

厚生労働科学研究補助金
(難治性疾患克服研究事業)

難治性の肝疾患に関する研究

平成 16 年度 総合研究報告書

主任研究者 戸田剛太郎

平成 17 (2004) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

1. 難治性の肝疾患に関する調査研究 1

東京慈恵会医科大学 戸田剛太郎

II. 分担研究総合研究報告

2. 自己免疫性肝炎に関する研究 7

東京慈恵会医科大学 戸田剛太郎

3. 原発性胆汁性肝硬変に関する研究 10

高知大学大学院医学系研究科消化器病態学 大西 三朗

4. 劇症肝炎に関する研究 12

埼玉医科大学消化器・肝臓内科 藤原 研司

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

難治性の肝疾患に関する調査研究

主任研究者 戸田剛太郎 東京慈恵会医科大学 客員教授

要約:自己免疫性肝炎、PBCに関する研究において、それぞれ治療面で大きな進歩が見られた。特に PBC においては、肝移植が残された唯一の治療であるという病態への進展を阻止することを目標としたが、この目標達成の手がかりをつかむことができた。しかし、劇症肝炎研究においては、成因別分類を作成するとともに、成因診断のための基準を示し、治療探索のための足がかりを作った。

1. 研究目的

自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis, AIH)、PBC (primary biliary cirrhosis, PBC)、劇症肝炎 (fulminant hepatitis, FH) および遅発性肝不全 (Late onset hepatic failure, LOHF) を含む肝不全に加え、原発性硬化性胆管炎を対象とする。これら疾患のわが国における実態とその変遷、発症機序、診断法、肝移植を含めた治療指針、およびより良好な QOL を得るための方策に関して、個別、全体の研究を基に解析を進め、診断・治療法を確立と予後改善を目指し、国民の保険医療向上に寄与することを目的とする。

2. 研究方法

1) 全国調査：上記各疾患に関する、従来から行われていた全国調査を継続し、わが国における実態把握を行う。研究の成果として得られた事実を踏まえ、よりの確な診断・治療方策を明らかにする。

自己免疫性肝炎については診断困難な非定型的自己免疫性肝炎 (PBC、原発性硬化性胆管炎との overlap 症候群、cryptogenic chronic active hepatitis) に関して全国調査を行い、わが国における実態と非定型的自己免疫性肝炎の診断指針、治療指針を示す。

PBC についてはウルソデオキシコール酸 (UDCA) 療法の予後改善効果について欧米では疑問視されている現状を踏まえ、PBC 治療への UDCA 導入前と後との患者予後について調査を行う。また、診断基準については抗ミトコンドリア抗体検査法の進歩を考慮に入れ、また、全国調査の結果をふまえて新しい診断基準を示す。

劇症肝炎については自己免疫性機序による劇症肝炎の存在について全国調査を行う。

2) 新たな治療法：自己免疫性肝炎に対するウルソデオキシコール酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA)、PBC に対する Bezafibrate、B 型劇症肝炎に対する Lamibudine の試験研究を行い、その有効性、有用性を明らかにする。また、再生医療技術を踏まえた新しい治療法策を検討する。

3) 病因解明、病態成立機序の解明に基づいた新しい診断法、治療法の開発：疾患モデルの確立を含む病態解析に関する基礎研究を継続する。それぞれの疾患における、診断・治療に関する実験的、臨床的、さらに疫学的検討を行う。また、特に、病態解析においては、DNA マイクロアレイ、SNP 解析、プロテインチップ等による分子生物学的解析を行い、治療においては再生医学応用を考慮に入れ、自己骨髄細胞を用いた肝臓再生、HGF 投与法、スーパー肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝の実験的検討と臨床応用に向けての解析を行う。

3. 倫理面への配慮

症例の収集、臨床検体の採取、収集は研究の目的、方法、プライバシーの保全、検体は本研究以外の目的に使用しないことなどを説明し、本研究に協力しないことにより不利益を受けないことを伝え、患者自由意思によるインフォームドコンセントを得て行う。治療法に関する研究はヘルシンキ宣言に則り、薬物試験に関する GCP を遵守して行う。実験動物については動物愛護の精神を遵守し、各施設の倫理委員会の承認を得、各施設の実験動物ガイドラインに沿って行う。

4. 研究結果及び考察

自己免疫性肝炎分科会

自己免疫性肝炎のなかには自己抗体陰性、血清 IgG 基準値範囲内の診断困難な非定型的な自己免疫性肝炎、PBC との鑑別困難な症例、PBC との合併例 (Overlap) と考えられる症例が存在することから、自己免疫性肝炎、PBC それぞれの診断確定のための判別式を作成した。除外診断により集積された、病因に自己免疫機序が深く関わりと推定される症例群を全国集計により集積した。肝臓専門病理医による組織所見の再評価を踏まえて、自己免疫性肝炎、PBC それぞれの典型症例の診断に寄与する因子を多変量解析で求め、さらに診断論理式(P)を作成した。この式による解析では、わが国の自己免疫性肝疾患の多くは、PBC、あるいは自己免疫性肝炎の範疇に包含され、いわゆる Overlap や原因不明病態は少ないことが明らかとなった。従って、単独診断が困難な場合には、P 値を基に、臨床的に優位な病態を勘案した治療対応が適切であることが示された。事実、集積症例の治療対応の解析では、臨床的に優位な病態に対する治療効果が明らかであることが示された。一方、自己免疫性肝炎の診断において重要な意義を有す病理組織所見、特に PBC との異同が問題となる

胆管病変については、病理診断医間での所見の相違が問題となることが明らかにされた。この点の解決策として、全国集計で集積された標本から典型的所見を抽出し、この所見を配布することが計画された。

肝組織における遺伝子発現プロファイル解析による PBC と自己免疫性肝炎の判別に関する報告もなされた。両疾患は明確に区別される遺伝子発現プロファイルを示し、発現遺伝子のなかで有意に両者を区別する 33 遺伝子が抽出された。これらの遺伝子の発現プロファイル解析の臨床応用が期待される。

自己免疫性肝炎モデルについては高分化肝癌細胞株 Hepa1-6 由来の細胞と樹状細胞との融合細胞接種、 β Gal-CYP2D6+LPS 接種による自己免疫性肝炎モデルマウス作成の報告があった。融合細胞接種によるモデルマウスでは、融合細胞接種により肝細胞に対する CD8⁺細胞障害性 T 細胞が誘導されるが、肝炎発症には IL-12 追加接種による肝組織へのリンパ球集積が必要であることが示された。 β Gal-CYP2D6+LPS のマウス腹腔内接種による自己免疫性肝炎モデルマウスでは CYP2D6 に対するリンパ球幼若化反応、CYP2D6 抗体の産生がみられ、肝組織には門脈域への炎症細胞浸潤、小葉内の巣状壊死が観察された。

自己免疫性肝炎の疾患感受性遺伝子として、HLA-DR4 以外の遺伝因子の存在が示されている。自己免疫性肝炎において CTLA4 の遺伝子多型が検討されたが、欧米からの報告された A49G の高頻度はわが国の自己免疫性肝炎、PBC 患者ではみられなかった。また、マイクロサテライト解析から HLA class III 領域の TNF α 遺伝子近傍にも自己免疫性肝炎の疾患感受性に有意差がみとめられ、欧米の患者について報告された、自己免疫性肝炎と TNF*2(-308A)との相関はわが国の患者では観察されなかった。TNF α 遺伝子近傍にある I κ B λ 遺伝子多型についても検討されたが、自己免疫性肝炎との相関はみられなかった。プロテインチップを用いた血清蛋白の解析の、診断困難であった AIH と PBC の境界病変におけるその診断的有用性について検討したところ、境界病変 10 例はいずれも PBC と判定された。

