

厚生労働省特定疾患

門脈血行異常症調査研究班
平成十八年度研究報告書

平成 19 年 3 月

班 長 橋 爪 誠

序 文

昭和59年、厚生省特定疾患「門脈血行異常症」調査研究班が編成された。これは、昭和50年以来、厚生省特定疾患「特発性門脈圧亢進症」調査研究班が検討を行っていた特発性門脈圧亢進症（IPH）に、肝外門脈閉塞症（EHO）およびバッド・キアリ症候群（BCS）を対象疾患として加え、再編成されたものである。

当研究班は亀田治男（昭和59～63年）、小幡裕（平成元～3年）、二川俊二（平成4～7年）、杉町圭蔵（平成8～13年）、橋爪誠（平成14年～）の各班長に引き継がれ、今日に至っている。この間、多くの班員、研究者の努力により、これら疾患の病因、病態、病理、疫学、診断、治療、予後などについて精力的に研究が推進された。特にIPHでは、肝硬変症との差異およびIPH特有の門脈血行動態が明らかになり、病因に関しては、末梢リンパ球Autologous mixed lymphocyte reaction（AMLR）の低下、脾内リンパ球T細胞サブセットの変化など、自己免疫異常を示唆する病態が明らかになってきた。そしてその後、3疾患の病因病態の解明は、分子生物学的解析や遺伝子解析を新たに行うことで、新たな展開を迎えた。マイクロアレイなどの最先端の分子生物学的手法を使い、IPHにはConnective tissue growth factor（CTGF）が過剰発現し、Heme oxygenase-1（HO-1）の発現が低下していることを発見した。また、ネパール、カナダにおけるBCSの検討を行い、国際間比較もなされた。一方、社会的には、平成10年度に、BCSが治療研究対象疾患に採択され、患者にとって大きな福音となり、平成12年12月には「門脈血行異常症の診断と治療（2001年）」を基準として設定することができたのである。未だ門脈血行異常症3疾患の病因は不明であるが、IPHにおける免疫異常や血管増殖因子の関与、BCS、EHOにおける凝固線溶系の異常と遺伝子異常が次第に明らかと成りつつある。さらに分子生物学的、遺伝子学的アプローチを続けることでさらなる原因解明ができるものと期待される。そして、これらの原因解明を、臨床の場で診断・治療に応用することが今後課題である。

本年度も、分子生物学的手法を駆使した基礎的なものから臨床研究まで幅広い研究がなされた。基礎的分野では、IPHの病態形成におけるiNOSの関与、肝再生過程におけるHIF-1遺伝子の関与、BCS肝臓における酸化ストレスの関与などが明らかにされた。一方、臨床分野では、門脈血行異常症の全国疫学調査が10年ぶりに行われ、本邦におけるIPH、EHO、BCSの現状が明らかにされた。さらに門脈血行異常症における治療成績・予後に関する全国調査も新たに行い、治療の現況が明らかになった。そして、これらの結果をもとに、当研究班で作成された基準「門脈血行異常症の診断と治療（2001年）」を改訂し、「門脈血行異常症の診断と治療のガイドライン（2007年）」として新基準を作成することができたのである。

今年度も、ここに研究成果をとりまとめることができ、わずかでも各疾患の病因、病態の解明に貢献することができたと確信している。最後に、厚生労働省保健医療局疾病対策課のご指導、ご支援に厚く御礼申し上げるとともに本研究班の班員、研究協力者の先生方、ならびに関係諸氏に深く感謝する。

平成19年3月

厚生労働省難治性疾患克服研究事業
門脈血行異常症に関する調査研究

班 長 橋 爪 誠

厚生労働省 特定疾患
門脈血行異常症 平成 18 年度研究報告書

目 次

序 文

I 総括研究報告

II 分担研究報告

〔病因・病態〕

1. IPH および類縁疾患の肝線維化機序—免疫組織化学的検討
金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 中 沼 安 二 …………… 6
2. 特発性門脈圧亢進症における免疫異常—制御性 T 細胞との関連—
昭和大学医学部消化器内科学 井 廻 道 夫 …………… 10
3. 肝再生過程における低酸素応答システムの生物作用の解析
慶応義塾大学医学部医化学教室 末 松 誠 …………… 15
4. CTGF 組み換えアデノウイルス感染ラット肝組織における網羅的遺伝子発現の解析
大阪市立大学大学院医学研究科核医学 塩 見 進 …………… 19
5. Budd-Chiari 症候群の肝の酸化ストレス
久留米大学医学部病理学教室 鹿 毛 政 義 …………… 25
6. バッドキアリ症候群発症機序解明に向けた血管形状セグメンテーションとモデル構築
九州大学大学院医学研究院災害・救急医学 橋 爪 誠 …………… 29
7. 門脈圧亢進症ラット胃粘膜における adaptive cytoprotection の検討
大分大学医学部腫瘍病態制御講座第 1 外科 北 野 正 剛 …………… 35

