

表4 非再燃例と再燃例別にみた寛解期肝組織所見と
その後の治療内容と再燃状況

非再燃例

生検時PSL	線維化	グ顆炎	Interface h.	小葉炎	その後のPSL	再燃までの期間	生検後 観察期間	再燃時 ALT
10 mg	0	0	0	0	5 mg		16 M	
10	0	0	0	0	5		13	
5	2	2	2	0	5		38	
5	1	1	0	0	5		38	
2.5	2	1	1	1	中止		27 (中止後 26)	
2.5	1	1	0	0	中止		36 (中止後 32)	
5	1	2	1	1	2.5 隔日		38	
2.5 隔日	1	0	0	1	2.5 隔日		56	
2.5	1	0	0	0	2.5		11	

再燃例

15 mg	1	1	0	1	5 mg	61 M	206 M	117
5	1	1	1	1	5 → 中止	6 (中止後 6)	28	734
5	1	2	0	1	5	84	105	83
7.5	1	0	0	0	7.5	137	211	740
7.5	1	1	0	0	5	2	8	65
5	1	1	1	1	2.5 → 中止	8 (中止後 4)	30	363
5	1	2	1	1	3 → 中止	38 (中止後 3)	38	71
5	1	1	1	1	5	4	66	101
5	1	0	0	0	2.5	21	24	72

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

UDCA治療を受けた自己免疫性肝炎患者の追跡調査

研究協力者 森實 敏夫 神奈川歯科大学附属病院 内科 教授

研究要旨：本研究班で2000年より施行した自己免疫性肝炎を対象としたウルソデオキシコール酸（UDCA）の有効性を解析したランダム化比較試験登録症例の登録後2年目の状態について追跡調査を行った。初発例で軽度肝障害例（血清AST正常上限5倍以下）では初期治療としてUDCA600mg/日を開始し、それを維持してもほとんどの例（86%，95%CI 60-100%）で2年後の肝機能は正常であった。プレドニゾロン（PSL）10mg/日で肝機能正常例で、PSL 5 mg/日+UDCA600mg/日に変更した例は、同療法で2年後ほとんどの例（83%，95%CI 54-100%）で肝機能正常であった。同時に行った、本研究班の研究者全員を対象とした、アンケート調査でUDCA療法に関するエキスパートの経験およびオピニオンを解析した。これらエキスパートの経験をまとめると：自己免疫性肝炎の14%がUDCA単独療法、25%がPSL+UDCA併用療法で治療されていた。UDCA単独療法、あるいはPSLにUDCAを併用した結果、肝炎が沈静化した例の経験が前者で9/20、後者で3/19あることが明らかとなった。有効率は前者で34%、後者で44%であった。エキスパートオピニオンをまとめると：UDCA療法は次の場合試みる価値がある。1）軽度肝障害例（初期治療から可）、2）ステロイドの副作用がある場合、3）患者がステロイドを希望しない場合、4）ステロイドを減量して効果を補う目的で併用する場合。

今後、プラセボを対照としたランダム化比較試験でUDCAが自己免疫性肝炎において肝炎の沈静化に有効であることが証明されれば、これらエキスパートオピニオンは正当化される可能性が高いと考えられる。

共同研究者

柴田 実 NTT東日本関東病院 消化器内科

A. 研究目的

本研究班で2000年より、血清AST値が基準値上限5倍未満の自己免疫性肝炎患者を対象としUDCA600mg/日およびプラセボを比較したランダム化比較試験（臨床研究I）とPSL10mg/日で血清AST値が6ヶ月以上基準値以内の症例を対象としたPSL 10mg/日とPSL 5 mg/日+UDCA600mg/日の併用療法を比較したランダム化比較試験（臨床研究II）を行った。これら臨床試験に登録された症例のその後の治療法と肝機能成績について、追跡調査を行い、UDCAの自己免疫性肝炎に対する有効性を明らかにすることを目的とした。

さらに、現在診療中の自己免疫性肝炎症例について、治療法とその効果について、また、自己免疫性肝炎に対するUDCA療法に対するエキスパート・オピニオンを明らかにする目的で、本研究班の研究者にアンケート調査を行った。

B. 研究方法

臨床研究Iおよび臨床研究IIで症例登録のあった、施設の担当医に対して、Web上においたフォームのURLをメールで通知し、登録1年後および2年後の治療法と肝機能の正常化の有無について、フォームを利用して送信を依頼した。これらフォームは症例ごとに作成し、ユーザIDとパスワードで保護された神奈川歯科大学Webサーバーに置いた。返信されるメールには、患者の個人情報保護のため、登録時の番号と

調査項目の結果と、担当医の意見のみを含むようにした。

現在、受診中の自己免疫性肝炎症例の治療法別の人数、UDCA適用理由、UDCA開始時期、UDCA単独療法で肝炎が沈静化した症例の経験の有無と、症例数、PSLにUDCAを追加して肝炎が沈静化した症例の経験の有無と症例数、UDCA療法に対する考えについて、同様にフォームを作成した。このフォームを神奈川歯科大学Webサーバーに置き、そのURLをメールにて、本研究班の研究社に送信し、各自、ブラウザで閲覧し、入力および、項目選択をして、返信をもらった。

C. 研究結果

追跡調査

臨床研究Iの登録症例中、UDCA600mg/日4例、プラセボ6例、計10例であったが、8週後の血清AST正常化をエンドポイントとして、治療企図解析の結果、前者で25%、後者で33%の有効率であった。これら10例中、2年後のデータが得られた8例中5例でUDCA600mg/日の単独療法が行われており、全例肝機能は正常であった。残り3例中1例はPSL+UDCA併用治療を受けており、肝機能は正常範囲であった。残り2例はいずれも無治療で、その1例は2年後の時点で、肝機能正常、1例は2年後異常であったが直後に正常化していた。従って、登録時、血清AST値が基準値上限5倍未満の軽度肝障害の自己免疫性肝炎は2年後、80%の症例でUDCA単独療法で肝機能正常化しており、25%は無治療で、12.5%はPSL+UDCA併用療法で正常化していた（図1）。

臨床研究Ⅱの登録症例は、PSL10mg/日持続群（A群、9例）と、PSL 5mg/日+UDCA600mg/日（B群、10例）であったが、48週後の血清AST値正常化をエンドポイントとした有効率は、それぞれ、56%と70%であった。これら19例中16例で2年後のデータが得られた。6例のB群では2年後、5例で併用療法が続けられており、全例が肝機能正常であった。残り、1例ではPSL単独療法に変更されており、肝機能は正常化していた。なお、これら6例中2例は、1年後の時点では、肝機能が異常であった。A群の10例については2年後、6例がPSL単独療法を受けており、1例は無治療であったが、全例肝機能は正常であった。残り3例は2年後の経過が不明であった。従って、PSL 5mg/日+UDCA600mg/日の併用療法を受けた例の83%で2年後併用療法が続けられており、肝機能が正常の状態が保たれていた。

エキスパートの経験とオピニオン

現在治療中のAIH患者治療別割合は、表1に示すごとく、計437例中、UDCA単独療法を受けている症例が63例（14%）、PSL+UDCA併用療法を受けている症例が111例（25%）あり、UDCA療法を受けている自己免疫性肝炎患者の割合は、39%を占めていた。PSL単独療法は204例（47%）、その他少数例がアザチオプリンの投与を単独あるいは併用療法として受けていた。従って、UDCAは自己免疫性肝炎症例のほぼ半分の症例に投与されている。

UDCAを用いる理由としては、23名のエキスパートの内15名が「軽度肝障害のため」と述べており、その他、「ステロイド減量時のリバウンドを避けるため」、「診断が明確でなかったため」、「患者がステロイドを希望しなかったため」、「ステロイドの合併症のため」、「ステロイド大きな減量あるいは維持の代替として」、「初診時からUDCAでコントロールされているから」、「胆道系酵素の上昇あるいは黄疸があるから」、「PSLを中止したいため」といった意見が述べられていた。

UDCA投与開始時期については、PSL漸減時が14名、治療開始時から12名、PSL中断時から7名、PSL治療で難治のときが6名、AST/ALTの上昇時が1名であった。従って、多くのエキスパートがステロイドとは異なる作用機序で、自己免疫性肝炎の肝炎を沈静化させる効果を期待しているものと考えられる。

UDCA単独療法で肝炎が沈静化した自己免疫性肝炎の経験があるかどうかについて尋ねたところ、「ある」との回答が9名、「ない」との回答が11名であった。「ある」との回答を出されたエキスパートの経験した症例は54例で内23例で有効であった。「ない」との回答を出されたエキスパートでは14例経験し、有効例が0例ということであった。従って、合計すると、UDCA単独療法が試みられた68例中23例（34%）でUDCAが有効であったことになる。