新たな自己抗体として自己免疫性胆管炎 (Autoimmune cholangitis, AIC) に特異的と報告されている Carbonic anhydrase II (CA II) に対する抗体、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 GST A1-1 抗体に関する検討がなされた。CA II 抗体は、わが国 AIC 症例での特異性は必ずしも高くなかった。GST A1-1 抗体陽性自己免疫性肝炎は陰性例と比べ、発症年齢が若く、肝硬変への進展率が高く、予後不良を示唆する自己抗体であることが示された。

CpG DNA を adjuvant として肝蛋白でマウスを免疫することにより誘導される自己抗体の認識抗原のひとつは calreticulin であった。calreticulin 抗体は自己免疫性肝炎、PBC 患者の 40~60%に検出されており、calreticulin を CpG DNA と投与することにより肝

炎が惹起されることから肝細胞障害に関わっている可能性も示された。

Con A 誘発肝炎モデルマウスを用いた研究において、Fucoidan が肝組織内 (Kupffer 細胞?) に IL-10 産生を誘導し、肝炎抑制効果を示すことが報告された。臨床応用が期待される。

従来の全国調査では症例集積が十分でなかった小児症例の存在が明らかとなった。その診断は従来の成人に対する診断指針では困難な場合が多く、また、治療に当たっても発達成長を勘案する必要があることから、小児症例に対する、診断・治療指針確立が必要であり、現在、全国調査を開始したところである。治療については初期治療としてメチルプレドニソロンの使用が成長障害をもたらすことなく病態の沈静化に有用であることが示された。また、急性発症型自己免疫性肝炎の診断も小児例と同様に困難であり、より特異的な診断指標の確立に向けて更なる検討も行う必要がある。

維持療法において AST, ALT を基準値上限の 2 倍以下に維持すればよいという AASLD practice guidelines がある。しかし、基準値範囲に維持された群、基準値以上 2 倍以下の群、再燃群に分けて、組織学的所見 (線維化、グネ炎、Interface hepatitis, 小葉炎) の改善について検討したところ、基準値範囲に維持された群においてのみ有意の改善がみられた。したがって、AIH 治療の臨床的目標としては AST, ALT を基準値内に維持することが必要であると結論された。

自己免疫性肝炎における肝細胞癌発生例について臨床像の検討が行われたが、その全例が肝硬変への進展例でアザチオプリン使用例であった。アザチオプリン使用例については肝発癌に注意する必要がある。

自己免疫性肝炎に対する UDCA の臨床効果に関する試験研究を実施したが、検討に十分な症例が集積できず、中止せざるを得なかった。現在、集積症例のみについて UDCA の効果を解析したが、有効性は確認できなかった。しかし、個別研究では UDCA の有効例も報告され、UDCA の非定型自己免疫性肝炎に対する治療効果、特に組織所見改善が得られることが報告されている。

従来の検討に加え、現在明確な診断指針、治療法策等が確立されていない原発性硬化性胆管炎 (PSC) に対する全国調査を開始した。

原発性胆汁性肝硬変分科会

PBC 症例の全国調査が継続して行われた。平成 13 年度年 12 月末に実施した第 11 回 PBC 全国調査により、既登録症例 1793 例と新規登録 769 例の報告が得られ、総登録症例は 5129 例となった。5 年生存率は a-PBC (無症候性) 97%、s1-PBC (黄疸なく、搔痒あり) 89%、s2-PBC (黄疸あり) 54%、10 年生存率は各々 90%、72%、35%であった。年代別予後解析の結果、a-PBC、s1-PBC および軽度 (T-Bil 値

2-5mg/dl、組織学的病期 I または II) の s2-PBC では、1990 年以降に診断された群は以前の群と比較して予後が有意に改善していた。多変量解析の結果、軽度 s2-PBC の群の予後に UDCA の影響が示唆され、UDCA 投与の予後改善効果が明らかにされた。内科的治療により生存期間の延長が十分期待できない T-Bil 5mg/dl 以上または組織学的病期 III・IV 期群では、肝移植適応の検討が必要である。また家系調査が進められ、PBC の家族歴を有することは PBC 発症の危険因子になることが示された。平成 15 年度には第 12 回全国調査が実施された。第 6-11 回全国調査に登録された 2,360 例には少なからず自己免疫性肝炎-PBC overlap 症例が含まれている可能性があることが示された。しかし、診断論理式、プロテインチップを用いた血清蛋白の解析でも overlap は稀とされており、箇々の症例の詳細な解析が必要である。肝細胞癌の発生に関する検討では、過去 20 年で肝細胞癌の発生が減少しその要因として UDCA 療法の PBC 治療への導入が示唆された。

住民検診での抗ミトコンドリア抗体 (AMA) を測定によりわが国では地域差のなく、AMA のスクリーニングに、リコンビナント M2 抗原を基質とする ELISA 法による AMA 測定キット (MESUCUP-2) を用いると、疑陽性が多く、判定には cut off 値を高くする必要があることが指摘された。間接蛍光抗体 (IF) 法と ELISA 法を用いて一般住民の AMA 陽性率が調査された。香川県の住民検診受診者 620 人において、IF 法による AMA (IF-AMA) は 3 例 (0.48%)、ELISA 法による AMA (M2) は 17 例 (2.74%) で検出された。IF-AMA を AMA 診断の Gold Standard とした際の M2 の診断能は、感度 100%、特異度 97.7%、陽性的中率 17.3%、陰性的中率 100% であった。M2 陽性例の 65%、IF-AMA 陽性例の 100% は免疫ブロット法で AMA 陽性であった。過去 3 回の成績を統合した AMA 陽性率は 0.52% (22/4247) であった。

PBC52 症例の HLA DRB1 を健常者 118 人と比較により、PBC では DR B1*15, DRB1*08 は有意に頻度が高く、DRB1*13 は有意に頻度が低い事が報告された。xenobiotics が PBC の発症およびその病態に関わっている可能性が示されているが、xenobiotics の代謝に関わるシトクローム P450 酵素群の遺伝子多型 (SNP) が、PBC の発症およびその臨床経過に影響を与えるかどうか検討したところ CYP2E1 の c1/c2 ジェノタイプは PBC の重症度と関連性が認められた。

約 2,300 既知の遺伝子を用いたマイクロアレイの検討で、非 B 非 C 型肝炎では細胞接着、抗アポトーシス、細胞周期、細胞周期に関与する遺伝子群の特異的な発現が報告された。PBC では同一症例での治療前後の比較で、治療後に発現が増強した遺伝子として、cytochrome P450II E1, aldolase B, haptoglobin alpha 1S が、発現が低下した遺伝子としては、alpha-fetoprotein, cytochrome c oxidase 1 が抽出された。

PDC-E2 は PBC の特異的な診断マーカーである抗ミトコンドリア抗体の標的抗原の一つであるが、樹立された PDC-E2 特異的 T 細胞クローンのなかには大腸菌 OGDC-E2 34-37 と交叉反応を示す株が存在すること、また、大腸菌 OGDC-E2 34-37 を刺激抗原として樹立されたクローンはヒト RDC-E2 などの自己抗原と交叉反応性をしめすことから、PBC においては分子擬態を介した自己免疫反応の誘導が想定された。また、PBC における抗核抗体についても分子擬態の関与の可能性も指摘された。PBC では補助刺激非依存性の CD4+ T cell や CD28⁻, CD4+ T cell が末梢血と肝臓局所で増加している。補助刺激依存性、補助刺激非依存性の PDC-E2 特異的 CD4+ T cell はいずれも胆管細胞障害性であるが、前者は胆管細胞と共培養するとアナジーに陥るのに対し、後者は陥ることはなく、胆管細胞障害持続に関与している可能性が示された。また、胆管上皮細胞は IFN- γ 処理と補助刺激分子である B7 の遺伝子導入後も抗原提示能を示さない成績も示され、胆管上皮細胞が免疫反応を抑制する可能性が示唆された。