〔臨 床〕

8. Budd-Chiari 症候群の肝組織規定因子に関する検討
琉球大学医学部生体制御医科学講座機能制御外科学分野 國 吉 幸 男 …………… 40
9. 肝細胞癌合併肝硬変患者における食道静脈瘤増悪に関する危険因子の検討
大阪市立大学大学院医学研究科核医学 塩 見 進 …………… 44
10. 成人生体肝移植における左葉グラフト移植前後の肝血行動態の検討
順天堂大学医学部肝胆脾外科 川 崎 誠 治 …………… 48
11. IPH に発生した肝結節性過形成
長崎大学大学院医師薬学総合研究科移植・消化器外科 兼 松 隆 之 …………… 52

12. 門脈血栓にて発症した先天性アンチトロンピン欠損症解析 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻病因・病態検査学講座	小嶋哲人	55
13. 門脈圧亢進症における D-ダイマー値の検討— 門脈血栓との関連について — 千葉県立衛生短期大学第一看護学科	松谷正一	58
14. 肝硬変症に伴う食道静脈瘤および門脈圧亢進症性胃症に対する腹腔鏡下脾摘術の有用性網羅的遺伝子発現の解析 九州大学大学院医学研究院消化器・総合外科	前原喜彦	62
15. 門脈病変に対する造影超音波診断 東京医科大学内科学第四講座	森安史典	67
16. 巨大脾腫を伴う肝硬変における門脈圧亢進症の治療— 脾摘の効果 — 久留米大学医学部病理学教室	鹿毛政義	71
17. 脾摘術後門脈血栓予防のための AT-III 製剤投与の有用性について 九州大学大学院医学研究院消化器・総合外科学	前原喜彦	77
〔全国調査・疫学〕		
18. 門脈血行異常症の全国疫学調査 大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学	廣田良夫	82
19. 門脈血行異常症の治療成績に関する全国調査 九州大学大学院医学研究院災害・救急医学	橋爪誠	93
Ⅲ その他		
平成 18 年度門脈血行異常症班会議総会プログラム		101
門脈血行異常症の診断と治療のガイドライン（2007 年）		103
平成 18 年度門脈血行異常症調査研究班名簿		109

I 総括研究報告

総括研究報告

班長 橋爪 誠 (九州大学大学院災害救急医学)

I. 研究目的

本研究班の研究目的は、原因不明で門脈血行動態の異常を来す特発性門脈圧亢進症 (IPH)、肝外門脈閉塞症 (EHO)、バッド・キアリ症候群 (BCS) を対象疾患として、これらの疾患の病因および病態の追求とともに治療上の問題点を明らかにし、予後の向上を目指すところにある。

本研究班は、昭和50年以降厚生省特定疾患として検討されてきたIPH以外に、EHO、BCSなどを含み、昭和59年に発足した。しかし、長年の班員の努力にもかかわらず、未だその病因は不明である。そこで、最新の研究手技を用いた分子生物学的アプローチに重点を置き、これらの疾患の解明を行うこととした。

II. 研究成果

【病因・病態】

中沼らは、IPH とその類縁疾患である incomplete septal cirrhosis (ISC) における肝線維化機序を免疫組織化学的に検討した。IPH、ISC では類洞内皮における iNOS の発現亢進があり、類洞の拡張、活性化肝星細胞の出現、類洞の毛細血管化とそれぞれ有意な相関を示した。IPH、ISC では門脈末梢血行不全に関連して肝内で iNOS が誘導され、局所で産生された NO が類洞の拡張、および肝星細胞の活性化とそれに引き続く肝実質の線維化に関与していることが示唆された。

井廻らは、肝内に浸潤している Treg、つまり FoxP3 陽性細胞と IPH 並びに各種肝疾患 (AIH, PBC, CH-C) との関連を検討した。IPH では、肝組織内に浸潤している FoxP3 陽性細胞である Treg はほとんど存在せず、IPH における免疫異常として、Treg の関

与を積極的に示唆する結果は得られなかった。

末松らは、門脈血行動態変化を惹起する様々な肝病態、特に肝再生過程に焦点を絞り、その形成・進展プロセスにおける新たな低酸素応答システムの生物作用解明を行った。HIF-1・遺伝子欠損マウス (HIFKO) における 70%肝切除後の再生初期過程遅延は、G1 期から S 期への移行に必須のサイクリン分子群の発現低下を伴っていた。一方、切除後 72 時間には HIFKO の肝重量はコントロールマウスとほぼ同程度まで回復するが、これは主に個々の肝細胞サイズの増加によるものであることが明らかになった。肝再生過程において HIF-1 遺伝子が細胞増殖と適正な細胞サイズを制御する重要な制御因子として機能していることが明らかとなった。

