療を行うためには肝線維化を指標とし、どのような治療が有効かについて解析するため、今回は肝疾患ネットワーク施設からの複数回肝生検症例をもとに、線維化の進展要因を検討することとした。

B. 研究方法

対象と方法：肝疾患ネットワーク施設において、1998 年から 4 回 AIH 症例登録を行い、391 例が集計された。この AIH を対象に予後調査を施行し、最終受診時の肝病態などについて調査したところ計 265 例が集計された。初期診断が慢性肝炎で

あった 225 例中、予後調査時に臨床的に肝硬変へ進展していた症例は 12 例（5.3%）であった。国立病院機構長崎医療センター（23 例）、国立病院機構相模原病院（11 例）、国立病院機構東京病院（4 例）、国立病院機構大阪医療センター（1 例）4 施設の計 39 症例 89 検体について、AIH 治療前と治療中の複数回肝生検の臨床経過と肝組織所見とを対比して検討した（表 1）。

肝組織所見は、国立長崎医療センターにおいて以前から使用されていた分類方法に準じ、線維化、グ鞘炎、interface hepatitis、小葉炎の 4 項目について所見の強弱を 0~4 の 5 段階で評価した。たとえば線維化では 0 は正常、4 は肝硬変である（表 2）。病理医 1~2 名、臨床肝臓専門医 3 名の計 4~5 名の評価点の中央値をとって各肝組織を評価した。

今回は複数回生検症例のうち生検間隔が 0.5 年以下および生検間未治療例を除いて、最終生検時の線維化の程度別に F0-1（軽度）群、F2（中等度）群、F3-4（高度）群の 3 群に分けて検討した。

C. 研究結果

複数回肝生検例について

治療経過と肝組織変化について複数回肝生検 39 例を対象に検討した結果、完全寛解例では組織所見 4 項目とも PSL 治療で有意に改善したが、炎症所見に比して線維化の改善は遅れる傾向があった。

最終肝生検時の線維化別に分けた 3 群については、F0-1 群 18 例、F2 群 6 例、F3-4 群 5 例であった。各群別における背景は、F3-4 群の生検間隔が 8.8 年であり、F0-1 群の 5.5 年、F2 群の 5.4 年と比べて長い傾向はあったが、有意差はなかった。肝炎既往の有無が初回生検時の線維化に影響することも考慮して、肝炎既往の有無も調査したが、各群間に違いはなかった。また自己免疫疾患合併の有無も検討したが、各群間に差はなかった(表 3)。

各群で、各症例における線維化の推移を(図 1)に示した。最終生検時の線維化スコアを白抜き円で示し、左に初回生検時の線維化スコアを黒塗りの円で示した。縦軸は線維化が進行していることを 0~4 で示した。最終生検時、F0-1 群の 18 例中 12 例で線維化は改善し、6 例で線維化は不変であるが、F1 のままであるということは、線維化の悪化はほとんどないものと解釈された。最終生検時 F2 群では、6 例中 4 例は改善していたが、1 例では経過中の線維化が不変であり、1 例で悪化していた。F2 の線維化持続や、F2 から F3 への進展症例では治療が不十分であると考えられた。

最終生検時 F3-4 群の 5 例中 3 例で線維化が悪化し、1 例では F3 を持続した。経過が長いことも線維化悪化の原因かもしれないが、これらの悪化例では治療を見直す必要があると思われた。

線維化を基準に、各組織の変化を棒グラフで示したのが(図 2)である。最終生検時の線維化を 3 群に分け、これを斜線の棒で示してある。肝生検 1 の灰色棒が初回生検時の平均値、肝生検 2 の白抜きの棒が最終時生検のスコア平均値を示している。最終生検時 F0-1 群では線維化、グ鞘炎、interface hepatitis、小葉炎のすべての組織所見が初回生検と最終生検との間で有意に改善していた。最終生検時 F2 群では各組織所見とも改善傾向にはあったが、小葉炎の改善のみ有意であった。最終生検時 F3-4 群では、線維化も小葉炎も初回生検時よりも悪化している。すなわち線維化を悪化させないためには、interface hepatitis や小葉炎などの組織での炎症所見が、経過中の肝生検時に改善していることが重要と考えられた。