PBC における肝内小型胆管の消失に老化が関わることを、老化形質 senescence-associated β -galactosidase、および老化関連遺伝子 p16, p21 の発現亢進、さらに培養マウス胆管上皮細胞では酸化ストレス、TGF- β の添加により老化関連形質が誘導される成績から示した。老化関連形質の誘導について老化関連 p16^{INK4a} 発現の抑制因子：polycomb 蛋白 Bmi-1 の発現と PBC 胆管の細胞老化との関連を検討したところ、障害胆管では、Bmi-1 発現の低下、Bmi-1 発現低下と相関する p16^{INK4a} 発現亢進を認め、老化関連形質の誘導には Bmi-1 発現低下が関与する可能性が示唆された。すなわち、PBC における胆管障害には老化関連遺伝子発現抑制因子の発現低下による再生能の低下が関わっている可能性が示された。老齢 C57BL/6 マウスで見られる PBC 様の胆管病変が poly I:C の投与で出現が早まり、かつ進行することを報告した。また、この胆管病変を免疫寛容性の樹状細胞で制御する試みも示された。PBC の肝組織ではアルカリフォスファターゼの発現が増強していることを免疫組織化学、Western blotting 法、定量的 RT-PCR で示した。PBC の動物モデルであるマウス GVHR の cDNA マイクロアレイによる検討から B cell の chemokine, apoptosis の発現増強が見られることを報告した。

ベザフィブラートの PBC に対する有効性に関する試験研究を行った。UDCA、ベザフィブラート (Bezafibrate) それぞれ単独投与の血清アルカリホスファターゼ (ALP)、 γ GTP、AST、ALT レベルに及ぼす効果について比較したが、検査値の改善については UDCA が優れていた。しかし、UDCA 投与患者に Bezafibrate を併用投与した場合、UDCA 単独投与と比較して血清 ALP、 γ GTP レベルの有意の改善が見られた。一方、AST、ALT レベルについては有意の

改善は見られなかった。PBCに対する Bezafibrate の有効性はわが国で見出された知見であり、今後 PBC の予後改善に有効であるかどうかについて検討することが必要である。

現在進行症例では唯一の治療法である肝移植はわが国では生体肝移植によりなされている。適応の参考となる日本肝移植適応研究会モデルによる移植対象症例の6か月死亡率は Mayo モデル (update) による6か月死亡率との間には相関がなく、ともに対象症例のほとんどが100%死亡の判定となるため、手術適応を考慮する指標にはならなかったが、62%の症例では Mayo モデル risk score (conventional) は平均値 8.2 (5.3-11.6) と、手術リスクの高いとされる 7.8 を越えていた。3年累積生存率は 85% と、その成績は良好であるが、今後は生体肝移植を踏まえた適応基準の確立が必要である。

劇症肝炎分科会

劇症肝炎、遅発性肝不全 (LOHF) の成因について新たな分類と成因診断のための基準が示された。成因はウイルス性 (A型、B型、C型、その他)、自己免疫性、薬剤性、成因不明、分類不能に分類され、従来の分類に加えて自己免疫性が新たに加わった。自己免疫性が劇症肝炎、LOHF において占める比率は平成 13,14,15,16 年度の報告では、それぞれ 11.6, 2, 9, 0% であった。

2001年に発症した劇症肝炎、LOHFの全国調査では101症例が登録され、前年に比し自己免疫性症例が低率であったが、基礎疾患や薬剤歴を有する症例は高頻度であり、成因ではB型が最も多いなどは従来と同じ傾向を示した。また、新たにE型肝炎ウイルスが成因として認知された。肝移植の実施率は前年より更に高率となっており、また、昏睡出現から肝移植までの日数も短縮していることが明らかになった。この結果、肝移植実施例も含めた救命率は、急性型が50%以上、亜急性型とLOHFは40%以上に達していた。しかし、肝移植適応ガイドラインは正診率が急性型で特に低率であり、また、亜急性型も specificity が低いなど、病型ごとに改変する必要があることが判明した。さらに、2002年に発症した劇症肝炎、LOHFの全国調査では劇症肝炎117例(急性型53例、亜急性型64例)、LOHF10例が登録された。この調査ではウイルス性が46%、成因不明は35%であった。肝移植非実施症例における救命率は急性型57%、亜急性型23%、LOHF0%であり、B型キャリアと自己免疫性例は何れの病型も予後不良であった。生体部分肝移植が、急性型21%、亜急性型33%、LOHF40%で実施されており、救命率は夫々64%、76%、75%であった。肝移植実施例も含めた救命率は急性型58%、亜急性型41%、LOHF30%となり、生体部分肝移植導入による予後改善が明らかとなった。また、1998~2002年に登録された肝移植非実施483例による肝移植適応ガイドラインの有用性の再評価では、急性型では sensitivity, specificity とともに低率である

のに対して、亜急性型では specificity のみが著しく低率であり、病型ごとに改変する必要があると考えられた。

試験研究「HBV キャリアの急性増悪例に対する lamivudine 投与の有用性を検討する prospective study」に平成16年1月15日までに登録された187例の解析から無症候性キャリアではプロトロンビン時間が40%以上で、慢性肝炎では総ビリルビン濃度が15 mg/dL 未満の段階でラミブジン投与を開始すれば、急性増悪例は高率に救命できることが示された。一方、投薬の中断、YMDD 変異株や breakthrough hepatitis の出現率などは、通常の慢性肝炎と明らかな差異のないことが明らかとなった。

肝炎劇症化の予知、治療に関して、全国17施設からプロトロンビン時間が80%以下を示した急性肝炎259例を集計、予後規定要因としては年齢、総ビリルビン、プロトロンビン時間および成因が抽出された。

apoptosis を惹起する TNF 受容体を介するシグナルは NF- κ B が IL-8 を誘導することによって抑制されること、CTLA-4lg がマウスモデルにおける肝障害を軽減することが報告された。Th1 免疫応答の開始に必須のサイトカインであるオステオポンチンのプロモーター領域の SNP が肝炎の重症度を規定する可能性があり、また、イムノクロマト法を用いた測定キット開発により、劇症化の予知に有用な血清 HGF の濃度が迅速、簡便に測定可能となった。

1998~2003年に発症した劇症肝炎と病態の類似した重症型アルコール性肝炎90症例の全国集計で、救命率は33%と低率で予後も不良であり、集学的治療の体系確立が今後の課題である。

新たな治療法として自己骨髄細胞を用いた肝再生の誘導、HGFを用いた治療、スーパー肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝などの臨床応用へ向けての検討が加えられ、骨髄細胞からの肝細胞への分化・増殖の GFP (Green fluorescent protein) transgenic mice を用いた in vivo 評価モデルでは、血清アルブミン値が有意に改善し、また生存率も有意に改善したことより『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法 (細胞療法)』は臨床応用可能な次世代の移植療法となりえる可能性が示された。平成15,16年度には、国内初の「自己骨髄細胞を用いた肝再生療法」として肝硬変症例に実施された。HNF-4 遺伝子を導入した肝細胞は高度の肝細胞特異機能を発現し、スーパー肝細胞として人工肝に応用可能である可能性が示された。

4. 目標達成度

自己免疫性肝炎

目標「診断遅延による重症化、病態の進展が臨床上問題であり、早期診断、早期治療開始を目指した診断体系の確立とともに副作用のない治療薬の探索」

診断体系の確立については自己免疫性肝炎、PBC それぞれの診断についてロジスティック回帰モデル

を作成した。これによって診断困難な非定型的自己免疫性肝炎の診断が容易になることが期待される。しかし、自己免疫性肝炎に特異的な指標の探索は達成できなかった。

自己免疫性肝炎に対する、副作用のきわめて少ないUDCA療法の有効性についての試験研究は解析に十分な症例登録がなく中止となった。しかし、登録された症例の解析からはUDCA療法の有効性は否定された。