塩見らは、IPH の動物モデル作成を検討するため、connective tissue growth factor (CTGF) 組み換えアデノウイルス感染ラット肝組織における網羅的遺伝子発現の解析を行った。CTGF の肝での発現は一過性であった。肝組織を用いた GeneChip による網羅的遺伝子発現の解析では、炎症に関する遺伝子発現は投与 3 日目では亢進し、7 日目では減衰していた。線維化に関する遺伝子発現は 3 日目、7 日目共に亢進していた。

鹿毛らは、BCS の肝臓の酸化ストレスについて検討を行なった。ネパールの BCS41 症例の針生検肝を病理組織学的に検討した。肝臓の免疫組織化学の結果、BCS の肝臓では、多くの症例で酸化ストレス・マーカーである 8-OHdG の強発現が見られ、肝病変の進展とともに発現の増強が見られた。ネパールの BCS の肝臓では、高酸化ストレス状態にあることが示唆され、酸化ストレスが BCS の病態や肝病変の進展に深く関与している可能性が示唆された。

橋爪らは、BCS の発症に及ぼす肝静脈-下大静脈合流部付近の血流の流体力学的な因子に着目し、医

imaging (MFI) により観察することで、門脈血栓と門脈腫瘍栓を鑑別することを検討した。門脈内腫瘍、ラジオ波凝固療法 (RFA) 後、脾部分塞栓術 (PSE) 後などの門脈病変を対象とし MFI を用いることで、造影剤 (SonoVue) の流入を観察し、門脈内占拠性病変の鑑別が可能であることが明らかになった。

鹿毛らは、巨大脾腫を伴う肝硬変に対して脾摘を施行した 60 例において門脈圧亢進症に対する効果を検討した。脾摘後門脈圧は平均 22 mmHg より 17 mmHg に有意に低下し、肝機能は術後 1 年で血小板数、Alb、TB、PT、NH₃ が有意に改善した。また、食道胃静脈瘤は脾摘により 74% 改善し、術前肝性脳症を伴った 4 例も術後脳症を認めず、2 例は IFN 治療、肝癌治療が施行できた。肝硬変における脾摘は門脈圧亢進症の有効な治療と考えられた。

前原らは、腹腔鏡下脾摘術により食道静脈瘤および門脈圧亢進症性胃症が改善するか否かについて検討した。脾摘術前後の食道静脈瘤 F 因子 (none/F0/F1/F2/F3) は、(29/14/16/20/1) から (38/11/15/6/0) へ、また PHG (none/mild/severe) は (26/28/16) から (44/25/1) ($p < 0.0001$) へと有意に改善した。難治性食道静脈瘤および PHG には腹腔鏡下脾摘術は有効な治療法になり得ると考えられた。

【全国調査・疫学】

廣田らは、「特定疾患の疫学に関する研究班 (主任研究者: 永井正規)」と共同で、門脈血行異常症の全国疫学調査を実施した。一次調査の結果、2004 年 1 年間の受療患者数 (95% 信頼区間) は、IPH: 850 人 (640 - 1,070)、EHO: 450 人 (340 - 560)、BCS: 270 人 (190 - 360) と推定された。男女比は、IPH 1:2.7、EHO 1:0.6、BCS 1:0.7 であった。二次調査の結果、確定診断時の年齢分布については、IPH では 50 代がピーク、EHO では 10 歳未満と 40 代から 60 代に 2 峰性のピークを認めたが、若年層に多く分布していた。主要症候については、食道静脈瘤および脾腫を 3 疾患共に高頻度で認めた。「最も重要な主要症候」については、3 疾患共に「食道静脈瘤」と回答した症例が最も多かった。治療内容は、食道静脈瘤に関しては内視鏡的治療が主流と

なっていたが、胃静脈瘤に対する治療は内視鏡的治療と手術がほぼ同じ頻度であった。脾機能亢進症に対しては手術による治療が主流であったが、IVR (例も一部に認められた。BCS の閉塞・狭窄部位に対する治療に関しては、IVR 治療が圧倒的に優位であった。

橋爪らは、門脈血行異常症における治療成績・予後に関する全国調査を実施した。回答を得た全国診療対象科 105 件から集積した 2000 年から 2005 年に受療して治療を受けた IPH:175 症例、EHO:103 症例、BCS:53 症例について、治療内容、治療成績、予後について検討した。5 年累積生存率は、IPH:94.8%、EHO:93.3%、BCS:94.2%、10 年累積生存率は IPH:90.6%、EHO:93.3%、BCS:82.8% であり、3 疾患とも予後は良好であった。食道静脈瘤に対しては、各疾患とも一番多い治療方法は内視鏡的治療であった。その中でも EIS が一番多く為されていた。また、食道静脈瘤に関する 5 年累積非再出血率は、IPH:98.6%、EHO:95.8%、BCS:100%、5 年累積再発率は、IPH:41.6%、EHO:42.1%、BCS:32.5% であり、3 疾患とも差異はなかった。