以上の 3 群で治療を比べてみると、F0-1 群では

初期 PSL 投与量が 60mg と多い量である症例が 33% を占め、しかも初期に寛解にいたっている率が 94% と高い。F2、F3-4 群では初期寛解率はそれぞれ 50%、60% と悪く、さらに、PSL 治療中止がそれぞれ 17%、40% である。F2 群の PSL 中止率は F0-1 群と不変であるが、F3-4 群では PSL 中止も線維化進展の要因となっているかもしれない。また、F2、F3-4 群では、頻回の肝炎再燃率がそれぞれ 67%、100% と多くなっている(表 4)。すなわち初期治療を十分に行って寛解にいたること、PSL 治療を中止することなく、肝炎再燃をきたさないような治療を継続することが、AIH で肝線維化を進展させない要点であると考えられる。

D. 考察

AIH 治療においては、完全寛解が得られると肝組織の線維化は 1 年前後で改善し、グ鞘炎、interface hepatitis、小葉炎は PSL 治療開始後 1 年未満の早期からすべて改善する。

AIH 複数回肝生検症例のうち、29 症例を対象に、最終肝生検時の線維化別に F0-1(軽度)、F2(中等度)、F3-4(高度)の 3 群に分けて検討した。F3-4 群 5 例のうち 4 例で経過中に肝線維化に改善はみられず、進展していた。

AIH 発症初期の肝生検より予後を予測することは困難であるが、AIH の肝線維化を進展させないためには、初期治療で完全寛解を得ること、その後は PSL 治療を長期に継続し、中止することなく、肝炎再燃をきたさないように治療することが重要であると考えられた。

しかも経過中に肝生検を繰り返して行い、肝組織における線維化や炎症の程度を十分に把握したうえで、再燃時の PSL 増量や他の免疫抑制剤の使用を決定すべきであると考えられた。

E. 結論

AIH の長期予後を検討するのに、多施設の複数回肝生検組織の変化を集計した。治療が奏効すれば予後がいい疾患であるだけに、経過中に肝生検を繰り返して行い、治療に反映すべきである。肝硬変への進展を防止するためには、肝組織の変化をみて、PSL など免疫抑制剤の投与量、漸減方法、治療の中止時期などを決定する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中村陽子:自己免疫性肝疾患を見逃さないために-合併する肝外自己免疫疾患の特徴-.
Modern Physician 2003;23(4), 485-492

2. 学会発表

- 1) 中村陽子, 渡部幸夫, 大黒学:肝組織変化からみた自己免疫性肝炎の長期経過と治療による修飾. 第8回日本肝臓学会大会パネルディスカッション3, 福岡, 2004. 10. 21

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

原発性胆汁性肝硬変の長期予後予測マーカーの同定

分担研究者 中村 稔 国立病院機構長崎医療センター 先端技術部長

研究要旨： 原発性胆汁性肝硬変には、長期間の経過観察でもほとんど進行しない予後良好な症例と、進行して肝不全に至る予後不良な症例とが混在することが知られていたが、両者を鑑別するために有用な血清マーカーは知られていなかった。当長崎医療センターで過去 22 年間に長期経過を観察した原発性胆汁性肝硬変患者 71 症例の経過血清を用いて、核膜孔蛋白の一つである gp210 蛋白に対する自己抗体が原発性胆汁性肝硬変の長期予後を予測するための有用な血清マーカーであることを明らかにした。また、全国の国立病院機構肝疾患共同研究グループで長期経過観察された原発性胆汁性肝硬変患者 80 症例の解析からも、当センターでの結果が確認された。今後は、抗 gp210 抗体を血清マーカーとして、予後不良が予測される症例を対象とした新しい治療研究が可能になるものと思われる。一方、肝不全に至った症例のうち約 20%は、抗 gp210 抗体が陰性の症例があることから、これらの症例に対しては、新たな予後予測マーカーを同定する必要がある。