小児の自己免疫性肝炎においてプレドニソロンの使用に伴う成長障害を軽減する治療法として初期治療としてメチルプレドニソロンの使用の有用性が示された。

自己免疫性肝炎モデルマウスが作成され、新しい治療法の開発、病態解明に多大の貢献が期待される。

PBC

目標「ドナー不足は深刻である。したがって、現時点では肝硬変への進展を阻止することが重要である」

ベザフィブラートの PBC に対する有効性に関する試験研究では、単独投与では、有用性においてベザフィブラートのUDCAに対する優位性はみられなかった。しかし、UDCA投与患者にBezafibrateを併用投与した場合、UDCA単独投与と比較して血清ALP、 γ -GTPレベルの有意の改善が見られた。この試験研究によって、本研究班が当初掲げた目標達成のための手掛かりがつかめた。

自己免疫性肝炎患者の肝臓との遺伝子発現の、DNAチップを用いた比較によって、両者が明確に区別される病態であることが示され、ロジスティック回帰モデルで得られた結果と合致する結果であった。

住民検診での抗ミトコンドリア抗体(AMA)を測定によりわが国では地域差がなく、AMAのスクリーニングにELISA法(MESCU-2)を用いると、疑陽性が多く、判定にはcut off値を高くする必要があることが指摘された。免疫蛍光法によるAMA測定の早期診断における有用性は示されているが、ELISA法による測定については今後の課題であり、陽性者の長期にわたるフォローが必要である。

劇症肝炎

目標「依然として予後不良の病態であり、確立された治療法は肝移植以外にはない。しかし、ドナー不足は深刻である。したがって、現時点では劇症化の予防、有効な内科的治療の探索が必要である。」

劇症肝炎、LOHF(late onset hepatic failure、遅発性肝不全)の救命率は残念ながら、現在でも不良であるが、急性型では内科療法のみでも50%以上の救命が得られている。LOHFでは内科療法での究明は極めて困難であり、肝移植が現時点では唯一の治療法である。劇症化の予知については急性肝炎においてはプロトンピン時間が80%以下になった場合、劇症化の可能性があると研究が発表されたが、信頼性の高い予知モデルの作成はこれからの課題である。

早期治療により救命率の向上が可能かどうかについても一定の結論は得られなかった。また、肝移植に対する適応基準、その診断についてのより明快な指針、基準を早急に確立する必要がある。

B型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス薬ラミブジン投与は劇症肝炎に対しては有用性はみられなかった。しかし、劇症化の予防という観点から、B型慢性肝炎の急性増悪症例に対するラミブジン投与のプロスペクティブ研究を行った。慢性肝炎症例では血清ビリルビン値が5mg/dlとなった時点で投与を開始することにより、効果が得られることが明らかとなった。しかし、無症候性キャリアーからの発症症例に対する効果は未だ十分ではなく、プロトンピン時間が60%を切ったら速やかに投与を開始することが必要であるとともに、他の治療法併用の考慮も必要である。

自己骨髄細胞を用いた肝臓再生治療の研究結果が示された。劇症肝炎に対する適用はまだであるが、肝硬変症例においては肝機能改善効果がみられた。現在のところ、副作用はみられず、今後の展開が期待されると思われる。

関連形質が誘導が注目される。

5. 今後の展望

本研究班で取り上げた疾患はいずれも最終的には肝臓移植が必要となる疾患である。しかし、現在、世界的にもドナー不足に陥っており、特にわが国では脳死肝移植はきわめて少なく、肝移植は生体肝移植に依存しているという意味で、ドナー不足は深刻である。したがって、肝移植のみが残された治療選択肢である病態への進展を阻止することが重要である。

自己免疫性肝炎では早期に診断し、治療を開始すれば予後はきわめて良好である。したがって、早期診断、早期治療のための臨床的指標の探索、開発が将来の課題である。病因の解明とともに発症機序解明のためには肝炎発症のtriggerの同定が予防の観点からも重要である。

PBCではUDCA、bezafibrate併用療法の予後改善効果の検討、無症候性から症候性への進展予測のための指標の探索、病因の解明が残された課題である。病因の解明に関連してビリルビン酸脱水素酵素複合体のE2成分のリポ酸結合領域を標的とする免疫反応が胆管傷害に関わっていることが明らかにされていることから、この免疫反応がいかんして惹起されるかを明らかにすることが必要である。

劇症肝炎については内科的治療の開発とともに、劇症化の機序の解明、劇症化の予防・予知が重要な課題である。また、人工肝、人工肝補助装置の開発、肝再生医療も将来の治療手段として視野に入れておく必要がある。また、B型肝炎ウイルス感染に起因する劇症肝炎については、新しい抗ウイルス薬(adefovir, entecavirなど)の治療への応用も試みていく必要がある。

6. 結論

自己免疫性肝炎：研究の目標は早期診断、早期治療開始を目指した診断体系の確立とともに副作用のない治療薬の探索であったが、診断体系の確立については、自己免疫性肝炎、PBCそれぞれの診断についてロジスティック回帰モデルを作成した。これによって診断困難な非定型的自己免疫性肝炎の診断が容易になることが期待される。しかし、自己免疫性肝炎に特異的な指標の探索は達成できなかった。自己免疫性肝炎に対する、副作用のきわめて少ないUDCA療法の有効性についての試験研究は解析に十分な症例登録がなく中止となった。登録された症例の解析からはUDCA療法の有効性は否定された。しかし、個別研究では有効性を示す報告があり、有効症例の詳細な解析を通じて、適応症例の選択基準を示すことが必要と考えられる。小児の自己免疫性肝炎においてプレドニソロンの使用に伴う成長障害を軽減する治療法として初期治療としてメチルプレドニソロンの使用の有用性が示された。自己免疫性肝炎モデルマウスが作成され、新しい治療法の開発、病態解明に多大の貢献が期待される。

PBC：研究目標は肝硬変への進展を阻止することであった。この目標達成のために、ベザフィブラートのPBCに対する有効性に関する試験研究を行った。その結果、UDCA投与患者にBezafibrateを併用投与した場合、UDCA単独投与と比較して血清ALP、 γ GTPレベルの有意の改善が見られた。自己免疫性肝炎患者の肝臓との遺伝子発現の、DNAマイクロアレイを用いた比較によって、両者が明確に区別される病態であることが示され、ロジスティック回帰モデルで得られた結果と合致する結果であった。免疫蛍光法による抗ミトコンドリア抗体(AMA)測定 of 早期診断における有用性は示されているが、ELISA法による測定されたAMAの早期診断における有用性については今後の課題であり、陽性者の長期にわたるフォローが必要である。抗ミトコンドリア抗体測定 of ELISA法が開発されたことから、新しいPBC診断基準を作成、提案した。

劇症肝炎：劇症肝炎、LOHF (late onset hepatic failure、遅発性肝不全) の救命率は残念ながら、現在でも不良であるが、急性型では内科療法のみでも50%以上の救命が得られている。LOHFでは内科療法での究明は極めて困難であり、肝移植が現時点では唯一の治療法である。B型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス薬ラミブジン投与は劇症肝炎に対しては有用性はみられなかった。しかし、劇症化の予防という観点から、HBVキャリアーの急性増悪症例に対するラミブジン投与のプロスペクティブ研究を行った。慢性肝炎症例では血清ビリルビン値が5mg/dlとなった時点で投与を開始することにより、効果が得られることが明らかとなった。しかし、無症候性キャリアーからの発症症例に対する効果は未だ十分ではなく、プロトンピン時間が60%を切ったら速やかに投与を