PSLにUDCAを追加して肝炎が沈静化した自己免疫性肝炎が経験があるかどうかについてたずねたところ、「ある」との回答が3名、「ない」との回答が16

名で、あるとの回答では、18例中12例で有効であった。ないとの回答では9例中0例で有効ということで、合計して、27例中12例（44%）でPSLにUDCAを追加して肝炎が沈静化したことになる。

自己免疫性肝炎に対するUDCA療法に関する考えを尋ねたところ、以下のようなオピニオンが得られた（カッコ内は人数）。

- 軽症例に行うべき。（16）
- ステロイドの副作用がある場合。（14）
- 患者がステロイドを希望しない場合。（9）
- ステロイド維持量の更なる減量の際に併用する。（4）
- 再燃例のみ。（2）
- 寛解維持療法として。（1）
- 必須の治療法である。（1）
- PSLのみで正常化しない場合追加すべき。（1）
- トランスアミナーゼが正常化すれば、UDCAのみでも可。（1）
- ステロイド中止後に用いる。（1）
- 軽度の再燃時にPSL増量が難しいとき、UDCAを併用する。（1）
- AIH診断が曖昧で、軽症のとき単独で用いる。（1）
- 組織所見とASTともに軽症の場合。（1）
- PBCとのOverlapでは原則として行う。（1）
- 小児AIHでは、単独ではコントロールできるとは考えにくいので、肝生検でInterface hepatitisなどの炎症所見が乏しく、線維化もF0もしくはF1程度のときに使用すべき。進行しているようであれば、ステロイド療法に踏み切るべき。（1）

D. 考 察

免疫抑制療法は高頻度に副作用が認められるため、自己免疫性肝炎の全てが免疫抑制療法の適応ではない。国際的な自己免疫性肝炎の治療基準では、血清AST値が正常値上限の10倍以上あるいは血清AST値が正常値上限の5倍以上でかつ γ -グロブリン値が正常値上限の2倍が免疫抑制薬の絶対適応とされている¹。なお、肝組織所見で炎症反応が軽度で臨床症状に乏しい自己免疫性肝炎は免疫抑制薬を投与すべきでない²とされている。

Mimaらはプレドニゾン療法で寛解導入が不成功であった自己免疫性肝炎4例にUDCA600mg/日を併用投与し、4例で血清ALT値の正常化およびプレドニゾン投与量の減量が行えたと報告した³。さらに、Nakamuraらは自己免疫性肝炎8例にUDCA600mg/日の単独治療を行い、8例中7例（87.5%）で血清ALT値が正常化し、副作用が認められなかったと報告した⁴。UDCAはプレドニゾンとの併用療法あるいは単独療法で、プレドニゾン療法に抵抗性のあるいは軽症～中等症の自己免疫性肝炎に対する有用性が示唆されている。

本班会議において施行した自己免疫性肝炎を対象としたUDCAの有効性を証明することを目的としたランダム化比較試験は、登録症例数が予定症例数に達せ

ず、確実な結論を出すことができなかった⁵。今回の調査からは、医療現場でUDCAが自己免疫性肝炎の多くの例で使用され、肝炎が沈静化し、それが維持されていると考えられた。したがって、今後、プラセボを対照としたランダム化比較試験でUDCAが自己免疫性肝炎において肝炎の沈静化に有効であることが証明されれば、これらエキスパートオピニオンは正当化される可能性が高いと考えられる。

E. 結 論

- 1) 自己免疫性肝炎の内、血清AST値が正常上限5倍以下の軽度肝障害例では、UDCA600mg/日の単独投与で、2年後も肝機能が正常に保たれている例が多かった。
- 2) PSL10mg/日で肝機能が正常化し、6ヶ月以上維持されている例で、PSL 5 mg/日+UDCA600mg/日に変更した場合、2年後にほとんどの例で同療法が続けられ、肝機能正常化が維持されていた。
- 3) エキスパートの経験からは、自己免疫性肝炎の約半数例でUDCA単独、あるいはPSLとの併用でUDCAが使用されていた。
- 4) エキスパートオピニオンとして、UDCA治療は、軽症例に行うべき、ステロイドの副作用がある場合、患者がステロイドを希望しない場合、ステロイド維持量の更なる減量の際に併用する、という意見が多かった。

現状では、UDCAの自己免疫性肝炎に対する有効性についてのエビデンスがないまま、医療現場で用いられており、今後は、プラセボを対照としたランダム化比較試験でUDCAが自己免疫性肝炎において肝炎の沈静化に有効であることが証明されることが望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図1. 臨床研究IおよびII登録症例の追跡調査結果

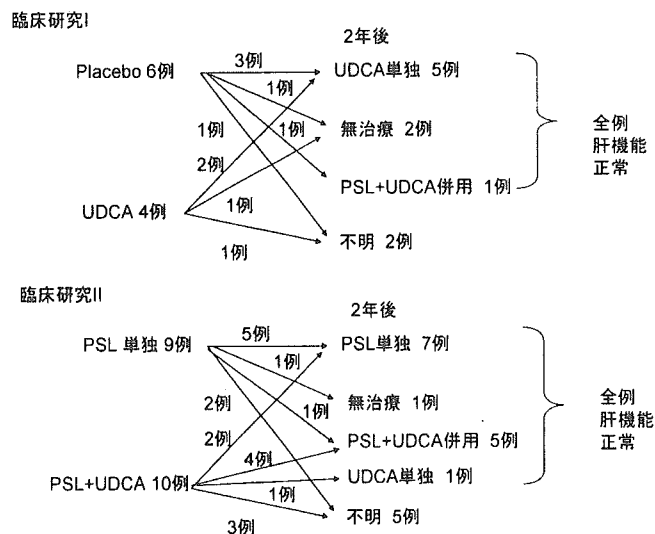


表1. 現在治療中のAIH患者治療法別割合

治 療 法	症例数	%
P S L 単独治療	204	47%
アザチオプリン単独治療	3	0.6%
PSL+A Z P併用治療	46	11%
UDCA単独治療	63	14%
PSL+UDCA併用	111	25%
PSL+A Z P+UDCA併用	7	2%
その他の治療	4	1%

(参考文献)

- 1) Czaja AJ: Autoimmune hepatitis. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology / diagnosis / management. Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH (eds), 6th ed. P1265-1274, 1998.
- 2) Krawitt EL: Autoimmune hepatitis. N Engl J Med 334: 897-903, 1996.
- 3) Mima S, Sekiya C, Kanagawa H, Uchida T: Ursodeoxycholic acid (UDCA) therapy for autoimmune hepatitis. Int Hepatol Commun 2 (4): 207-212, 1994.
- 4) Nakamura K, Yoneda M, Yokohama S et al: Efficacy of ursodeoxycholic acid in Japanese patients with type 1 autoimmune hepatitis. J Gastroenterol Hepatol 13: 490-495, 1998.
- 5) 厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業「難治性の肝疾患に関する研究班」平成16年度研究報告書「自己免疫性肝炎におけるウルソデオキシコール酸の有効性に関するランダム化比較試験」主任研究者 戸田剛太郎.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝疾患における可溶性CD1d分子遺伝子発現動態の解析

研究協力者 銭谷 幹男 東京慈恵会医科大学 消化器・肝臓内科 助教授

研究要旨：自己免疫性肝疾患における，NKT細胞を活性化するCD1d分子V1，V2バリエーション遺伝子発現を解析したところ，膜結合型V1遺伝子発現量は健常人と差がなく，可溶性V2遺伝子発現量は健常人に比し有意に低下していた。AIHではV2遺伝子低発現群は高発現群に比しAIH，IgGが高く，肝内NKT遺伝子陰性例は陽性例に比しV2遺伝子発現量が有意に低かった。AIHでは可溶性CD1d分子の遺伝子発現低下と肝内NKT細胞減少，高い疾患活動性との関連がみられ，可溶性CD1d分子の動態が病態に関わる可能性が示された。

共同研究者

高橋 宏樹 東京慈恵会医科大学 消化器・肝臓内科 講師

A. 研究目的

種々の自己免疫疾患でのNKT細胞減少が報告され，我々も自己免疫性肝炎（AIH），原発性胆汁性肝硬変（PBC）の約半数の症例の肝内におけるNKT細胞特異的T細胞受容体V α 24-J α Q遺伝子の発現低下を示したが，その減少機序は不明である。近年，NKT細胞を活性化するCD1d分子にexon 4を欠くV1バリエーション（ β 2m欠損型），exon 4，5を欠くV2バリエーション（可溶性）が存在することが明らかにされ，それらバリエーションは抗原結合部位exon2，3が保存されているためNKT細胞活性化機能を有することが示されている。さらに興味深いことに，慢性関節リウマチでは健常人に比しV2バリエーション遺伝子の発現低下がみられ，NKT細胞減少との関連が報告されている。そこでAIH，PBCにおけるCD1d分子のV1，V2バリエーション遺伝子発現を定量的に解析し，臨床像，NKT細胞減少との関連を検討した。