A. 研究目的

近年、検診の普及やウルソデオキシコール酸 (UDCA) の投与により、早期診断される無症候性の原発性胆汁性肝硬変症例や、長期間の経過観察でも病状の進行を認めない症例が増加している。しかし、種々の治療にもかかわらず病状が進行し、肝不全に至る症例が未だ約 10 - 20%存在し、これらの予後不良症例の肝不全への進行を阻止するための画期的治療法の開発は、重要な課題である。

そこで本研究では、予後不良な原発性胆汁性肝硬変患者を早期に同定して、積極的な治療介入を行うために、原発性胆汁性肝硬変の長期予後予測マーカーを同定することを目的とした。

B. 研究方法

当長崎医療センターで過去 22 年間に診療され、血清が定期的に保存されていた原発性胆汁性肝硬変患者 71 例を対象として、血清中の抗 gp210 抗体価を gp210 蛋白の C 末ペプチドを用いた ELISA 法で定量した。また、国立病院機構肝疾患共同研究グループに登録されている原発性胆汁性肝硬変 80 症例の血清を用いて、抗 gp210 抗体価と臨床経過の解析を行った。

C. 研究結果

抗 gp210 抗体は原発性胆汁性肝硬変患者でのみ陽性者が検出され、他の肝疾患（自己免疫性肝炎、ウイルス肝炎、肝硬変）や膠原病では陽性者が全

く検出されず、原発性胆汁性肝硬変にきわめて特異的な自己抗体であることが確認された。

原発性胆汁性肝硬変患者 71 症例（男 9 例、女 62 例、年齢 30-80 歳、中央値 61 歳）のうち初診時に抗 gp210 抗体価が陽性の症例は 23 例 (32.4%) で、これら 23 症例の抗体価を経時的に測定すると、抗 gp210 抗体価が持続高値の症例（グループ A、10 例）、UDCA 治療により抗体価が陰性化あるいは低下した症例（グループ B、13 例）に分類された。初診時に抗 gp210 抗体価が陰性であった症例（グループ C、48 例）を加えて 3 グループ間で予後を比較検討したところ、肝不全に至らず肝移植を受けることなしに生存している生存率 (OLT free survival) は、グループ A がグループ B、C に比較して、有意に低かった。すなわち、抗 gp210 抗体価が持続高値であることが、末期肝不全への進行の危険因子であることが明らかとなった。国立病院機構肝疾患共同研究グループに登録されている原発性胆汁性肝硬変 80 症例の解析からも、抗 gp210 抗体は、原発性胆汁性肝硬変の発症早期においても長期予後を予測するための有用な血清マーカーであることが確認された。

D. 考察

肝生検組織の病理学的活動性を示す interface hepatitis や lobular inflammation の程度は、グループ A はグループ B、C に比較して有意に高いことから、抗 gp210 抗体価は原発性胆汁性肝硬変の病理学的活動性と正に相関する血清マーカー

一であると考えられる。しかし、病理学的活動性と抗 gp210 抗体価が相関する理由や抗 gp210 抗体が産生される機序については、未だ明らかではない。我々は、分子擬態の可能性の他に、原発性胆汁性肝硬変の胆管における gp210 抗原の発現様式の変化、自然免疫から獲得免疫の橋渡しに重要な toll-like receptor や IFN、免疫補助分子の発現の変化、胆管を取り囲むサイトカイン・ケモカイン環境の変化などに着目し、抗 gp210 抗体産生機序とその胆管障害に果たす役割について解析を進めている。

E. 結論

原発性胆汁性肝硬変の長期予後予測マーカー（抗 gp210 抗体）を同定した。今後は、抗 gp210 抗体を血清マーカーとして用いて、予後不良症例を対象とした新しい治療研究が可能になるものと思われる。一方、肝不全に至った症例のうち約 20%は、抗 gp210 抗体が陰性であることから、これらの症例に対しては、新たな予後予測マーカーを同定する必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takii Y, Nakamura M, Ito M, Yokoyama T, Komori A, et al: Enhanced expression of type I interferon and toll-like receptor-3 in primary biliary cirrhosis: Laboratory Investigation 2005 (in press).
- 2) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T, et al: Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatology* 2005 (in press).
- 3) Kamihira T, Shimoda S, Nakamura M, Yokoyama T, Takii Y, Kawano A, et al: Biliary epithelial cells regulate autoreactive T cells: Implications for biliary-specific diseases. *Hepatology* 2005;41:151-159.
- 4) Migita K, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Yoshida Y, Yokoyama T, et al: Lipopolysaccharide signaling induces serum amyloid A(SAA) synthesis in human hepatocytes in vitro. *FEBS Letters* 2004; 569:235-239.
- 5) 小森敦正, 中村 稔, 石橋大海: 特集 Biliary Cell Lineage 3. 獲得免疫の立場から. *肝臓* 2004;45: 646-64