開始することが必要であるとともに、他の治療法併用の考慮も必要である。

自己骨髄細胞を用いた肝臓再生治療の研究成果が示された。劇症肝炎に対する適用はまだであるが、肝硬変症例においては肝機能改善効果がみられた。副作用はみられず、今後の展開が期待される。

Ⅱ. 分担研究総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

自己免疫性肝炎に関する調査研究

主任研究者 戸田剛太郎 東京慈恵会医科大学 客員教授

要約

研究の目標は、病因、発症機序の開明、早期診断、早期治療開始を目指した診断体系の確立とともに副作用のない治療薬の探索であった。小児の自己免疫性肝炎（AIH）の全国調査が行われた。小児 AIH は診断困難例が多く、重症例も多いことが明かとなった。今後、症例の集積を通じて診断・治療の指針を示す必要がある。AIH、原発性胆汁性肝硬変（PBC）それぞれの診断についてロジスティック回帰モデルを作成した。これを臨床例の診断に応用することにより、わが国の自己免疫性肝疾患の多くは、PBC あるいは AIH の範疇に包含され、いわゆる Overlap は少ないことが明らかとなった。遺伝子発現プロファイル解析、プロテインチップを用いて血清蛋白の解析でも自己免疫性肝疾患は AIH、PBC に分類され、両疾患が合併する病態は稀であることが示された。AIH の疾患感受性遺伝子として、HLA-DR4 以外の疾患感受性遺伝子の検索が行われたが、見い出されなかった。自己抗体に関する研究では、Carbonic anhydrase II (CA II) に対する抗体の疾患特異性、GST A1-1 抗体の臨床的意義、calreticulin 抗体の病態生理的意義、SLA/LP 抗体の診断的有用性に関する研究があった。治療については、AIH 治療の臨床的目標としては AST, ALT を基準値内に維持することが必要であることが示された。AIH に対する UDCA の臨床効果に関する試験研究を実施したが、検討に十分な症例が集積できず、中止せざるを得なかった。しかし、個別研究では UDCA の有効例も報告され、UDCA の非定型 AIH において治療効果、特に組織所見改善が得られることが報告されている。

動物モデルによる病態解析では β Gal-CYP2D6+LPS の C57BL/6 マウス腹腔内接種による自己免疫性肝炎モデルマウス作成、MHC class II の差に由来する GVHR モデルマウスを用いた病態解析、Con A 誘発肝炎モデルマウスを用いた治療に関する研究があった。

研究の目標は、病因、発症機序の開明、早期診断、早期治療開始を目指した診断体系の確立とともに副作用のない治療薬の探索であった。診断困難例の診断体系の確立については、自己免疫性肝炎、PBC それぞれの診断についてロジスティック回帰モデル、また、将来の課題として、遺伝子発現プロファイル、プロテインチップの応用が示された。これによって診断困難な非定型自己免疫性肝炎の診断が容易になることが期待される。しかし、自己免疫性肝炎に

特異的な指標の探索は達成できなかった。自己免疫性肝炎に対する、副作用のきわめて少ない UDCA 療法の有効性についての試験研究は解析に十分な症例登録がなく中止となった。登録された症例の解析からは UDCA 療法の有効性は否定されたが、個別研究では有効性を示す報告があり、有効症例の詳細な解析を通じて、適応症例の選択基準を示すことが必要と考えられる。小児の自己免疫性肝炎においてプレドニソロンの使用に伴う成長障害を軽減する治療法として初期治療としてメチルプレドニソロンの使用の有用性が示された。自己免疫性肝炎モデルマウスが作成され、新しい治療法の開発、病態解明に多大の貢献が期待される。以下、平成 14 年～16 年、3 年間の研究成果について述べる。

全国調査（小児自己免疫性肝炎）：小児の自己免疫性肝炎（autoimmune hepatitis, AIH）の全国調査が行われた。一次調査において 2001～2003 年の 3 年間に新規 AIH 症例 34 例（重複例あり）、自己免疫性肝疾患が疑われる症例 23 例が登録されたが、二次調査による登録症例は 22 例であった。このうち、筑波大学小児科での検討の結果、10 例が AIH、2 例が AIH/原発性硬化性胆管炎のオーバーラップ症例であった。血清 IgG は 1 例を除いて 2g/dl 未満であり、抗核抗体、抗平滑筋抗体いずれも陰性の症例が 1 例あり、抗核抗体陽性者では、その力価は 160 倍以下であった。しかし、International AIH group の診断基準による scoring では probable 4 例、definite 6 例であり、小児の AIH 診断においても International AIH group の診断基準は有用と考えられる。小児 AIH の治療ではステロイドによる成長障害が問題となる。この点に関して、本研究班では、メチルプレドニゾンパルス療法併用が経口プレドニゾン単独療法よりも肝機能検査の正常化も速やかで、成長障害などの副作用が少ないことが示されたが、本全国調査においてもメチルプレドニゾンパルス療法施行例が多く、その約半数が完全寛解となった。AIH 10 例のうち、死亡が 2 例、肝硬変例が 3 例あった。死亡 2 例のうち 1 例は白血病、1 例は副作用のため免疫抑制薬使用不可の症例であった。AIH/原発性硬化性胆管炎オーバーラップ症例は完全寛解 1 例、部分寛解 1 例であった。

本全国調査において小児 AIH は診断困難例が多く、重症例も多いことが明かとなった。今後、症例の集積を通じて診断・治療の指針を示す必要がある。

診断体系: 自己免疫性肝炎のなかには自己抗体陰性、血清 IgG 基準値範囲内の診断困難な非定型的な自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) との鑑別困難な症例、PBC との Overlap と考えられる症例が存在する。これらの診断困難例の診断のために自己免疫性肝炎、PBC それぞれの診断についてロジスティック回帰モデルを作成した。これを臨床例の診断に応用することにより、わが国の自己免疫性肝疾患の多くは、PBC あるいは自己免疫性肝炎の範疇に包含され、いわゆる Overlap や原因不明病態は少ないことが明らかとなった。

DNA マイクロアレイを用いて肝組織における遺伝子発現プロファイル解析すると PBC と自己免疫性肝炎は明確に区別される遺伝子発現プロファイルを示すことが報告され、発現遺伝子のなかで有意に両者を区別する 33 遺伝子が抽出された。DNA マイクロアレイを用いなくても、これらの遺伝子を用いて RT-PCR によって両者を区別することも可能であろう。

プロテインチップを用いて血清蛋白の解析を行い、診断困難であった AIH と PBC の境界病変における診断的有用性について検討した。AIH と PBC、それぞれの疾患において異なった発現ピークを示す蛋白は 23 個あったが、両者を効率よく区分できる単一蛋白はなく、発現蛋白の組み合わせにより良好な判別が可能となった。その結果、境界病変 10 例はいずれも PBC と判定された。また、プロテインチップを用いた血清蛋白の解析により Autoimmune cholangitis は PBC にきわめて近い蛋白発現パターンを示すことが明らかにされた。

以上の報告は自己免疫性肝疾患は自己免疫性肝炎、PBC に分類され、両疾患が合併する病態は稀であり、また、Autoimmune cholangitis が独立した clinical entity として存在するかどうかについても疑問であることが示唆している。

遺伝的背景: 自己免疫性肝炎の疾患感受性遺伝子として、わが国では HLA-DR4 がよく知られているが、HLA-DR4 以外の疾患感受性遺伝子の存在も欧米から報告されている。わが国の自己免疫性肝疾患において CTLA4 の遺伝子多型が検討されたが、欧米からの報告された A49G の高頻度はわが国の自己免疫性肝炎、PBC 患者ではみられなかった。また、マイクロサテライト解析から HLA class III 領域の TNF α 遺伝子近傍にも自己免疫性肝炎の疾患感受性遺伝子の存在が示唆されたが、欧米の患者については、自己免疫性肝炎と TNF*2(-308A) との相関報告されたが、わが国の患者では観察されなかった。TNF α 遺伝子近傍にある I κ B λ 遺伝子多型についても検討されたが、自己免疫性肝炎との相関はみられなかった。HLA-DR4 以外の疾患感受性遺伝子の検索は今後も進める必要がある。