B. 研究方法

同意を得たAIH44例，PBC97例，健常人103例の末梢血単核球からcDNAを得て特異的プライマー，TaqManプローブを用いたTaqMan PCR法によりV1，V2遺伝子発現量を解析し，臨床像との関連を検討した。一部の症例では生検肝組織より抽出したRNAを用いcDNAを合成後，V α 24特異的センス，C α 特異的アンチセンスプライマーを用いPCRを施行，ポリアクリルアミド電気泳動にてV α 24遺伝子断片を検出した。さらにPCR産物を用いV α 24特異的センス，J α Q特異的アンチセンスプライマーを用いたPCRを施行し，V α 24J α Q遺伝子断片を検出した。統計学的検討はCochran-cox検定により行った。

C. 研究結果

- 1) AIH，PBCと健常人の，膜結合型V1バリエーション遺伝子発現量は差がなかった。
- 2) 健常人（ 1.18 ± 1.70 ）に比し，AIH，PBCでは可

溶性V2バリエーション遺伝子発現量が有意に低下していた。（ 0.72 ± 1.11 ， 0.74 ± 0.39 ； $P < 0.05$ ， 0.01 ）

3) AIHでは

- V2バリエーション遺伝子低発現群は高発現群に比し，ALT，IgG，抗核抗体価が高い傾向を認めた。（ALT： 437.0 ± 406.7 vs 245.5 ± 159.8 IU/l，IgG/ 2853 ± 873 vs 1585 ± 493 mg/dl，320倍以上/ 62.5% vs 20% ）
- 肝内Va24JaQ遺伝子断片陰性群では陽性群に比し，ALT，IgG，抗核抗体価が高い傾向を認め，V2バリエーション遺伝子発現量が有意に低下していた。（ 0.71 ± 0.32 vs 0.24 ± 0.30 ， $p < 0.05$ ）

4) PBCでは，V2バリエーション遺伝子発現量と活動性の関連はなかった。

D. 考察

今回の検討により，自己免疫性肝疾患では健常人に比し可溶性CD1d分子の遺伝子発現量が低下しており，特にAIHでは，可溶性CD1d分子の遺伝子発現低下と肝内NKT細胞減少，高い疾患活動性との関連がみられ，可溶性CD1d分子の動態が病態に関わる可能性が示された。

V2バリエーション遺伝子から翻訳される可溶性CD1d分子がNKT細胞活性化作用を有し，自己免疫性肝疾患では何らかの機序によりその発現が抑制されているためにNKT細胞の活性化が起こらず，特にAIHではその病態形成に関わっている可能性が考えられる。

今後は，血中の可溶性CD1d分子を同定する方法論を確立し，自己免疫性肝疾患における可溶性CD1d分子の減少をタンパクレベルで確認するとともに，可溶性CD1d分子の機能に関する詳細な検討が必要と考えられる。

E. 結論

自己免疫性肝疾患では健常人に比し可溶性CD1d分子の遺伝子発現量が低下しており，特にAIHでは，可溶性CD1d分子の遺伝子発現低下と肝内NKT細胞減少，高い疾患活動性との関連がみられ，可溶性CD1d分子の動態が病態に関わる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

平成18年度日本肝臓学会総会にて発表予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝炎の進展に関与する因子の解析

研究協力者 白鳥 康史 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科 教授

研究要旨：本研究の目的は、自己免疫性肝炎の長期予後と長期予後に寄与する因子を明らかにすることである。対象は1988年11月から2001年6月までに当科および関連施設で組織学的に自己免疫性肝炎と診断された99例。経過中に30例が脱落し、残りの69例中1例が肝不全死し、3例で肝発癌が認められた。また、肝発癌3例中2例が肝癌死した。69例における10年生存率は98%、肝発癌率は7%/10yrと長期予後は良好であった。死亡例または肝発癌例では経過中のプレドニゾロン維持量が多いにも関わらずALT値が高値であり、治療抵抗性が自己免疫性肝炎の長期予後と関連していると考えられた。

共同研究者

三宅 康広 岡山大学大学院 消化器・肝臓・感染症内科学
岩崎 良章 岡山大学大学院 消化器・肝臓・感染症内科学
小橋 春彦 岡山大学大学院 消化器・肝臓・感染症内科学
坂口 孝作 岡山大学大学院 消化器・肝臓・感染症内科学

A. 研究目的

自己免疫性肝炎（以下、AIH）例の長期予後については、肝硬変症例であっても適切な治療が行われれば10年生存率90%以上と良好であることが海外より報告されている¹。しかし、わが国におけるAIH例の長期予後については不明な点が多い。また、近年、AIH例からの肝発癌例も増加傾向にある²。本年度は本邦におけるAIH例の長期予後と長期予後に寄与する因子を明らかにすべく検討を行った。

B. 研究方法

1988年11月より2001年6月までに当科および関連施設で組織学的にAIHと診断された99例においてコホート研究を行った。うち、30例が経過中に脱落し、解析対象は69例となった。

エンドポイントは各症例における重大事象発現日（肝発癌または患者死亡）。なお、2005年6月30日をもって打ち切りとした。

C. 研究結果

69例の臨床像は、年齢54歳（16-79）、女性が62例（90%）、AIH国際診断基準³で確診56例（81%）、疑診13例（19%）であり、急性発症19例（28%）、他の自己免疫性疾患の合併が20例（29%）であった。また、生検組織では4例（6%）が肝硬変であった。

初期治療は、59例でプレドニゾロン（以下、PSL）が使用され10例でウルソデオキシコール酸（以下、UDCA）単独治療が行われた。しかし、UDCA単独投与の行われた10例中4例では経過中にPSL投与が行われた。

観察期間は中央値96ヶ月（49-201）であり、経過中に1例が肝不全死し3例に肝発癌が認められた。また、肝発癌3例中2例が肝癌死した。69例における10年生

存率は98%、肝発癌率は7%/10yrと長期予後は良好であった。

経過中に重大事象の認められた4例と他の65例を比較すると、AIH診断時における臨床増やPSL開始量、経過中における再燃や急性増悪の頻度に差は認められなかったが、4例では経過中のPSL維持量が多い {10 (8-10) vs. 5 (0-15); P = 0.005} にもかかわらず経過中のALT値が高値で推移していた（図1）。

次に、AIH診断時の肝線維化がF3-4であった29例において同様の解析を行った。観察期間は109ヶ月（52-201）であり、経過中に29例中3例で肝発癌が認められ2例が肝癌死した。

経過中に肝発癌の認められた3例と他の26例を比較すると、AIH診断時における臨床像やPSL開始量、経過中における再燃や急性増悪の頻度に差は認められなかったが、肝発癌を認めた3例ではやはり経過中のPSL維持量が多い {10 (10-10) vs. 5 (0-15); P=0.02} にもかかわらず経過中のALT値が高値で推移していた（図2）。

D. 考察

今回の研究では、本邦におけるAIH例でも長期予後が良好であることが示された。しかし、少数ではあるが肝不全死亡例や肝発癌例も認められた。最近、我々はAIH症例における肝不全の発症にはAIH診断時の因子よりも治療経過中のALT値の推移が重要であることを時間依存型解析によって明らかにした⁴。今回の研究においても経過中のALT値が重大事象発現例で高値であった。しかし、重大事象発現例では他の症例に比べて経過中のPSL維持量も多かったことより、AIH例の予後にはPSL治療への抵抗性が大きく関与していると考えられた。

以前より、AIH例における肝発癌因子の一つとしてアザチオプリンの使用が挙げられてきた。しかし、AIH例におけるアザチオプリンの使用はPSLの副作用軽減のためにも広く推奨されている⁵。また、今回の研究でも肝発癌例ではアザチオプリンは使用されていなかった。よって、アザチオプリンの使用がAIH例における重要な肝発癌因子とは考えにくい。

UDCAのAIHにおける予後改善効果については不明な点が多い。今回の研究では6例でUDCA単独治療が行われたが、重大事象は認められなかった。これは、6例の経過中におけるALT値がほとんど正常範囲内にあったためと考えられる。UDCA単独治療でも持続的なALT値の正常化が得られれば長期予後が良好である可能性が示唆された。

E. 結論

本邦におけるAIH症例の長期予後は良好であった。しかし、少数例では肝不全死や肝発癌がみられており、これにはPSL治療への抵抗性に伴うALT値の持続高値が寄与していると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

(参考文献)

- 1) Roberts SK, Therneau TM, Czaja AJ. Prognosis of histological cirrhosis in type 1 autoimmune hepatitis. Gastroenterology 1996 Mar; 110: 848-857.
- 2) Miyake Y, Sakaguchi K, Tanaka H, et al. Development of hepatocellular carcinoma in a woman with HBV- and HCV-negative autoimmune hepatitis with unsatisfactory response to Corticosteroid. Intern Med 2005; 44: 949-953.
- 3) Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J hepatol 1999; 31: 929-938.
- 4) Miyake Y, Iwasaki Y, Terada R, et al. Persistent normalization of serum alanine aminotransferase levels improves the prognosis of type 1 autoimmune hepatitis. J Hepatol 2005; 43: 951-957.
- 5) Czaja AJ, Freese DK; American Association for the Study of Liver Disease. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. Hepatology 2002; 36: 479-497.