- 6) Kamihira T, Shimoda S, Harada K, Kawano Handa M, Baba E, Tsuneyama K, Nakamura M, et al: Characterization of distinct costimulation dependent and independent autoreactive T cell clone in primary biliary Cirrhosis. *Gastroenterology* 2003; 125:1379-87

2. 学会発表

- 1) 横山照史, 小森敦正, 瀧井康, 中村稔, 上平幸史, 下田慎治, 石橋大海: ヒト培養胆管上皮細胞における Toll-like receptor (TLR) を介した細胞内シグナル伝達. 第 34 回日本免疫学会総会, 札幌, 2004. 12. 1
- 2) 王愛平, 右田清志, 瀧井康, 中村稔, 横山照史, 小森敦正, 石橋大海: PBC 肝組織における Toll-like-receptor 4 (TLR4) の発現. 第 34 回日本免疫学会総会, 札幌, 2004. 12. 1
- 3) 中村稔, 瀧井康, 小森敦正, 横山照史, 大黒学, 矢野公士, 八橋弘, 下田慎治, 吉田由紀, 右田清志, 伊東正博, 石橋大海: 原発性胆汁性肝硬変における抗核膜 (gp210) 抗体の産生機序の解析. 第 34 回日本免疫学会総会, 札幌, 2004. 12. 1
- 4) 瀧井康, 中村稔, 伊東正博, 小森敦正, 横山照史, 中尾瑠美子, 阿比留正剛, 矢野公士, 大黒学, 右田清志, 八橋弘, 原田実根, 石橋大海: 原発性胆汁性肝硬変における門脈域および肝実質のサイトカイン, Toll-like receptor (TLR) の遺伝子発現解析. 第 34 回日本免疫学会総会, 札幌, 2004. 12. 1
- 5) 中村稔, 大黒学, 伊東正博: 原発性胆汁性肝硬変の長期予後予測因子の検討. 第 12 回日本消化器関連学会 (DDW), パネルディスカッション 3 (自己免疫性肝疾患の長期経過と治療による修飾), 福岡, 2004. 10. 21
- 6) 下田慎治, 上平幸史, 半田瑞樹, 中村稔, 石橋大海: PBC 患者あるいは健常者から樹立される自己抗原反応性 T 細胞クローンの性質の比較検討. 第 40 回日本肝臓学会総会, 東京, 2004. 6. 3
- 7) 右田清志, 阿比留正剛, 中村稔, 小森敦正, 大黒学, 吉田由紀, 横山照史, 瀧井康, 松本武浩, 植木俊仁, 矢野公士, 八橋弘, 石橋大海: ヒト肝細胞における Toll-like receptor 4 (TLR4) の発現. 第 40 回日本肝臓学会総会, 東京, 2004. 6. 3
- 8) 小森敦正, 横山照史, 瀧井康, 吉田由紀, 中村稔, 上平幸史, 下田慎治, 八橋弘, 石橋大海: 自然免疫刺激により発現誘導される胆管上皮細胞由来ケモカイン, サイトカインの解析. 第 40 回日本肝臓学会総会, 東京, 2004. 6. 4
- 9) 上平幸史, 下田慎治, 中村稔, 横山照史, 半田瑞

樹, 石橋大海: PD1 リガンド・プロスタグランデ
イン E2 を介したヒト肝内胆管上皮細胞
(HIBEC) の T 細胞に対する抑制作用. 第 40
回日本肝臓学会総会, 東京, 2004. 6. 4