IPH の食道静脈瘤初発例を対象として、内視鏡的治療と直達手術の治療成績を比較検討したところ、食道静脈瘤累積非出血率は内視鏡的治療群では 1 年 97.1%、3 年 93.2%、5 年 93.2% だったのに対し、直達手術群は 1 年 100%、3 年 100%、5 年 100% であった。両群とも有意差はないが、特に直達手術の方は出血率 0% と非常に良好な成績を残した。また、食道静脈瘤累積再発率は内視鏡的治療群では 1 年 23.9%、3 年 38.4%、5 年 53.8% だったのに対し、直達手術群は 1 年 6.2%、3 年 12.9%、5 年 12.9% であり、直達手術群は内視鏡的治療群に比べ有意に再発率が低かった。

【全国検体保存センターの現状】

門脈血行異常症に関する調査研究班の研究対象となる特発性門脈圧亢進症 (IPH)、肝外門脈閉塞症 (EHO)、バッド・キアリ症候群 (BCS) の病因は未だ不明である。これら三疾患は、全国的にみても症例数が少なく、比較的にまれな疾患である。これら三疾患の病因・病態を解明することを目標とし、平成

用画像解析と数値流体力学的手法を用いて流体力学的に肝静脈-下大静脈合流部付近の流れ場を解析した。健常者の肝静脈-下大静脈血管形態に着目し、MRI画像より肝静脈-下大静脈合流部付近の血管形状を医用画像処理の手法を用いて抽出し、定常血流動の仮定の下で血流の流れ場シミュレーションを行ったところ、肝静脈-下大静脈合流部付近で複雑流れ場が形成されていることが観察された。また合流部付近の壁面に強いせん断応力が働く傾向があることが分かった。

北野らは、門亢症胃粘膜における adaptive cytoprotection と HSP90 および eNOS の発現との関連について検討をおこなった。門脈圧亢進症ラット胃粘膜においては、低濃度アルコール刺激により Hsp90 および eNOS 発現亢進により、adaptive cytoprotection の障害が惹起されている可能性が示唆された。

【臨床】

國吉らは、肝線維症の段階での手術を行う目的で、BCSにおける肝組織を規定する因子をについて検討した。手術時肝硬変まで至った症例は有意に高齢で且つ病悩期間が長い傾向を認めた。また42.3歳以下の肝硬変患者は認めず、8.8年以上の病悩期間を有する肝線維症患者は認められなかったことから、至適手術時期は42.3歳以下で、病悩期間8.8年以下であると考えられた。

塩見らは、肝癌合併肝硬変患者における食道静脈瘤増悪の危険因子を検討し、同時に肝癌非合併肝硬変患者と比較検討した。肝癌合併肝硬変患者において、肝癌の出現自体は危険因子にはならず、門脈血栓及び50mm以上の大きな肝癌の存在が食道静脈瘤増悪の有意な危険因子であった。また、肝癌合併患者では食道静脈瘤形態の増大は必ずしも危険因子ではなかったが、肝癌非合併患者では形態の増大は大きなリスク比を有する因子であった。

川崎らは、左葉グラフトにおける移植前後での肝血行動態の変化に関する検討を行った。左葉グラフトはGV/SV比40%以下のグラフトとなる可能性が高く、グラフトへの門脈血流量も多量であることが多くなるが、適切な術後管理により良好な生存率が

期待でき、グラフト選択肢として重要と考えられた。

兼松らは、IPH症例に発生した結節性肝病変につき検討した。術中所見で肝両葉に数mmから3cm大の結節を多数認め、結節の生検と脾臓摘出術を施行した。結節は白色調で被膜の形成はなく、組織学的に結節は異型の無い過形成の肝細胞で構成され内部に門脈域が存在した。また結節内外に異常血行路、末梢門脈枝の潰れがみられた。

小嶋らは、門脈血栓症を発症して、AT欠損症が疑われた症例を経験し、AT遺伝子解析による病因・病態の解明を試みた。解析の結果、発症者のAT遺伝子蛋白翻訳領域に病因と思われるミスセンス変異G13268C (Ala384Pro) をヘテロ接合体に同定し、ヘパリン親和性は正常であるもののプロテアーゼ阻害活性は著しく低下しており、タイプ2RS AT異常症と推測された。しかし、同一変異をもつ母親には門脈血栓症は発症しておらず、発症者での門脈血栓症発症要因については不明であった。

松谷らは、安定化フィブリンの分解産物として血栓特異性の高い分子マーカーであるD-ダイマーを門脈圧亢進症において測定し門脈血栓の診断における臨床的意義を明らかにした。門脈血栓例では血栓の程度に比例してD-ダイマーの上昇がみられたが、石灰化した血栓例ではD-ダイマーの上昇が乏しかった。薬物治療時の変化ではワルファリン治療により血栓の減少に伴ってD-ダイマーの減少や陰性化がみられた。D-ダイマーの計測は門脈血栓の簡便な診断法として、また血栓の性状診断や治療効果判定への臨床応用が可能と考えられた。