自己抗体: Carbonic anhydrase II (CA II) に対する抗体は Autoimmune cholangitis(AIC) を特徴づける自己

抗体と報告されている。しかし、CA II 抗体は、PBC、自己免疫性肝炎、原発性硬化性胆管炎でも高率に陽性であり、AIC 特異性は必ずしも高くなかった。しかし、AIC という疾患それ自体もその存在が疑問視されている。第 2 相薬物代謝酵素群の 1 つである GST A1-1 に対する自己抗体に関する検討がなされた。GST A1-1 抗体陽性自己免疫性肝炎は陰性例と比べ、発症年齢が若く、肝硬変への進展率が高く、予後不良を示唆する自己抗体であることが示された。

CpG DNA を adjuvant として肝蛋白でマウスを免疫すると、多くの自己抗体が産生される。その認識抗原のひとつは calreticulin であった。calreticulin 抗体は自己免疫性肝炎、PBC 患者の 40~60% に検出されており、calreticulin を CpG DNA と投与することにより肝炎が惹起されることから肝細胞障害に関わっている可能性も示された。

SLA/LP 抗体は自己免疫性肝炎にきわめて特異性の高い自己抗体とされているが、ELISA 法による測定では、わが国の肝疾患において自己免疫性肝炎における高い特異性は確認されたが、陽性率は低かった(5/75)。しかし、ELISA 法での測定では陽性率は低いとの報告もあり、今後に残された問題は多い。

動物モデルによる病態解析: β Gal-CYP2D6+LPS の C57BL/6 マウス腹腔内接種による自己免疫性肝炎モデルマウス作成の報告があった。ALT は接種後 2 週目にピークに達し、その後低下する。CYP2D6 に対するリンパ球幼若化反応、CYP2D6 抗体の産生がみられ、肝組織には門脈域への炎症細胞浸潤、小葉内の巣状壊死が観察された。制御性 T 細胞 CD25⁺ CD4⁺ T 細胞は ALT のピーク時には脾細胞、肝浸潤リンパ球いずれにおいても、その比率は低下し、時間の経過とともに回復した。MHC class II の差に由来する GVHR モデルマウスにおける肝病変も GVHR 導入後 2 週目にピークに達した後、8 週目には改善傾向を示し、肝線維化に至ることはない。このメカニズムについて、肝組織より抽出した total RNA をもちいたマイクロアレイにより制御性 T 細胞 CD25⁺ CD4⁺ T 細胞の特異的マーカーである IL-2 receptor α 鎖が GVHR マウスで 2 週目より発現することを示し、免疫学的寛容の再誘導が肝病変の改善に関わっていることを明らかにした。

Con A 誘発肝炎モデルマウスにおいて、Indomethacin 前投与が TNF α 、IFN γ 、IL-1 β 、MIP-2 の産生を促進し、肝細胞障害の増悪をもたらした。内因性 prostaglandin が病態発現に関わっていることを示唆するとともに、prostaglandin の肝障害軽減効果も期待される。また、Fucoidan が肝組織内 (Kupffer 細胞?) に IL-10 産生を誘導し、Con A 誘発肝炎に対して抑制効果を示すことが報告された。臨床応用が期待される。

肝細胞障害機序: AIH における肝細胞障害は抗体依存性細胞介在性細胞障害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) によるとされているが、

動物モデルを用いた研究では、細胞障害性T細胞(MHC拘束性?)の関与が示唆されている。臨床例の検討から、急性発症例では肝細胞障害発現に細胞障害性T細胞が関わっているとする報告があったが、残された問題も多い。免疫性肝障害モデルにおいては肝細胞障害の持続がみられない。この点については制御性T細胞の関与を示唆する報告もあった。

臨床病態:劇症型自己免疫性肝炎11例の臨床像について検討され、全例が女性で、亜急性型であった。5例は肝移植なしで生存し、予後判定には診断時のT/D比、T.Bilの推移が重要であった。

42例の複数回肝生検可能であった42例のAIH症例において、AIHの長期予後が検討され、組織学的改善、不変、悪化がそれぞれ66.7、23.8、9.5%であったことが報告された。また、AIHの急性発症例11例のうち発症時にAIHと診断されたのは4例に過ぎなかった。この理由としては組織学的にAIHと診断されても、IgGが低値であったり、抗核抗体が低力価であることがあり、臨床上AIHの特徴を備えていないことが原因であったとしている。

治療:維持療法においてAST、ALTを基準値上限の2倍以下に維持すればよいというAASLD practice guidelinesがある。しかし、基準値範囲に維持された群、基準値以上2倍以下の群、再燃群に分けて、組織学的所見(線維化、グ鞘炎、Interface hepatitis、小葉炎)の改善について検討したところ、基準値範囲に維持された群においてのみ有意の改善がみられた。したがって、AIH治療の臨床的目標としてはAST、ALTを基準値内に維持することが必要であると結論された。

自己免疫性肝炎における肝細胞癌発生例について臨床像の検討が行われたが、その全例が肝硬変への進展例でアザチオプリン使用例であった。アザチオプリン使用例については肝発癌に注意する必要がある。

自己免疫性肝炎に対するUDCAの臨床効果に関する試験研究を実施したが、検討に十分な症例が集積できず、中止せざるを得なかった。集積症例のみについてUDCAの効果を解析したが、有効性は確認できなかった。しかし、個別研究ではUDCAの有効例も報告され、UDCAの非定型自己免疫性肝炎に対する治療効果、特に組織所見改善が得られることが報告されている。

従来への検討に加え、現在明確な診断指針、治療法策等が確立されていない原発性硬化性胆管炎(PSC)に対する全国調査を開始した。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

原発性胆汁性肝硬変に関する研究

分担研究者 大西 三朗 高知大学大学院医学系消化器病態学 教授

原発性胆汁性肝硬変（PBC）分科会の研究課題は PBC の疫学調査、病因・病態の解明、これらに基づく、診断基準の改訂、新しい治療法の開発である。平成 14-16 年での成果を重要な順に述べる。

1) 診断基準の改訂

国民の健康福祉の向上に貢献する成果として、PBC の診断基準の改訂（症候性 PBC に該当する条件として、従来の黄疸、皮膚掻痒感に、腹水、肝性脳症、食道静脈瘤を加えた）により、平成 16 年度から、より多くの症候性 PBC 患者が難病指定の医療費公費負担の支給対象になったことは大きな福音である。

2) 新しい治療法の開発

班研究の最終年度に、PBC に対するベザフィブラート（BF）の試験研究の解析結果を纏めることが出来た。この試験研究は臨床研究-I（BF 単独療法と UDCA 単独療法の比較）、および臨床研究-II（UDCA 治療後、血清 Alp 値が基準値上限の 1.5 倍以上の症例での BF 併用療法と非併用療法の比較）より成る。臨床研究-I では BF 投与群が Alp 改善効果は優れ、UDCA 投与群が γ -GTP, ALT, AST, IgM の改善効果は優っていた。臨床研究-II では BF 併用療法で肝胆道酵素、IgM 値の更なる改善が認められた。併用投与による重篤な副作用は認められず、PBC の UDCA に対する難治例には、BF 併用が望ましいとの結論が出された。今後、併用療法の有効性を病理組織、および予後の改善について検討が必要である。

幕内分担研究者から、PBC の生体部分肝移植について移植適応の参考となる日本肝移植適応研究会モデルと Mayo モデルの比較成績と、肝右葉グラフト移植 32 例の予後が良い事が報告された。