- 10) 瀧井康, 中村稔, 横山照史, 吉田由紀, 小森敦
正, 大黒学, 伊東正博, 八橋弘, 原田実根, 石橋
大海: 原発性胆汁性肝硬変症例における門脈
域, 肝実質別サイトカインおよび Toll-like
receptor (TLR) 遺伝子発現の解析. 第 40 回日
本肝臓学会総会, 東京, 2004. 6. 4
- 11) 中村稔, 吉田由紀, 下田慎治, 瀧井康, 横山照
史, 小森敦正, 植木俊仁, 大黒学, 右田清志, 八
橋弘, 石橋大海: 原発性胆汁性肝硬変における
抗 gp210 蛋白抗体の臨床的意義. 第 40 回日本
肝臓学会総会, 東京, 2004. 6. 4
- 12) 中村稔, 瀧井康, 小森敦正, 横山照史, 吉田由
紀, 下田慎治, 大黒学, 植木俊仁, 矢野公士, 右
田清志, 八橋弘, 伊東正博, 石橋大海: 抗 gp210
抗体価による原発性胆汁性肝硬変の予後予測.
第 32 回日本臨床免疫学会総会, 東
京, 2004. 10. 8-9
- 13) Komori A, Yokoyama T, Takii Y, Nakamura
M, Shimoda S, et al: Innate immune responses
in human intrahepatic biliary epithelial
cells via Toll-like receptors. AASLD ,
Boston, Abstract #597, October 31, 2004.
- 14) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y,
Komori A, Yokoyama T, et al : Anti-gp210
antibody titers as a clinical parameter
that predicts the long-term outcome of
primary biliary cirrhosis under
ursodeoxycholic acid treatment. AASLD ,
Boston, Abstract #679, October 31, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)
なし

PBCの進展と治療反応性の予測におけるIgAクラス抗M2抗体の役割に関する研究

分担研究者 大曲 勝久 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・消化器病態制御学 講師

研究要旨： Western blot法での免疫グロブリンサブクラス別の抗M2抗体がPBCの経過中にどの程度変動するのか、また、IgAクラス抗M2抗体はPBCの進展予測因子となりうるか、を検討した。IgGクラス抗M2抗体は32例中25例(78%)が経過中持続陽性、4例(13%)が持続陰性、3例(9%)では判定が変動した。IgMクラス抗M2抗体は15例(47%)が経過中持続陽性、8例(25%)が持続陰性、9例(28%)では判定が変動した。IgAクラス抗M2抗体は10例(31%)が経過中持続陽性、13例(41%)が持続陰性、9例(28%)では判定が変動した。また、Scheuer's stageとIgAクラス抗M2抗体との関係を検討すると、I期では陽性7例、陰性8例、II期では陽性3例、陰性3例、III期では陽性9例、陰性1例、IV期では陽性2例、陰性0例となり、有意差は認められないものの、ステージが進む程IgAクラス抗M2抗体の陽性率が高い傾向にあった。組織進展例5例では持続陽性が2例、持続陰性が2例、陰性から陽転化した例が1例であった。非進展例11例では持続陽性が8例、持続陰性が3例であった。今回の検討ではIgAクラス抗M2抗体がPBCの進展予測因子として有用ではなかったものの、IgGクラス抗M2抗体に比べ変動する症例が多く、組織がより進行した症例に陽性率が高い傾向にあったことを考慮に入れると、反復測定によりPBCの進展を経時的にモニターできる可能性がある。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)に対する画期的な治療法の開発には、まず、的確な診断法の確立とこれまでの治療法では進行を抑えることのできない予後不良群の選別が必要である。われわれは前年度、IgAクラス抗M2抗体がPBCの進展予測因子となりうるかを検討し、この抗体がPBCの病態に深い関わりがあると推測した。本年度は、(1)免疫グロブリンサブクラス別の抗M2抗体がPBCの経過中にどの程度変動するのか。(2)IgAクラス抗M2抗体はPBCの進展予測因子となりうるか、さらに症例を増やして検討する。この2つの課題について検討を加えた。