図1 AIH69例における重大事象有無別の経過中ALT値

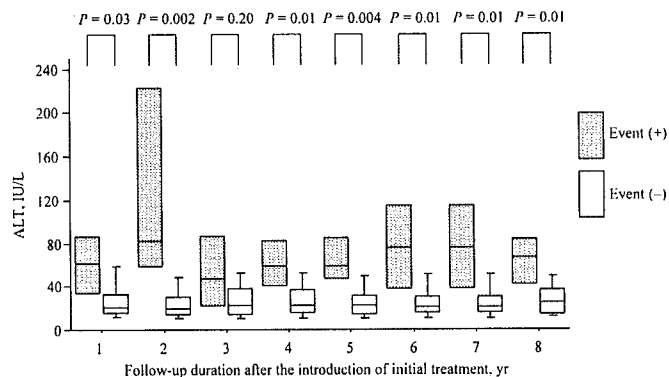
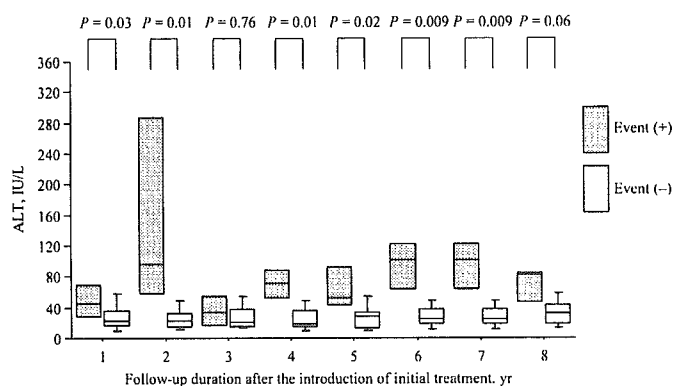


図2 F3-4 29例における重大事象有無別の経過中ALT値



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝炎に対する免疫抑制療法の至適量に関する検討

研究協力者 鈴木 義之 虎の門病院 臨床検査部 副部長

研究要旨：自己免疫性肝炎（Autoimmune hepatitis：AIH）は免疫抑制療法を行うことで組織学的改善が得られ、肝臓に関する限りは長期予後の向上が望まれる。しかしながら、長期に亘る免疫抑制剤の使用は様々な副作用や合併症のriskを高め、患者のQOLも損ねていることは無視できない事実である。現在、第一選択としてステロイドが使用されているものの、未だその適正な量を規定する指標が無く、経験に頼った治療が行われている。このような現状を少しでも打破するため、宿主の免疫学的パラメーターを測定し、かつ組織学的変化をみることでより有効な治療法を設定することを今年度のテーマとした。組織学的変化や治療反応性をみるためには、単年度での結果のみでは困難でありまだ途上ではあるが、アポトーシスのマーカーであるcytochrome Cが肝障害の程度をよりよく反映し、治療効果の指標となりえる可能性を見出した。そこで、我々は1999年に新しく提唱されたscoring systemによりdefinite AIHと診断された症例を対象とし、retrospectiveではあるがこのマーカーにつき検討した。

A. 研究目的

AIHに対する免疫抑制療法の至適量を設定するためには治療反応性の評価が必要となる。このため、昨年度までに、我々は自己免疫性肝炎として経過観察中であった症例の肝組織を再度採取し、組織学的変化につき検討を行ってきた。その組織学的変化をもとに、治療反応性により免疫抑制剤の量が適正であったかどうかを判断し、その量を決定するための肝生検以外のパラメーターを見出すことを目的とした。

B. 研究方法

対象は、2005年12月現在当院外来通院中で経過観察を継続していることを確認しえたAIH症例60例で、いずれも組織学的検索を施行している症例を対象とした。このうち、42例につき複数回の肝生検を行いその組織学的変化を検討しており、改善、不変、悪化の三群に分けて以後の検討対象とした。

また、抗核抗体は間接蛍光抗体法（Hep-2細胞）、抗平滑筋抗体は間接蛍光抗体法、抗LKM1抗体は蛍光抗体法、HBs抗原はRIA法、HCV抗体はEIA（第3世代）、HCV-RNAはRT-PCR法、HLA typingは血清学的方法（判定困難な場合PCR-MPH法）を用いて測定した。また、治療経過中のパラメーターとして、保存血清を用いてTNF- α 、soluble Fas、Fasligand、cytochrome Cを測定した。

C. 研究結果

42例の組織学的変化は、改善28例（66.7%）、不変10例（23.8%）、悪化4例（9.5%）であり、免疫抑制療法が奏功している症例では、組織学的に改善が認められた。HLAを検索し得た症例において、治療反応性と組織学的変化の関連をみると、DR 8をもっている症例の治療反応性が最も悪く、DR14を有している症例は治療反応性、組織学的改善度とも良好であった。各種免疫学的パラメーターの中では、肝酵素との相関

が最も認められたものはcytochrome Cであった。また、経時的に測定したパラメーターをみるとcytochrome Cが免疫抑制療法により抑えられている症例ではたとえ肝酵素が若干高値でも組織学的には改善がみられ、炎症も消退していた。

D. 考 察

AIHの長期にわたる組織学的変化を検討したが、免疫抑制療法を充分に行っている症例においては、組織学的改善が認められその予後は他の慢性肝疾患に比べ良好であると思われる。HLAの違いにより今後は免疫抑制療法の漸減法や治療開始のタイミング等が今後検討されるべきと考える。

昨年までの我々の検討では、AIHも急性期においてはCTLを介した肝細胞障害が主体であり、障害が進むにつれADCCに主体が移っていく可能性を示した。このことは、急性発症例においては発症期に高 γ -glob.血症や抗核抗体などの免疫応答がまだ揃わないという現象からも推察できる。肝細胞障害発症の当初はCTL-MHC class1を介した系がまず働き急激な障害が進み、この後、helper T cell-MHC class2を介した系により自己免疫性肝炎としての様相を整えていき、その後の病態形成には、regulatory T cellやTh1/Th2のバランスが大きく関わってくるのではないかと推察される。これまでの検討に加えてさらにアポトーシスのマーカーの検討を行ったことで、より病態を把握するための材料がそろったと考える。

E. 結 論

今回の我々の検討では、免疫抑制療法の奏功している症例では組織学的変化も良好であり、cytochrome Cがその指標となる可能性が示された。今後はさらに症例数を増やすこと、組織学的変化、治療の反応性とcytochrome Cとの関わりにつきprospectiveな研究を行っていきたいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki Y, Kobayashi M, Hosaka T, et al : Clinical and pathological characteristics of the autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis overlap syndrome. J Gastroenterol 19(6) : 699-706, 2004.
- 2) Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, et al : Peripheral CD8⁺/CD25⁺ lymphocytes may be implicated in hepatocellular injuries in patients with acute-onset autoimmune hepatitis. J Gastroenterol Hepatol 39(7) : 649-653, 2004.
- 3) 鈴木義之, 池田健次, 斎藤聡, 他 : 自己免疫性肝炎(AIH)の病態とHLA-DR抗原についての解析. 消化器と免疫 35 : 188-190, 1998.
- 4) 鈴木義之, 熊田博光 : 自己免疫性肝炎 (Autoimmune hepatitis : AIH) の長期予後. 朝倉均, 中沢三郎編, ミレニアム消化器2000, 日本メディカルセンター, 東京, 200-203, 2001.
- 5) 鈴木義之 : 自己免疫性肝疾患. year note 2003, 183-194, 2003.
- 6) 鈴木義之 : 自己免疫性肝疾患の経過中overlap症候群へと変化した症例の検討. 医学と薬学 53 (6) : 728-735, 2005.