前原らは、腹腔鏡下脾摘術後の門脈血栓症に対するAT-III製剤の予防投与の有用性について検討した。腹腔鏡下脾摘術を施行した肝硬変症40例を対象とし、術後一日目よりアンスロビンP1500単位を3日間投与した投与群20例と非投与群20例で、門脈血栓の発症の有無を検討した。門脈血栓の発症は、投与群では1/20(5%)であったが、非投与群では7/20(35%)と有意に高く、AT-III製剤の予防投与は、腹腔鏡下脾摘術後の門脈血栓の発症予防に有用であると考えられた。

森安らは、次世代超音波剤であるSonoVueを用い、flash-replenishment法を応用したmicro flow

9年に検体登録制度および全国検体保存センターを設立した。しかし、この検体保存センター運営はシステム上の問題点も出現してきた。

当研究班では、文部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、患者の利益・プライバシーを保護しながら、より有効な検体保存センターのシステムを構築していく必要があると考え、検体保存セン

ターの再編（新検体保存センターの設置）を行った。新検体保存センターの設置後、九州大学大学院消化器・総合外科と長崎大学大学院移植・消化器外科より症例登録がなされ、平成19年3月現在で新たに計9症例の検体登録がなされた（内容：血液検体9症例、脾臓・肝臓組織検体1症例）。今後登録施設と登録症例数を増やすとともに、病因・病態解明に役立つ幅広いデータを検討していく予定である。

II 分担研究報告

〔病因・病態〕

IPH および類縁疾患の肝線維化機序—免疫組織化学的検討

金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学
中沼安二

共同研究者
金沢大学医学系研究科形態機能病理学
佐藤保則

研究要旨

IPHとその類縁疾患である incomplete septal cirrhosis (ISC) における肝線維化機序を免疫組織化学的に検討した。IPH、ISCの肝実質内には、類洞拡張部や線維性隔壁周辺部において α -SMA陽性を示す活性化肝星細胞を高率に認めた。また、IPH、ISCでは類洞内皮における inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現亢進があり、加えて CD34陽性を示す類洞の毛細血管化を高率に認めた。統計学的に類洞内皮における iNOSの発現は、類洞の拡張、活性化肝星細胞の出現、類洞の毛細血管化とそれぞれ有意な相関を示した。以上の結果より、IPHでは門脈末梢血行不全に関連して肝内で iNOSが誘導され、局所で産生された NOが類洞の拡張、および肝星細胞の活性化とそれに引き続く肝実質の線維化に関与していることが示唆された。

はじめに

特発性門脈圧亢進症 (IPH) は原因不明の門脈圧亢進症であり、末梢門脈枝の狭小化による門脈末梢血行不全に関連した変化が肝内で徐々に進行する。病理組織学的に、末梢門脈枝の潰れに加え、静脈性の異常血行路の出現や肝内血行異常を反映した類洞の拡張などを認める。IPHの類縁疾患として、incomplete septal cirrhosis (ISC) や nodular regenerative hyperplasia (NRH)、partial nodular transformation (PNT) が知られている¹⁾。

ISCは肝線維化を示すIPHの類縁疾患であり、IPHの肝内病変を背景に不完全な線維性隔壁形成や肝実質の結節化を示す。IPHとISCとの異同はあくまで肝線維化を含めた病変の程度の差であるが、IPH、ISCにおける肝線維化の機序は現在まで不明である。

一般に、肝線維化の過程では、細胞外マトリックス (コラーゲン) の主要な産生細胞である活性化肝星細胞が中心的役割を担う。この肝星細胞の活性化の機序の一つとして、酸化ストレスや活性酸素種の関与が指摘されている。文献的に低酸素状態の肝では inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現が誘導され、産生された NO (広義の活性酸素種の一つ) は肝内で酸化ストレスとして作用することが報告されている^{2, 3)}。IPHでは、門脈末梢血行不全から肝内に局所的な低酸素状態を生じ、これがIPHの肝内病変の形成に関与している可能性がある。

今回、IPHとその類縁疾患における肝線維化の機序を解明する目的で、類縁疾患として特にISCに着目して、病理組織学的な検討を行った。

対象と方法

肝ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、 α

-smooth muscle actin (α -SMA)、iNOS、CD34 に対する 1 次抗体を用いた免疫染色を行った。 α -SMA の染色で肝星細胞の活性化、CD34 で類洞の毛細血管化を評価した。類洞の毛細血管化には活性化肝星細胞が産生する基底膜構成成分（細胞外マトリックス）が関与するとされているが、IPH や ISC における類洞の毛細血管化はこれまでに詳細な検討はなされておらず、今回あわせて検討を行った。対照群としてウイルス性肝炎 / 肝硬変(HCV 陽性)、組織学的正常肝を使用した。対象症例の詳細は表 1 に示した。

なお、ISC と診断される症例には、肝線維化を示す IPH 以外の慢性肝疾患が含まれている可能性があるが、今回使用した ISC 症例では上述の IPH の病理組織像がみられ、臨床データも IPH に矛盾しないことを確認した。統計学的検討はフィッシャーの直接確率計算法もしくは χ^2 独立性の検定によった。