B. 研究方法

対象は(1)組織学的にPBCと診断され、少なくとも20ヶ月以上経過を観察され、かつ2回以上の保存血清がある32症例(男性2例、女性30例、年齢中央値58歳、IF-AMA陽性23例、陰性9例、Scheuer's stage I期28例、II期3例、III期1例)、(2)2回以上の肝生検を施行され、かつ生検前後の血清が保存されているPBC症例16例(男性3例、女性13例、年齢中央値47歳、観察期間中央値51ヶ月、Scheuer's stage 進展例5例、非進展例11例)とした。Western blot法はウシ心筋ミト

コンドリア抗原を抗原に用い、1次抗体に対象血清、2次抗体としてHRP標識抗ヒトIgG、IgM、およびIgAを用いた。発色はECL法を用いた。74kDのpyruvate dehydrogenase complex (PDC-E2)、52kDのE3-binding protein (E3BP)、50kDのbranched-chain oxo-acid dehydrogenase complex (BCOADC-E2)、46kDのoxo-glutarate dehydrogenase complex (OGDC-E2)、および41kDのPDC-E1 α に対する抗体を検出した。

C. 研究結果

1. IgGクラス抗M2抗体は32例中25例(78%)が経過中持続陽性、4例(13%)が持続陰性、3例(9%)が判定が変動した。IgMクラス抗M2抗体は15例(47%)が経過中持続陽性、8例(25%)が持続陰性、9例(28%)が判定が変動した。IgAクラス抗M2抗体は10例(31%)が経過中持続陽性、13例(41%)が持続陰性、9例(28%)が判定が変動した。

2. Scheuer's stageとIgAクラス抗M2抗体との関係を検討すると、I期では陽性7例、陰性8例、II期では陽性3例、陰性3例、III期では陽性9例、陰性1例、IV期では陽性2例、陰性0例となり、有意差は認められないものの、ステージが進む程IgAクラス抗M2抗体の陽性率が高い傾向にあった。組織進展例5例では持続陽性が2例、持続陰性が2例、陰性から陽転化した例が1例で

あった。非進展例 11 例では持続陽性が 8 例、持続陰性が 3 例であった。II 期以上では持続陽性例が多いことから、I 期 9 例に限って検討したが、同様の結果であった（組織進展例 4 例中、持続陽性 1 例、持続陰性 2 例、陰性から陽転化した例 1 例、非進展例 5 例中、持続陽性 3 例、持続陰性 2 例）。

D. 考察

PBC における免疫反応の場とされる胆管上皮細胞は、ヒトにおいては生理的に IgA を basolateral 側から luminal 側に輸送し、胆管腔に排泄している。PBC においては高力価の IgA クラス抗 PDC-E2 抗体が肝汁や唾液、尿などに検出されることや、胆管や唾液腺上皮に抗 PDC-E2 抗体と反応し IgA と局在が一致する物質が認められることより、IgA クラス抗 M2 抗体は胆管上皮細胞内に取り込まれ、細胞内で何らかの機序で PDC あるいは交差反応を示す抗原と反応している可能性がある。さらに IgA と PDC-E2 が PDC-E2 特異的 CD8T 細胞の誘導に関わっているとする報告もみられる。血清中と胆汁中の IgA クラス抗 M2 抗体の値は正の相関を示すという報告があり、血清中 IgA クラス抗 M2 抗体は PBC の病態に深い関わりがあると推測される。われわれはこれまでに、IgA クラス抗 M2 抗体が組織学的に進行した症例に多く認められ、bile duct loss など PBC に特徴的な組織所見と関連していることを見だし、今回この抗体が PBC の進展予測因子となりうるかを検討した。PBC の自然経過においては IgA クラス抗 M2 抗体は IgM クラス抗体と同程度(28%)に判定が変動していた。組織との関係では、従来の結果と同様に進行した症例に陽性率が高い傾向にあったものの、進展予測因子とはなり得なかった。

E. 結論

侵襲的な肝生検と異なり、血清診断は反復測定が容易である。今回の検討では IgA クラス抗 M2 抗体が PBC の進展予測因子として有用ではなかったものの、IgG クラス抗 M2 抗体に比べ変動する症例が多く、組織がより進行した症例に陽性率が高い傾向にあったことを考慮に入れると、反復測定により PBC の進展を経時的にモニターできる可能性がある。今後は IgA サブクラス抗 M2 抗体についても検討を加えたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大曲勝久, 角川淑子, 石原 康, 河野 茂: 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-, 医学と薬学 2003;50(4):543-550