2. 学会発表

- 1) 鈴木義之, 熊田博光 : 自己免疫性肝炎(AIH)の病態とHLA-DR抗原についての解析. 第5回日本消化器免疫学会総会, 1998.
- 2) 鈴木義之, 熊田博光 : わが国における自己免疫性肝炎の予後—長期観察例における自己免疫性肝炎の病態と予後. 第2回日本肝臓学会大会, 1998.
- 3) 鈴木義之, 熊田博光 : 自己免疫性肝炎の今後の展開—自己免疫性肝炎の長期予後. 第86回日本消化器病学会総会, 新潟. 2000.
- 4) 鈴木義之, 熊田博光 : 本邦における難治性肝疾患の実態と変遷—自己免疫性肝炎の変遷と最近の動向. 第88回日本消化器病学会総会, 旭川. 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

肝胆道系における自己免疫性疾患の研究～自己免疫性膵炎に合併する胆管病変に関する研究～

分担研究者 小俣 政男 東京大学大学院医学系研究科 消化器内科学 教授

研究要旨：自験の自己免疫性膵炎35症例の臨床的特徴を、合併する胆管病変中心にして検討した。膵外胆管病変（硬化性胆管炎）が14例、膵内胆管狭窄は29例に認められ、膵外胆管病変は膵病変に遅れて発症するのが特徴的であった。胆管病変の組織所見は膵病変と類似し、膵と同様のメカニズムで胆管病変が発症しているものと推測された。ステロイド治療は膵外、膵内胆管病変のいずれにおいても有効であるが、維持療法を行っている23症例でも膵病変の再燃3例、膵外病変の一つである間質性肺炎の再燃3例が認められ、一部の症例はステロイド抵抗性を有するものと思われる。

分担協力者

吉田 晴彦 東京大学大学院医学系研究科 消化器内科学 講師
平野 賢二 三井記念病院 消化器内科 医長

A. 研究目的

自己免疫性膵炎に合併する胆管病変の病態を解明する。

B. 研究方法

東京大学消化器内科および関連病院における自己免疫性膵炎35例を検討対象とし、自己免疫性膵炎に合併する胆管病変の膵内胆管病変、膵外胆管病変について発症頻度、発症時期、画像的特徴、病理所見、治療・予後などを検討した。

C. 研究結果

自己免疫性膵炎35例において膵外胆管病変（硬化性胆管炎）が14例、膵内胆管病変（狭窄）が29例に認められた。膵外胆管病変は14例中9例で膵病変に遅れて発症し、遅発症例において発症時期は膵病変発症の1-89ヵ月後（平均28ヵ月後）であった。画像所見としてはCTや超音波に胆管壁肥厚像が捉えられるが、この胆管壁肥厚は管腔内超音波検査で観察すると胆管造影にて病変が一見ないように見える部位でも認められた。病理所見では胆管壁に線維化とIgG4陽性形質細胞の浸潤が認められ、この所見は膵病変の病理所見と共通するものであった。治療は膵外、膵内の胆管病変とも概してステロイド投与（プレドニゾロンの経口投与）が有効であったが、プレドニゾロンの維持療法を行っている患者23例において、硬化性胆管炎の再発は認めないものの、膵炎再燃が3例、間質性肺炎による再燃が3例に認められた。

D. 考察

自己免疫性膵炎には高頻度で胆道病変が認められる。病理所見が膵病変と類似することから膵病変と同じメカニズムで胆管病変も生じているものと考えられる。膵病変同様、胆管病変もステロイドが有効であり、この点が原発性硬化性胆管炎と大きく異なる。したがっ

て自己免疫性膵炎に合併する胆管病変は原発性硬化性胆管炎とは一線を画する病態と考えられる。胆管壁肥厚像は造影上狭窄がない部位でも認められ、造影で胆管病変が明らかでなくても、胆管病変は既に潜在しているものと思われる。ステロイド治療が有効であり、特に硬化性胆管炎の予防効果は高い。但し、膵炎や間質性肺炎による再燃がステロイドの維持療法を行っている患者でもみられる点からは、一部の症例はステロイド抵抗性であることが推察される。ステロイド抵抗性のメカニズムの解明、ステロイド以外の薬剤による治療の可能性の探求が今後の課題になる。

E. 結論

胆管病変は自己免疫性膵炎に高頻度に合併するが、原発性硬化性胆管炎と異なってステロイド治療には良好な反応を示す。但し、膵病変や間質性肺炎による再燃があることから、一部の症例ではステロイド抵抗性を示すと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirano K, Kawabe T, Komatsu Y, et al: High-rate pulmonary involvement in autoimmune pancreatitis. Intern Med J 36 (1): 58-61, 2006.
- 2) Hirano K, Kawabe T, Yamamoto N, et al: Serum IgG4 concentrations in pancreatic and biliary diseases. Clin Chim Acta. In press, 2006.

2. 学会発表

- 1) 平野賢二, 川邊隆夫, 小俣政男: 自己免疫性膵炎の典型例, 非典型例の比較検討. 第47回日本消化器病学会大会, バルディスカッション. 神戸. 2005.10.6.
- 2) 平野賢二, 小松裕, 小俣政男: IgG4を重視して診断した自己免疫性膵炎の病態. 第46回日本消

化器病学会大会, パネルディスカッション, 福岡, 2004.10.
21.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝炎における疾患感受性のゲノムワイド遺伝子多型解析

研究協力者 清澤 研道 信州大学医学部 内科学第二 教授

研究要旨： AIHの疾患感受性遺伝子をマイクロサテライト解析にて、第6染色体短腕のHLA領域を網羅的に解析し、HLA-DR、-DQ領域にのみその存在が認められ報告した。今回は、マイクロサテライト解析を用いた全染色体領域の遺伝子多型解析を検討した。遺伝子多型の網羅的解析として、大まかに設定した約400のマイクロサテライトマーカーの検索を行った。P<0.01, Pc<0.05の有意差をもって、疾患感受性を示すマーカーが2ヶ所、疾患抵抗性を示すマーカーが8ヶ所同定された。AIHの疾患に関連する遺伝子は多数存在する可能性があり、多因子遺伝疾患であることが強く示唆された。現在、そのマーカーの近傍により細かな間隔で新たなマイクロサテライトマーカーを設定し検索を行い、遺伝子を絞り込んでいる。今後、絞り込んだ範囲での疾患関連遺伝子の同定を行う。また、遺伝子多型と、その産物である発現蛋白量の関連を調べ、AIHの臨床像との関連を検討する。

A. 研究目的

AIHの疾患感受性遺伝子をマイクロサテライト解析にて、第6染色体短腕のHLA領域を網羅的に解析し、HLA-DR、-DQ領域にのみその存在が認められることを報告した（J Hepatol 2005）。

今回は、マイクロサテライト解析を用いた全染色体領域の遺伝子多型解析を行う。

B. 研究方法

遺伝子多型の網羅的解析

全染色体領域を大まかに設定した約400のマイクロサテライトマーカーにより解析し、有意差のある領域を細かに設定したマイクロサテライトマーカーにより解析する。それにより有意差のある領域をさらに細分したマーカーを設定し、同様な手法で絞り込みを行う。

C. 研究結果

現在、全染色体上におおまかに設定した約400のマイクロサテライトを解析し、P<0.01, Pc<0.05の有意差をもって、疾患感受性を示すマーカーが2ヶ所、疾患抵抗性を示すマーカーが8ヶ所同定された。現在、そのマーカーの近傍に、より細かな間隔で新たなマイクロサテライトマーカーを設定し検索を行い、遺伝子を絞り込んでいる。

D. 考 察

AIHの疾患関連遺伝子は多数存在する可能性があり、多因子遺伝疾患であることが強く示唆された。現在、そのマーカーの近傍により細かな間隔で新たなマイクロサテライトマーカーを設定し検索を行い、遺伝子を絞り込んでいる。今後、絞り込んだ範囲での疾患関連遺伝子の同定を行う。また、遺伝子多型と、その産物である発現蛋白量の関連を調べ、AIHの臨床像との関連を検討する。

E. 結 論

AIHの疾患に関連する遺伝子は多数存在する可能性があり、多因子遺伝疾患であることが強く示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshizawa K, Ota M, Katsuyama Y, et al: Genetic analysis of the HLA region of Japanese patients with type 1 autoimmune hepatitis. J Hepatol 42(4): 578-584, 2005.
- 2) 一條哲也, 吉澤要, 清澤研道: 自己免疫性肝炎(AIH)・原発性胆汁性肝硬変(PBC) overlap症候群の実態. 荒川泰行編, 消化器病学の進歩2005—モノグラフ消化器病学のニューフロンティア編. メディカルレビュー社, 東京, 2005, 216-220.