結 果

類洞の拡張は、ウイルス性肝炎 / 肝硬変に比して IPH、ISC で高率にみられる変化であり、さらに IPH と ISC の類洞拡張部には α -SMA 陽性を示す活性化肝星細胞の局在をよく認めた（表 2、図 1）。加えて ISC でみられる線維性隔壁近傍の肝実質にも、活性化肝星細胞の局在をしばしば認めた（図 1）。

iNOS の発現は正常肝ではみられず、IPH、ISC およびウイルス性肝炎 / 肝硬変では類洞内皮細胞や肝細胞、クッパー細胞に種々の程度に陽性所見を認

めた。IPH と ISC では、特に類洞拡張部における類洞内皮での iNOS の発現誘導が特徴的であり（図 1）、統計学的に ISC 群ではウイルス性肝炎 / 肝硬変群よりも、類洞内皮細胞における iNOS の発現が有意に高率であった（表 2）。これとは対照的に、クッパー細胞における iNOS の発現は、ウイルス性肝炎 / 肝硬変群で IPH 群よりも有意に高かった（表 2）。

CD34 陽性を示す類洞の毛細血管化は、IPH と ISC において、類洞拡張部に加えて類洞拡張のない部位や ISC の線維性隔壁近傍でみられた（図 1）。類洞の毛細血管化は肝硬変の再生結節辺縁部でも認められたが、IPH と ISC においてウイルス性肝炎 / 肝硬変より高率にみられる所見であり、ISC 群とウイルス性肝炎 / 肝硬変群の 2 群間で統計学的な有意差を認めた（表 2）。なお、表 2 では IPH、ISC、ウイルス性肝炎 / 肝硬変の 3 群間で 6 項目に関して統計学的検討を行ったが、IPH 群と ISC 群間で有意差を示すものはなく、この結果からも IPH と ISC は一連の疾患であることがうかがわれた。

IPH と ISC の合計 29 症例において、類洞の拡張、 α -SMA 発現（肝星細胞活性化）、類洞内皮細胞における iNOS 発現、CD34 発現（類洞毛細血管化）の 4 項目について、個々の項目の相関関係を検定した結果を図 2 に示す。 P 値が 0.05 以下を有意差ありとした場合、類洞の拡張と α -SMA 発現に有意差はなかったが、これ以外の検討項目に関して統計学的に有意な相関関係を認めた。

表 1 検討症例の詳細

	n	年齢	性別 (男：女)	剖検例：外科材料	肝重量 (g) (剖検例)	脾重量 (g) (剖検例)
IPH	17	64±13	6:11	17:0	882±367	374±197
ISC	12	72±8	2:10	11:1	782±235	401±216
ウイルス性肝炎/肝硬変	9	65±13	5:4	4:5	1114±359	429±186
組織学的正常肝	10	64±11	6:4	5:5	1144±472	136±57

考 察

今回の結果から、IPH では門脈枝の狭小化による門脈末梢血行不全（肝内の局所的な低酸素状態）から iNOS が誘導され、産生された NO は酸化ストレスとして作用し、肝星細胞の活性化から類洞の毛細血管化、さらに肝線維化を進行させる機序が考えられた。一方で、NO は血管拡張因子として類洞を拡張させ、これが肝内の微小循環の保持に働くことが示唆される。こうした変化によって、IPH から ISC に至る一連の病態が形成されている可能性がある。

IPH でみられる門脈域の線維化は、定型例では円形の緻密な線維性拡大を示し、また、IPH、ISC の肝実質の線維化は pericellular fibrosis、intralobular slender fibrous septa、slender fibrous septa from the portal tracts という 3 つの形態に大別することが可能である⁴⁾。活性化肝星細胞はコラーゲンを産生し、これらの肝実質線維化（コラーゲン沈着）に深く関与していると思われる。一方、IPH や ISC では門脈域や肝実質の線維化部位におけるエラスチン沈着が顕著な症例もしばしば経験されるが、肝内でのエラスチン沈着を肝星細胞活性化の観点から直接的に説明することは困難である。このように IPH、ISC における肝線維化の機序は一様ではないと思われ、今後、さらなる検討が必要である。

我々は以前、IPH の脾における脾洞内皮での iNOS の著明な発現亢進が、IPH の病態形成に関与していることを示した⁵⁾。今回の検討結果から、肝

においても特に類洞内皮での iNOS の発現亢進あり、これが肝線維化を含めた局所での病態形成に深く関与していることが示唆された。

結 語

IPH とその類縁疾患である ISC では、肝実質内での肝星細胞の活性化が高率にみられ、肝実質の線維化に深く関与している。この肝星細胞の活性化には、局所での血行動態の異常、類洞内皮における iNOS の発現亢進が関与している可能性がある。