3) 疫学調査

平成 15 年度末に第 12 回全国調査を実施し、調査結果は「疫学研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省告示第 2 号、平成 14 年 6 月付け）および「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取り扱いのためのガイドライン」（厚生労働省、平成 16 年 12 月付け）に則り、平成 16 年度末に個人情報管理システムの構築を済ませ、解析中（解析担当；廣原）である。今回の全国調査より、調査項目に肝細胞癌の発生の有無を加え、抗アポトーシス作用を有する UDCA 投与による肝細胞癌発生の減少を検証する事にした。

森研究協力者から医療費公費負担の症候性 PBC 6,527 例の個人調査票から膠原病の合併率はシェーグレン症候群 11.8%、RA 6.7%、慢性甲状腺炎 4.4%、強皮症 2.0%である事が報告された。

酒井研究協力者からは国立病院肝疾患政策医療ネットワークを利用した PBC 患者の臨床像についてデータベースの構築と、QOL の解析方法が示された。

大西分担研究者から、第 6-11 回全国調査に含まれる、無症候性 PBC 3,111 例の 3%が改訂診断基準の症候性 PBC（皮膚掻痒感、黄疸は認めないが、腹水、浮腫、肝性脳症、静脈瘤破裂などを認めた）に該当し、その予後が不良である事が報告された。改訂基準の妥当性を指示する成績である。また、PBC 85 例の家系調査で、6 家系に PBC の家族内発症（5.9%）を認め、同胞間では抗ミトコンドリア抗体（AMA）の対応抗原が同一で、発症に遺伝的要因または環境因子の関与を示唆する成績も報告された。

井廻研究協力者からは香川県の検診で、一般住民 620 人（男性 260 人、女性 360 人）の蛍光抗体法での AMA の陽性率は約 0.5%であり、過去の検出率（平成 12 年関東地区、平成 15 年関西地区）と同程度であり、地域差のないことが報告された。AMA のスクリーニングに ELISA 法（MESCU-2）を用いると、疑陽性が多い事も指摘された。

池田研究協力者からは首都圏の PBC 52 症例では、HLA DR B1*15, DRB1*08 の頻度が一般住民に比して有意に高い事が報告された。

小俣研究協力者は肝炎ウイルスに起因しない肝細胞癌 146 例（PBC 3 例を含む）を対象に臨床データの階層化クラスターリングによる背景因子の解析を行い、若年男性の大量飲酒者、高齢・肥満女性、高齢・中等度飲酒男性、その他の 4 群に分類されると報告した。

4) 病因・病態の解明

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルの検討では、小俣研究分担者から約 2,300 既知の遺伝子の cDNA のアレイで非 B 非 C 型肝炎では細胞接着、抗アポトーシス、細胞周期、細胞周期に関与する遺伝子群の特異的な発現が報告された。同様に大西研究分担者も PBC ではステロイド代謝酵素である 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase の疾患特異的な発現が認められたが、PBC6 例での治療前における肝組織を用いた比較では PBC の病態と関連すると考えられる遺伝子の変動は認めないと報告した。白鳥研究協力者もマイクロアレイを用いて、胆管上皮は特異的に発現する stromal derived factor 1(SDF-1) が種々の肝疾患で増強が認められ、肝内浸潤リンパ球には SDF-1 のレセプターである CXCR4 が高発現していることを報告した。

石橋研究協力者は以前より報告している PBC の免疫学的胆管傷害に関与する PDC-E2 特異的 T cell のついて解析を進め、T cell epitope は核膜抗原との molecular mimicry の認められること、PBC では補助刺激非依存性の CD4⁺T cell や CD28⁻, CD4⁺ T cell が末梢血と肝臓局所で増加しており、これらの細胞群は in vitro で PDC-E2 抗原ペプチドをパルスした標的細胞に障害性を示す事を示した。更に、PBC の胆管傷害の免疫学的制御法の開発を目指し、PDC-E2 特異的 T cell クローンとヒト培養胆管上皮細胞(BEC)を用いて、BEC の抗原提示細胞およびアクセサリー細胞機能を検討し、BEC は抑制性補助因子 (PD-L1, PD-L2) の発現および、prostaglandin-E2 の分泌を介して T 細胞の活性化を抑制する事を追加した。

中沼研究分担者は PBC の病態形成には胆管上皮に発現する Toll-like receptor 4 を介した自然免疫の関与すること、肝内小型胆管の消失と細胞老化形質の関連の研究を更に進め、PBC の障害胆管では Bmi-1 発現の低下に関連して、老化関連 p16^{INK4a} の発現低下を認め、かつマウス培養胆管細胞では SIRNA による発現の抑制により p16^{INK4a} の発現の亢進を認めた事から、PBC の胆管細胞の老化に Bmi-1 発現低下が関与する可能性を示した。

恩地研究協力者は老齢 C57BL/6 マウスで見られる PBC 様の胆管病変が poly I:C の投与で出現が早まり、かつ進行することを報告し、この胆管病変を免疫寛容性の樹状細胞で制御する試みも示した。早期に食道静脈瘤が出現する PBC 群 11 例の臨床的特徴を掻痒感を伴う s1-PBC11 と比較検討し、前者の予後が不良で発癌例が多い事を報告した。

宮川研究協力者は PBC の一部に検出される microsome 分画の 95-kDa に対する自己抗体の標的分子が p97/Valosine containing protein (VCP) と同一であることを免疫沈降法および nuclear envelope assembly の抑制効果により明らかにした。

向坂研究協力者はラット胆管結紮モデルと PBC 患者の肝生検材料を用いて、胆汁うっ滞における血清コレステロールの上昇には肝細胞の ABC A1 トランスポーターを介したコレステロールの排出増加に依る事を示した。

栗山研究協力者から PBC の病態と環境因子の関与の観点から、xenobiotics の代謝酵素である P450 遺伝子の SNP 解析を行い、CYP2E1 c1/c2 が PBC の重症度に関連する事を報告した。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

劇症肝炎に関する研究

分担研究者 藤原 研司 埼玉医科大学消化器・肝臓内科 教授

全体研究としては 2001～2003 年に発症した劇症肝炎、LOHF の全国調査を実施し、患者背景、成因、臨床所見及び予後に関して解析した。また、1998～2000 年の症例も加えて、最近の急性肝不全の実態と明らかにし、これを基に「劇症肝炎における診断基準の見直し」、「肝移植適応ガイドラインの有用性を再評価」を行なった。試験研究としては「HBV キャリアの急性増悪例に対する lamivudine 投与の有用性を検討する prospective study」を継続しており、「劇症化を阻止するための治療開始の指針」を提唱した。分担研究では、「急性肝炎重症型における劇症化予知作成」、「重症型アルコール性肝炎の全国集計」を多施設共同で実施している。また、劇症肝炎の病態、診断、治療に関する基礎的、臨床的検討も分担研究として多数報告された。

1. 劇症肝炎、LOHF の実態（全国調査、分担研究）

1998～2000 年に発症した劇症肝炎、LOHF の解析から、内科的治療による救命率は初発症状出現から昏睡Ⅱ度以上の肝性脳症出現までの期間が 10 日以内と 11 日以降および 8 週以内とそれ以降の 2 ポイントを境に、大きく異なることが明らかになった。従って、1981 年に犬山シンポジウムで設定された劇症肝炎の診断基準は最近の症例を対象にしても有用性が高いと考えられ、平成 14 年度には従来の基準に前年度に作成した「成因に関する診断基準」などを追記した「劇症肝炎の診断基準」を発表した。