2. 学会発表

- 1) 吉澤要, 一條哲也, 清澤研道: 自己免疫性肝炎の治療抵抗性の要因の検討. 第9回日本肝臓学会大会, パネルディスカッション. 神戸. 2005.10.6.
- 2) 吉澤要, 他: 自己免疫性肝炎におけるマンノース結合レクチン(MBL)の遺伝子多型と蛋白発現. 第41回日本肝臓学会総会, 大阪. 2005.6.
- 3) 一條哲也, 吉澤要, 清澤研道: 自己免疫性肝炎(AIH)・原発性胆汁性肝硬変(PBC) overlap症候群の実態. 第91回日本消化器病学会総会, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

日本人自己免疫性肝炎患者におけるTPMT遺伝子多型頻度と治療への応用

研究協力者 西口 修平 兵庫医科大学内科学 肝胆膵科 教授

研究要旨：日本人自己免疫性肝炎患者（AIH），原発性胆汁性肝硬変患者（PBC）におけるThiopurine-S Methyltransferase（TPMT）遺伝子の多型頻度を検討した。TPMTはアザチオプリン代謝の重要な酵素であるが，その遺伝子多型により代謝活性が低下した（あるいは活性がない）ヒトが存在することが知られている。酵素活性が低下したヒトではアザチオプリンの副作用である骨髄抑制が起こり，治療上大きな問題である。AIH27症例中では野生型（TPMT*1/TPMT*1）24症例，ヘテロ（TPMT*1/TPMT3C）2症例，ホモ（TPMT3C/TPMT3C）1症例。PBC52例では野生型49例，ヘテロ2例，ホモは1症例であった。C型慢性肝炎50例では野生型49例，ヘテロ1例であった。AIHではアザチオプリン投与が行われることがあり，治療に際してはTPMT遺伝子多型を考慮する必要があるものと考えられる。

共同研究者

田守 昭博 大阪市立大学 肝胆膵病態内科 講師

A. 研究目的

アザチオプリンは免疫抑制剤として自己免疫性疾患の治療に使用されている。ステロイド抵抗性の自己免疫性肝炎（AIH）にも投与され臨床効果を認めている。本研究ではアザチオプリン代謝の重要な酵素のひとつであるThiopurine-S Methyltransferase（TPMT）の遺伝子多型頻度を，日本人AIH患者を対象として解析し，アザチオプリン投与の問題点を検討した。

B. 研究方法

大阪市立大学医学部附属病院にて通院加療中のAIH患者27例（国際診断基準において診断），組織学的に確定診断された原発性胆汁性肝硬変（PBC）52例，およびコントロールとしてC型慢性肝炎患者50例を対象とした。TPMT遺伝子多型の解析は既報に従ってアレル特異的PCRおよびPCR-RFLP法により実施した。遺伝子多型は各アレルの塩基配列によって野生型TPMT*1と変異型（TPMT*2，TPMT*3A，TPMT*3B，TPMT3C）に分類して表示した。アザチオプリン投与にて骨髄抑制を起こしたAIH一例においてはダイレクト・シーケンス法にて塩基配列を決定した。

（倫理面への配慮）

本研究は大阪市立大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て実施した。対象となったヒトへは本研究の目的，方法，個人情報守秘義務，個人の権利保護等について十分な説明を行い，文書にて同意を得た。

C. 研究結果

AIH27症例中では野生型（TPMT*1/TPMT*1）24症例，ヘテロ例（TPMT*1/TPMT3C）が2例（7.4%），ホモ例（TPMT3C/TPMT3C）が1例（3.7%）。PBC52例では野生型49例，ヘテロ2例（3.8%），ホモは1例（1.9%）であった。C型慢性肝炎50

例では野生型49例，ヘテロ1例（2%）であった。アザチオプリン投与にて骨髄抑制を起こした症例ではTPMT遺伝子塩基配列の解析，TPMT3Cのホモ変異であることが示された。

D. 考察

TPMT遺伝子は染色体6p22.3に存在するが10種類以上の遺伝子多型が存在する。野生型に対してその酵素活性が低下する多型としてはTPMT*2，TPMT*3A，TPMT*3B，TPMT3Cが報告されている。薬理遺伝学の解析では一般日本人におけるTPMT多型は2～3%と報告されている。今回少数例ながら我々の検討ではAIH11.1%，PBC5.8%にTPMT遺伝子多型を認めた。特にアザチオプリン投与が行われるAIH症例に頻度が高いことは臨床特記すべきことと考える。

E. 結論

日本人AIH，PBC患者においてTPMT遺伝子多型が存在することが明らかとなった。AIHの治療に際してTPMT遺伝子多型を考慮してアザチオプリン投与を開始するべきと考える。

F. 健康危険情報

TPMT遺伝子の（TPMT3C/TPMT3C）多型例ではアザチオプリンによる骨髄抑制が生じることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝疾患における抗CCP抗体の陽性率について

研究協力者 池田 有成 東京厚生年金病院 内科 部長

研究要旨：患者血清81例（自己免疫性肝炎（AIH）29例；平均年齢61.0歳，原発性胆汁性肝硬変（PBC）52例；平均年齢61.3歳）における合併症を検索すると，頻度順にシェーグレン症候群が30%程度，甲状腺疾患が20%程度AIH，PBCの両疾患群にみられ，関節リウマチ（RA）に関してPBCは1.9%に対してAIHは13.8%と高い傾向を示した。また，RAに特異性が高いとされる抗CCP抗体の陽性率は，AIH，PBCそれぞれ2例（6.9%），4例（7.7%）に検出され，このうちRAとの合併症例における陽性率は，AIHにおいて4例中1例（25%），PBCにおいて1例中1例（100%）であった。罹患年数あるいは骨破壊の進行度が高い程，抗体価が高くなることが報告されており，今回，AIH+RA症例において陰性を示した3例について，罹患年数は短く比較的関節破壊の程度は軽いもので，免疫抑制剤投与後の血清を使用したこともあり，抗CCP抗体が検出されなかった原因と考察された。また同時に，リウマトイド因子（RF）についても測定したところAIHは，5例（17.2%），PBCは8例（15.4%）に陽性がみられたが，RAとの合併症例に陽性は検出されなかった。このことからRAとの合併症例において特異度の高い抗CCP抗体の測定は有用であるといえる。

共同研究者

橋本 直明 東京通信病院 消化器内科
細田 英雄 東京厚生年金病院 中央検査室

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）の検査として従来リウマトイド因子（RF）が用いられているが，RA以外のリウマチ性疾患や肝疾患，慢性炎症性疾患，また，高齢者にもしばしば陽性になることが知られている。近年，RAに特異的に検出される自己抗体として，抗環状シトルリン化ペプチド抗体（抗CCP抗体）が開発された。これは，RA患者血清の75%がヒト皮膚表皮組織より分離した40kDa蛋白と反応することに見出され，この蛋白が抗ケラチン抗体（AKA）の対応抗原であるフィラグリン（filaggrin）と呼ばれる分子であることがつきとめられた。さらに核周囲因子（APF）の対応抗原がフィラグリンの前駆体であるプロフィラグリンであるとして，AKAとAPFがほぼ同一の自己抗体であることが報告された。このフィラグリンはシトルリン化酵素 peptidyl arginine deiminase（PADI）によってアルギニンがシトルリンに変換されており，このフィラグリン分子上のシトルリン残基がRAの自己抗体を認識するエピトープ形成に重要であることが示された。さらに，シトルリン化フィラグリンユニット上の主要抗原エピトープペプチドのセリンをシステインに変換してSS結合で人工的に環状化した分子（CCP）を抗原として用いると，特異度を変えずに感度が増すことが報告された。今回我々は，AIH：(n=29)，PBC：(n=52)における合併症の調査をあわせて，この人工的に環状化した分子（CCP）を抗原として抗環状シトルリン化抗体（抗CCP抗体）の検出を行い陽性率及び，有用性について検討した。

B. 研究方法

同意の得られた患者血清81例（原発性胆汁性肝硬変（PBC）52例，自己免疫性肝炎（AIH）29例）のリウマチ因子（RF）と抗CCP抗体価をELISA法にて測定した。