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) なし

PBCにおける生体肝移植症例の臨床的背景と病理形態学的検討

研究協力者 恒吉 正澄 九州大学大学院医学研究院形態機能病理学 教授

研究要旨：PBCに対する究極的治療法は生体肝移植であるが、その病態解明や治療法の開発のためには、これらPBC進行症例の病理学的解析は極めて重要である。本研究では、移植に至った22例の臨床的背景とともに摘出肝を病理形態学的に検討した。対象は1999年6月～2004年7月までに当教室において診断したPBC22例（男：1、女：21）で、平均年齢50.3歳、初発時年齢41.1歳、AMAは19例で陽性、初発時から手術までの期間は平均9.2年、術後5例が死亡したが、現在まで再発例は認めていない。3例は組織学的にStage II-IIIの非硬変肝で、いずれも肝は腫大傾向で移植までの平均期間は4年であった。大結節性の肝硬変4例では肝は萎縮傾向で移植までの平均期間は15年であった。PBCの症例では他の原因による肝硬変症に比し、小葉間胆管（100 μ m以下）数は著明に減少していたが、線維化の程度や、胆汁うっ滞との相関はみられなかった。PBCの進展メカニズムの解明のためには移植症例における詳細な経過観察とともに、摘出肝を用いた病理学的解析が大切である。

共同研究者

相島慎一 九州大学大学院形態機能病理学助手

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の進展に関連する因子を病理学的に解析することを目的とし、まず本年度は生体肝移植に至った進行例に対する形態分類およびそれぞれの臨床背景の詳細な検討をテーマとした。

B. 研究方法

本院にてPBCに対して生体肝移植を施行した22症例を用いて、初発時から生検診断、血清診断、治療の有無などの臨床的背景因子と摘出移植肝の肉眼像、最大割面全割切片より得た病理組織像の因子との関連について検討した。

1. 研究対象

1999年6月～2004年7月までに当教室において診断したPBC22例（男：1、女：21）で、平均年齢50.3歳、何らかの肝機能異常を指摘された初発時年齢は41.1歳、AMAは19例で陽性、初発時から手術までの経過は平均9.2年であった。移植術後に5例が死亡したが、現在まで再発例は認めていない。合併症として食道静脈瘤16例、慢性甲状腺炎2例、糖尿病、骨粗鬆症、貧血、関節リウマチを1例ずつ認めた。

C. 研究結果

移植前には15例（68%）が肝生検を施行され、全ての症例でPBCの確定もしくはPBCを示唆す

る診断が得られていた。PBC移植摘出肝3例では非硬変例（Stage II:1例、Stage II-III:2例）で、肝硬変例19例は大結節型4例、症結節型8例、大小混合型7例に分類可能であった。初発時から移植までの期間は非硬変例では4年、大結節型で14.8年、小結節型で9.5年、混合型で7.9年であり、大結節例は移植までの期間が非硬変例や混合型よりも長かった。また、摘出肝の腫大率（摘出肝重量/標準肝容積）の平均は非硬変型で1.5倍、大結節型で0.81倍、小結節型で1.45倍、混合型で1.43倍と大結節例は他に比し、萎縮する傾向にあった。

さらに、摘出肝最大割切片全てにおいて100 μ m以下の小型小葉間胆管をカウントし、単位面積あたりの残存胆管数を計測したところ、PBCでは2.21/cm²に対し、コントロール群のC型肝炎関連の肝硬変で16.38/cm²、原発性硬化性胆管炎（PSC）10.52/cm²、正常肝では32.13/cm²であった。PBCにおいて残存胆管数と臨床病理学的因子（年齢、移植までの期間、硬変肝のパターン、胆汁うっ滞の程度、炎症の程度、線維化の程度など）と相関はなかった。

D. 考察

PBCの進行代表症例として肝移植に至った症例を対象としたが、ほとんどの症例でUDCA抵抗性もしくは、経過中の自己中断による病態の悪化を背景としていた。3例では肝硬変に至っていなかったものの肝移植が施行されていたが、これまで