平成 14～16 年度はそれぞれ 2001～2003 年に発症した劇症肝炎、LOHF に関する全国集計を実施し、計 329 例（劇症肝炎急性型 156 例、亜急性型 144 例、LOHF 29 例）が登録された。これに 1998～2000 年の発症例も加えた計 698 例（急性型 316 例、亜急性型 318 例、LOHF 64 例）を解析した結果、生活習慣病など基礎疾患を有する症例が増加しており、その大部分では薬物歴が認められることが明らかになった。また、成因はウイルス性 47%（A 型 6%、B 型 38%、その他 3%）、自己免疫性 7%、薬物性 10%、成因不明例 32% であり、急性型はウイルス性（71%）、亜急性型と LOHF は成因不明例（42%および 50%）が最多であることが判明した。

ウイルス性では、平成 14 年度以降に E 型国内固有株による劇症肝炎が北海道から計 3 例登録された。藤原分担研究者は肝炎等克服緊急対策事業「本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班との共同事業として、2000～2003 年に発症した劇症肝炎のうち、肝炎ウイルス感染の明らかでなかつ

た症例の保存血清を回収し、HEV-RNA の測定を実施したが、陽性であったのは北海道地区の 1 症例のみであった。この検討から、E 型は北海道以外の地域では、劇症肝炎の成因として頻度が低いものと推定された。

2. 劇症肝炎、LOHF の治療（全国調査、試験研究、分担研究）

1998～2003 年に発症した 698 例を対象とした検討から、劇症肝炎、LOHF の治療法としては、ラミブジンによる抗ウイルス療法と肝移植の実施頻度が増加しているが、特殊組成アミノ酸製剤と GI 療法は減少傾向にあることが明らかになった。また、2000 年以降の症例では、成因疾患に対する治療や肝庇護療法を昏睡出現前から実施する症例の頻度が増加していることも判明した。しかし、肝移植非実施症例における救命率は急性型 54%、亜急性型 24%、LOHF 12%で 1997 年以前と大差がなく、特に B 型キャリア例と自己免疫性例は病型を問わず予後不良であることが問題となっている。なお、2000 年以降の症例では、成因疾患に対する治療や肝庇護療法を昏睡出現前から実施する症例の頻度が増加してきている。一方、血漿交換などの人工肝補助療法も早期から実施する傾向が 2000 年ごろまでは認められていたが、2001 年以降はこれが一段落し、2002 年以降は昏睡出現日に開始する症例が増加している。

1) ラミブジン

全国集計では、2001 年以降は B 型キャリア症例の 90%以上でラミブジンが投与されているが、内科的治療による救命率の向上は認められない。試験研究では、B 型キャリア例における抗ウイルス療法の体系を確立するために、ラミブジンを投与した無症候性キャリアないし慢性肝炎の急性増悪例を対象とした prospective study を実施している。その解析から無症候性キャリアではプロトロンビン時間が 40%以上で、慢性肝炎では総ビリルビン濃度が 15 mg/dL 未満の段階でラミブジン投与を開始すれば、急性増悪例が高率に救命することが明らかになった。また、適切な時期に治療を開始した症例では HBV-DNA が高率に検出感度以下になったが、投薬の中断、YMDD 変異株や breakthrough hepatitis の出現率などは、通常の慢性肝炎と明らかな差異が認められない。現在、投与後 3 年までの長期予後に関する調査を継続中である。また、与芝分担研究員はラミブジン治療を実施した B 型慢性肝炎重症化例を対象に、肝における遺伝子発現を網羅的に解析しており、その成果がよ

り効果的な抗ウイルス療法の確立に繋がることが期待される。

2) 生体部分肝移植

1998～2003年に肝移植は計142例(20%)で実施されており、これら症例も含めた救命率は急性型56%、亜急性型39%、LOHF23%に達していた。生体部分肝移植の普及によって、急性肝不全の予後が向上しているのは明らかである。劇症肝炎における肝移植に関しては、幕内分担研究者が毎年成績を報告しているが、救命率は96%と極めて高く、全国調査の成績を上回るものであった。なお、2001年以降の症例では、昏睡出現から生体部分肝移植を実施するまでの日数が短縮するなど、肝移植の普及に伴って、内科的治療のあり方も変化している可能性がある。

6年間に登録された肝移植非実施556例を対象に肝移植適応ガイドライン(日本急性肝不全研究会、1996年)の有用性を検討すると、急性型は5日後の再評価を行ってもsensitivity(56%)、specificity(74%)ともに低率であり、正診率も66%に過ぎなかった。一方、亜急性型ではsensitivity(87%)は高率であるが、specificity(39%)が低率であり、正診率は78%であった。白鳥分担研究者は劇症肝炎の予後を規定する要因として、診断時には病因とSIRSの有無が、診断4日後以降は昏睡度が重要であることを報告した。藤原分担研究者は、全国調査に登録された症例を対象に、この指針の有用性を検討し、特に急性型においてSIRSを考慮することで予後予測の精度が向上する可能性を報告した。

3) 新規治療法

沖田分担研究者は骨髄細胞からの肝細胞への分化、増殖をGFP transgenic miceを用いて検討してきたが、これを応用して8例の肝硬変症例に対して「自己骨髄細胞を用いた肝再生療法」を実施した。術後には血清アルブミン濃度の上昇、ヒアルロン酸濃度の低下が認められたことを報告したが、有用性のみならず安全性に関して、今後も慎重に検討することが求められる。坪内分担研究員はHGFを用いた肝再生療法を確立する目的で、肝移植適応ガイドラインで死亡と予測される劇症肝炎を対象とした医師主導型の治療研究を予定しており、その準備状況を報告した。また、森脇分担研究員はTNF受容体を介する細胞死のシグナルを、NF- κ B、IL-8などとの関連で検討している。一方、渡辺分担研究員は樹状細胞が抗原を提示する際に必要な補助シグナルを抑制するCTLA-4Igは、マウスモデルにおける肝障害を軽減することを報告した。これら基礎的な検討も新規治療法に繋がることを期待される。

3. 肝炎劇症化の予知(分担研究)

鈴木分担研究者は前年度まではプロトロンビン時間が40%以下を呈する急性肝炎重症型における劇症化の予知に関する研究を進めてきた。しかし、劇症化阻止を目指した治療を十分実施するためには、より早期での予知が必要である。そこで、全国17

施設からプロトロンビン時間が80%以下を示した急性肝炎259例を集計し、その予後に関する検討を行った。これら症例の劇症化率は20%で、予後を規定する要因としては年齢、総ビリルビン、プロトロンビン時間および成因が抽出された。これら因子とともに、CT検査による肝萎縮度(肝容量/標準肝容量)を評価することで、早期での劇症化予知が可能であることを報告しており、今後はこの新たなシステムによる予知システムをprospectiveに検証することが課題である。

藤原分担研究者はTh1免疫応答の開始に必須のサイトカインであるオステオポンチンのプロモーター領域の遺伝子解析を行い、nt-443のSNPが肝炎の重症度を規定する可能性があることを報告した。また、坪内分担研究者はイムノクロマト法を用いて迅速で簡便なHGF測定キットを開発し、ベットサイドで血清HGF濃度を半定量的に評価することを可能にした。このキットに関しては、プロトロンビン時間80%以下を示す急性肝炎症例を対象に、全国規模で劇症化予知における有用性を評価する検討が進められている。一方、与芝分担研究者はラット障害肝における各種蛋白のmRNA発現を比較検討し、肝炎劇症化の予知に際して有用な検査指標を探求している。

4. 重症型アルコール性肝炎の全国調査(分担研究)

石井分担研究者は劇症肝炎と病態の類似した重症型アルコール性肝炎の全国集計を実施している。1998～2003年に発症した90症例を対象に解析を行い、救命率は33%と低率で、予後は現在でも不良であることが確認された。治療としては、血漿交換、血液濾過透析および白血球除去療法などが実施されているが、その適応や集学的治療の体系を確立することが今後の課題である。