文 献

- 1) Nakanuma Y et al.: Histopathology of the liver in non-cirrhotic portal hypertension of unknown aetiology. *Histopathology* 28: 195-204; 1996
- 2) Osei SY et al.: Immunohistochemical localization of hepatic nitric oxide synthase in normal and transgenic sickle cell mice: The effect of hypoxia. *Blood* 88: 3583-8; 1996
- 3) Schild L et al.: Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. *FASEB J.* 17: 2194-201; 2003
- 4) Nakanuma Y et al.: Pathology and pathogenesis of idiopathic portal hypertension with an emphasis on the liver. *Pathol. Res. Pract.* 197:

表 2 組織学的検討結果

	n	類洞拡張	α-SMA (肝星細胞活性化)	iNOS			CD34 (類洞毛細血管化)
				類洞内皮	肝細胞	クッパー細胞	
IPH	17	9 (53%)	14 (82%)	5 (29%)	5 (29%)	1 (6%)	8 (47%)
ISC	12	6 (50%) *	9 (75%)	7 (58%)	5 (42%) *	1 (8%)	8 (67%) *
ウイルス性肝炎/肝硬変	9	1 (11%)	9 (100%)	1 (11%)	6 (67%)	4 (44%)	3 (33%)
組織学的正常肝	10	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

*, $P < 0.05$.

5) Sato Y et al.: Significance of enhanced expression of nitric oxide synthases

in splenic sinus lining cells in altered portal hemodynamics of idiopathic portal hypertension. *Dig. Dis. Sci.* (in press)

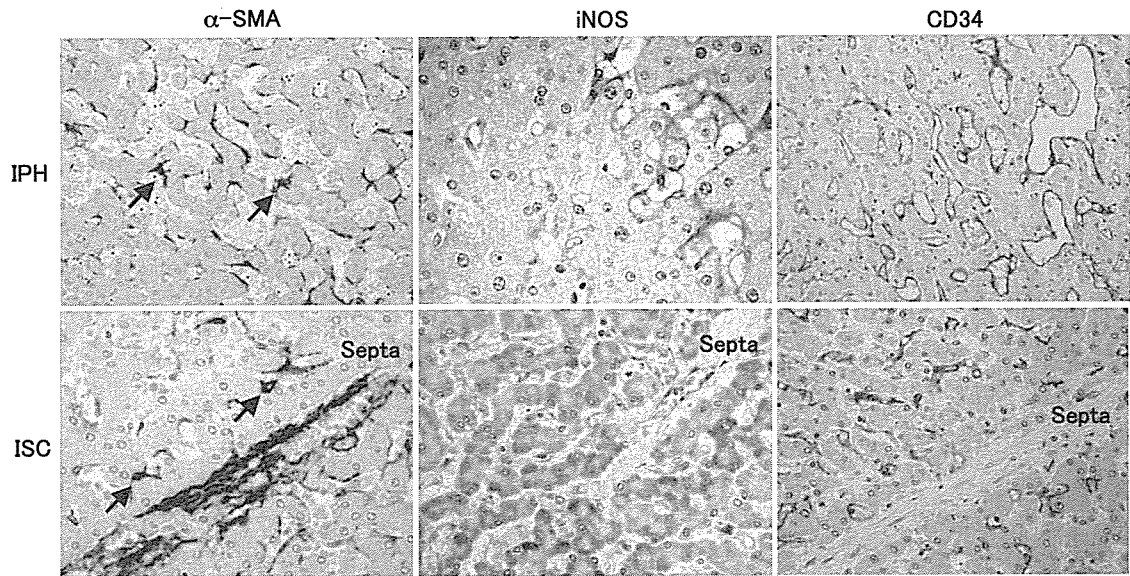


図1 IPHおよびISCにおける α -SMA、iNOS、CD34の発現。肝実質に α -SMA陽性を示す活性化肝星細胞(矢印)をみる。iNOSは類洞内皮(特に類洞拡張部)や肝細胞が陽性。類洞の毛細血管化(CD34陽性)も高頻度にみられる。免疫染色。