C. 研究結果

- 1) 自己免疫性肝疾患における合併症の頻度（表1）として，シェーグレン症候群（AIH：27.6%，PBC：30.8%），甲状腺疾患（AIH：20.7%，PBC：15.4%），関節リウマチ（AIH：13.8%，PBC：1.9%）の順に高く，関節リウマチはPBCに比べてAIHに多くみられた。
- 2) 膀胱炎，進行性皮膚硬化症，CREST症候群，レイノー症候群は，PBCに6%～10%みられたが，AIHにはみられなかった（表1）。
- 3) 自己免疫性肝疾患における抗シトルリン化抗体の陽性率は，AIH 2例（6.9%），PBC 4例（7.7%）に検出された（表2）。そのうち関節リウマチの合併症例での陽性率は，AIHにおいて4例中1例（25%），PBCにおいて1例中1例（100%）であった。AIHにおいて陰性を示した3症例は，以前関節リウマチに短期間罹患され指の変形などはなく，現在は無症状のものであった。
- 4) リウマトイド因子（RF）について測定したところAIHは，5例（17.2%），PBCは8例（15.4%）に陽性がみられたが，関節リウマチの合併症例は含まれておらず，また，抗シトルリン化抗体（抗CCP抗体）とRFの間（表3）に，全く相関はなかった。

表 1. 自己免疫性肝疾患の合併症

	自己免疫性肝炎 (AIH) (N=29)	原発性胆汁肝硬変 (PBC) (N=52)
シェーグレン症候群	27.6%	30.8%
甲状腺疾患	20.7%	15.4%
関節リウマチ	13.8%	1.9%
膀胱炎	0.0%	5.8%
進行性皮膚硬化症	0.0%	7.7%
CREST症候群	0.0%	9.6%
レイノー症候群	3.4%	9.6%
多発性筋炎	0.0%	1.9%
成人スチル病	3.4%	0.0%
白斑	0.0%	1.9%

表 2. 抗環状シトルリン化抗体 (抗CCP抗体) の陽性症例

AIH(n=29) PBC(n=52)	RA	Non-RA
CCP Ab (+)	AIH (n=1) PBC (n=1)	AIH (n=1) PBC (n=3)
CCP Ab (-)	AIH (n=3) PBC (n=0)	AIH (n=28) PBC (n=48)

陽性症例の詳細

No.	年齢	性	診断	合併症
1	75	女	AIH	シェーグレン症候群, 関節リウマチ
2	76	女	AIH	シェーグレン症候群, 大動脈炎症候群, 肝細胞癌
3	40	女	AIH→PBC	多発性筋炎
4	52	女	PBC	関節リウマチ, 全身性皮膚硬化症
5	67	女	PBC	シェーグレン症候群, CREST症候群
6	70	女	PBC	肝細胞癌

表 3 a. AIHにおける抗環状シトルリン化抗体 (抗CCP抗体) とリウマチ因子の関係

AIH (n=29)	RF (+)	RF (-)
CCP Ab (+)	0	2
CCP Ab (-)	5	22

AIHにおける抗CCP抗体陰性リウマチ因子陽性症例の詳細

No.	年齢	性	リウマチ因子 (<18.0IU/ml)	合併症
1	63	女	25.6	シェーグレン症候群, 変形性関節症
2	50	女	38.2	RA (46歳時)
3	68	女	235.3	喘息
4	71	女	106.8	糖尿病, RA (36歳時)
5	43	女	31.4	肺炎, 健康食品肝障害

表 3 b. PBCにおける抗環状シトルリン化抗体 (抗CCP抗体) とリウマチ因子の関係

PBC (n=52)	RF (+)	RF (-)
CCP Ab (+)	0	4
CCP Ab (-)	8	40

PBCにおける抗体陰性リウマチ因子陽性症例の症例

No.	年齢	性	リウマチ因子 (<18.0IU/ml)	合併症
1	72	女	139.7	シェーグレン症候群, 変形性関節症
2	63	男	67.8	代謝性疾患
3	91	女	19.0	高血圧, 胆嚢癌
4	66	女	40.9	シェーグレン症候群, PSS, 高血圧
5	54	女	33.3	シェーグレン症候群, 変形性関節症, 乳癌
6	73	男	141.1	拡張性心筋症, 肝細胞癌, 肺癌
7	42	女	134.0	Raynaud (+)
8	71	女	45.8	再生不良性貧血シェーグレン症候群

D. 考 察

合併症を検索すると、頻度順にシェーグレン症候群が30%程度、甲状腺疾患が20%程度AIH、PBCの両疾患群に同程度みられたが、関節リウマチ (RA) に関してPBCは1.9%に対してAIHは13.8%と高い傾向を示した。これは遺伝的背景として、HLA-DR4の陽性の人が関節リウマチに多く認められる (シトルリン化ペプチドによるT細胞の活性化が亢進する報告あり) ことと関係している可能性が示唆された。

自己免疫性肝疾患における抗シトルリン化抗体の陽性率は、AIH 2例 (6.9% ; 1例がRA合併症)、PBC 4例 (7.7% ; 1例がRA合併症) に検出され、文献的に全身性エリテマトーデス (8%), 強皮症 (7%) などの膠原病と同程度であった。このうちRAとの合併症例における陽性率は、AIHにおいて4例中1例 (25%), PBCにおいて1例中1例 (100%) であり、罹患年数あるいは骨破壊の進行度が高い程、抗体価が高くなることが報告されている。

今回、AIH+RA合併症例において陰性を示した3例について、共通して罹患期間は短く比較的関節破壊の程度は軽いもので、免疫抑制剤の著効例であった。また、ステロイド投与後の血清を使用したことも抗CCP抗体が検出されなかった原因と考察された。また同時に、リウマトイド因子（RF）についても測定したところAIHは、5例（17.2%）、PBCは8例（15.4%）に陽性がみられ、すべてRAとの合併症例でなかった。現在、感度、特異性を勘案したRA診断効率を算出すると、抗CCP抗体は、RF、抗ガラクトース欠損IgG抗体、マトリックスメタロプロテアーゼ3（MMP-3）などに比較して高いとされており、今回の我々の結果からもRFと比較して抗CCP抗体の測定は有用であるといえる。

E. 結 論

自己免疫性肝疾患における合併症は、頻度順にシェーグレン症候群が30%程度、甲状腺疾患が20%程度AIH、PBCの両疾患群にみられ、関節リウマチ（RA）に関してPBCは1.9%に対してAIHは13.8%と高い傾向を示した。RA合併症の診断において、従来の検査に使われていたリウマトイド因子（RF）検査の特異性は低く、抗シトルリン化ペプチド抗体の臨床的有用性が高いとされる結果が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

(参考文献)

- 1) Simon M. et al: J Clin Invest 92: 1387-1393, 1993.
- 2) Schellekens GA, et al: J Clin Invest 101: 273-281, 1998.
- 3) Schellekens GA, et al: Arthritis Rheum 43: 155-163, 2000.
- 4) Hill J.A, et al: J Immunol 171: 538-541, 2003.
- 5) Aotsuka S. et al: Clin and Exp Rheum 23: 475-481, 2005.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝炎における制御性T細胞の解析

分担協力者 井廻 道夫 昭和大学医学部 第二内科 教授

研究要旨：自己免疫性肝炎の発症への制御性T細胞の関与を検討するため、患者の肝組織を制御性T細胞のマーカーであるFoxp3に対する抗体で免疫染色した。C型慢性肝炎と比較し、自己免疫性肝炎および原発性胆汁性肝硬変では肝浸潤リンパ球中の制御性T細胞の頻度が低いことから、制御性T細胞欠乏状態がこれらの発症に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

CD⁴⁺ CD²⁵⁺T細胞は、末梢血中CD⁴⁺T細胞の5～10%を占め、自己反応性CD4細胞やCD8細胞の活性を抑制する働きがあり制御性T細胞（Treg）といわれている。自己免疫性肝炎（AIH）患者では健常者と比較し末梢血中のTregが有意に減少しており、AIHの発症にはTregが関与していることが想定されている。近年、ヒトおよびマウスの自己免疫性・炎症性疾患において遺伝的に欠損しているFoxp3遺伝子が、健常個体中に存在するCD⁴⁺Tregで特異的に発現していることが報告され、Foxp3は、制御性T細胞の発生においてマスター制御遺伝子であると考えられている。今回の研究は、自己免疫性肝炎における肝組織内の制御性T細胞の動態を検討することである。

B. 研究方法

AIH 2例、原発性胆汁性肝硬変（PBC）4例、C型慢性肝炎（CH-C）2例、転移性肝癌（背景肝組織）4例のパラフィン包埋肝組織切片を、抗Foxp3抗体（Mouse anti-Foxp3 monoclonal antibody, Abcam社）で免疫組織染色を行い、Foxp3陽性細胞数を顕微鏡下でカウントした。同時に同じ視野内のCD4陽性細胞数、CD8陽性細胞数もカウントした。

C. 研究結果

Foxp3陽性細胞のCD4陽性細胞+CD8陽性細胞に占める割合は、AIHで8.7%、6.2%、PBCで13.4%、0.3%、2.2%、3.2%、CH-Cで13.0%、21.0%、転移性肝癌背景肝で4.5%であった。

D. 考 察

AIH症例では、肝浸潤CD4陽性またはCD8陽性リンパ球中のFoxp3陽性細胞は6～9%であった。PBC症例では、1例を除き浸潤リンパ球中のFoxp3陽性細胞は少数であった。C型肝炎患者の肝組織には、AIH症例、PBC症例と比較し、多数のFoxp3陽性細胞が浸潤していた。正常と考えられる肝組織のリンパ球中のFoxp3陽性細胞は少数であった。今後更に症例を増やし検討する必要がある。

E. 結 論

C型慢性肝炎と比較し、AIHおよびPBCでは浸潤リンパ球中のTregの頻度が低いことから、Treg欠乏状態がAIH、PBCの発症に関与していることが示唆される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝炎における制御性T細胞の機能異常

研究協力者 各務 伸一 愛知医科大学 消化器内科 教授

研究要旨：制御性T細胞（Tr）は自己免疫性疾患における末梢組織での免疫寛容状態の維持において大きな役割を果たしている。Trの機能を調節していると考えられているFoxp3, TNF-R-SF18 (GITR), CTLA-4, CD28の各分子について、各々のmRNA量をReal Time PCR法を用いて定量したところ、自己免疫性肝炎（AIH）患者においてはFoxp3とCTLA-4のmRNA量の低下が認められ、AIH患者の末梢においてTrの機能が負に制御されていることを示唆する所見を認めた。次にAIH患者と健常人の末梢血からTrを分離しOKT3による刺激後のサイトカイン産性能をmRNAレベルで検討したところ、健常人に比べてAIH患者ではIL10の産生能が低下していた。これらの所見はTr機能の低下状態がAIHの病態に関与している可能性を示唆するものであると考えられる。

共同研究者

奥村 明彦 愛知医科大学 消化器内科 講師
石川 哲也 愛知医科大学 消化器内科 講師

A. 研究目的

制御性T細胞（Tr；CD4⁺CD25⁺T細胞）は自己免疫性疾患における末梢組織での免疫寛容状態の維持において大きな役割を果たしている。今回我々はAIH患者における末梢での免疫寛容状態のbreak throughにTrが関与しているかどうかを確認する目的で、AIH患者においてTrの機能的な異常があるかどうかを検討した。

B. 研究方法

当院にてAIHと診断された15例（男性2例，女性13例），健常人（control）12例，C型慢性肝炎（CH）患者26例を対象とした。末梢血よりリンパ球を分離し，①CD4，CD8，CD25，CD28の各抗体を用いてTr，CD8⁺CD28⁺T細胞，CD4⁺CD28⁺T細胞の各頻度をフローサイトメトリーにより検討し，②リンパ球を磁気分離法により分画化してTr分画を得た後にRNAを抽出し，Trの機能を調節していると考えられているFoxp3，TNF-R-SF18（GITR），CTLA-4，CD28の各々のmRNA量を定量した。③さらに一部の患者においてはTr分画を分離し，OKT3（1 μg/ml）の存在下で18時間培養した後にRNAを抽出し，リアルタイムPCR法によりIFNγ，TNFα，IL4，IL10，TGFβの各サイトカインのmRNA量を定量した。

C. 研究結果

健常人における末梢血液中におけるTrの頻度は5.9±1.7%であったのに対し，AIHにおいては9.9±3.3%であり，Trの割合は健常人に比べて有意に増加していた（p<0.01）。また，CH-CにおいてはTrの頻度は8.4±3.7%であり健常人に比べて有意に増加していたが，AIHよりも少なかった。CD4⁺CD28⁺T細胞については健常人，CH-C，AIHにおいてそれぞれ37.8±

7.5%，44.7±10.9%，42.7±11.5%であり3群間においてその頻度に差異は認められなかった。一方CD8⁺CD28⁺T細胞については，健常人，CH-C，AIHにおいてそれぞれ18.4±6.5%，14.2±6.4%，11.6±5.0%であり，AIHにおいては健常人に比べて有意にその頻度が少なかった（p<0.05）

②Trの機能をup-regulateすると考えられるFoxp3とCTLA-4のmRNA量は，AIHではcontrolに比べて有意に低下していた（p<0.05）。一方でTrの機能をdown-regulateすると考えられるTNF-R-SF18（GITR）のmRNA量は，AIHではcontrolに比べて増加していたが統計学的には差を認めなかった。また，同様にTrの機能をdown-regulateすると考えられるCD28のmRNA量には両群間で差を認めなかった。②AIH患者のTrにおいてはcontrolのTrに比べてIL4およびIL10のmRNAの増加を認めたが，その他のサイトカインのmRNAについてはほとんど差を認めなかった。

③CD4⁺CD25⁺T細胞にOKT3を最終濃度1 μg/mlで添加，18時間培養した後にRNAを抽出，Real Time PCR法にてIFNγ，TNFα，IL4，IL10，TGFβの各サイトカインのmRNA量を測定した。IL-4，TGFβについてはOKT3刺激後もほとんどmRNA量の増加は認められなかったが，IFNγについては有意差は認められなかったものの健常人よりもAIHにおいて増加している症例が多かった。IL10については，健常人ではOKT3刺激後にIL10のmRNAが増加したが，AIHにおいてはOKT3刺激後もほとんどIL10のmRNAの増加は認められなかった。Stimulation Index（S.I.）（S.I.=OKT3刺激後のmRNA量/OKT3刺激前のmRNA量）を算出して健常人とAIHにおけるサイトカイン産生能を比較したところAIHでは有意にIL10産生能が低下していた

D. 考察

Trは直接的な細胞同士の接触を介してCTLなどのCD8陽性リンパ球の機能を抑制することが知られてい

る。また、IL-10やTGF β などのサイトカインを分泌し、間接的に免疫応答を抑制する可能性も示唆されている。今回の我々の検討では、Trのマスター遺伝子として最近注目を浴びているFoxp3、またTrの機能を抑制する分子であるTNF-R-SF18、さらには、ともにco-stimulatory factorであるB7のリガンドであるCTLA-4およびCD28に着目してそのmRNA量を検討したが、AIH患者のTrにおいてはその機能を増強する分子であるFoxp3とCTLA-4のmRNA量がともに健常人に比して低値であることが明らかとなった。さらには、統計学的な有意差は得られなかったがTrの機能を抑制する分子であるTNF-R-SF18については逆に健常人に比して高値であることが明らかとなった。これらの結果はいずれもAIHにおけるTrの機能異常を示唆するものである。そこで実際にTrの機能異常が存在するかどうかを検討した。1型AIHにおける標的抗原が明らかになっていないことから今回はOKT3を用いた非特異的な刺激による検討を行った。TrはIL-10の重要な供給源であることからIL-10の産生能に注目したが、IL-10のmRNAはOKT3刺激後にもほとんど増加せず、健常人に比してAIHではTrによるIL-10産生が障害されている可能性が示唆された。AIHにおいては末梢血中のTrの頻度はむしろ健常人よりも増加していたことから、AIHにおける免疫寛容状態の破綻にはTrの機能低下が関与している可能性があると考えられる。

E. 結 論

Tr機能の低下状態がAIHの病態に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Okumura A, et al : Impaired regulatory T cell functions in the patients with autoimmune hepatitis. The 56th Annual Meeting of AASLD, San Francisco. 2005.11.6.
- 2) 奥村明彦, 他 : 自己免疫性肝炎(AIH)における制御性T細胞(Tr)の機能低下. 第42回日本消化器免疫学会総会, シンポジウム. 東京. 2005.8.4.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

(文 献)

- 1) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated t cells expressing IL-2 receptor-chains(CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 1995; 155: 1151-1164.
- 2) Camara NO, Sebille F, Lechler RI. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells have marked and sustained effects on CD8⁺ T cell activation. Eur J Immunol 2003;33:3473-3483.
- 3) Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Banderia A. CD25⁺CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. J Immunol 2001; 166: 3008-3018.
- 4) Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Impairment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells in autoimmune liver disease. J Hepatol 2004; 41: 31-37.
- 5) Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM. Direct expansion of functional CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. J Exp Med 2003; 198: 235-247.