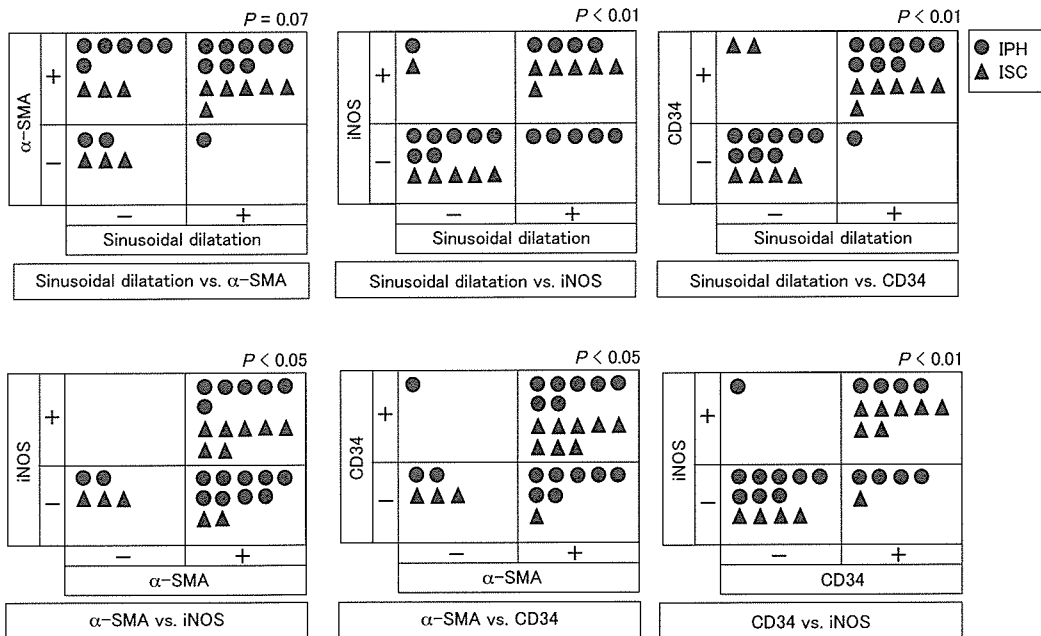


図2 IPHおよびISC(計29症例)における類洞の拡張、 α -SMA発現(肝星細胞活性化)、iNOS発現、CD34発現(類洞毛細血管化)の相関。

特発性門脈圧亢進症における免疫異常

—制御性 T 細胞との関連—

昭和大学医学部消化器内科学
井廻道夫

共同研究者
昭和大学医学部消化器内科学
馬場俊之

研究要旨

特発性門脈圧亢進症 (IPH) の病態には何らかの免疫異常の関与が推測されている。Th1/Th2 バランスは免疫調節の重要な概念であるが、IPH では Th1 への偏向が報告されている。Th1/Th2 バランスの調節には CD25⁺CD4⁺ 制御性 T 細胞 (Regulatory T cell, Treg) が重要な役割を果たしており、Th1 を負に制御していると考えられている。IPH において Th1 が優位であれば、Treg の頻度や機能に異常がみられることが予想される。FoxP3 (forkhead box protein P3) は Treg に特異的に発現しているマーカーであり、Treg のマスター制御遺伝子と考えられている。そこで肝内に浸潤している Treg、つまり FoxP3 陽性細胞と IPH 並びに各種肝疾患 (AIH、PBC、CH-C) との関連を検討した。IPH では各種肝疾患に比較し、肝浸潤単核球数、CD4 陽性細胞、FoxP3 陽性細胞の頻度が少なかった。肝組織内に浸潤している Treg はほとんど存在せず、IPH における免疫異常として、Treg の関与を積極的に示唆する結果は得られなかった。

はじめに

特発性門脈圧亢進症 (IPH) では自己抗体の出現 (39.4%)、高 γ グロブリン血症 (26.3%)、自己免疫疾患 (11.9%) の合併が認められ、特に SLE や慢性甲状腺炎の合併が多い¹⁾。以上のことから、IPH には免疫異常の関与が推測されているが不明な点が多い。これまでの研究では、原因としてスーパー抗原の関与が報告されている²⁾。何らかの要因により免疫状態が活性化すると、リンパ球系が活性化し、活性化 T 細胞³⁾、V β 9+T 細胞⁴⁾ が増加し、Th1 への偏向が認められる⁵⁾。一方、肝臓の網内系細胞では HLA-DR⁶⁾、VCAM-1 の発現が増強し⁷⁾、リ

ンパ球の接着、攻撃を受けやすくなる。このように免疫学的な機序に基づいて末梢門脈のつぶれ、線維化がおり、脾腫が生じると考察されている。

サイトカイン産生パターンの違いによって分類される Th1/Th2 バランスは、免疫調節の重要な概念である。ナイーブ CD4⁺T 細胞は、IL-12、IFN- γ 存在下に Th1 細胞に、IL-4、IL-10 存在下に Th2 細胞への機能分化する。Th1 細胞は CD8 陽性 T 細胞を活性化し細胞性免疫を、Th2 細胞は抗体を産生し体液性免疫を誘導する。また、Th1 細胞は IFN- γ を産生し Th2 細胞を、Th2 細胞は IL-4 や IL-10 を産生し Th1 細胞を相互に抑制し、Th1/Th2 バランスを維持している。Th1 への偏向は自己免疫疾患の発症に、Th2 への偏向はアレルギー

疾患の発症に関与する。

IPHにおけるTh1/Th2バランスに関する報告では⁵⁾、健常者の末梢血リンパ球、IPH患者の末梢血リンパ球、IPHの脾細胞におけるIL-4とIFN- γ の産生を検討すると、IFN- γ 産生に代表されるTh1反応は何れも変化が認められないが、IL-4産生に代表されるTh2反応はIPH患者の末梢血リンパ球、脾細胞で低下していたことから、相対的にTh1が優位とされている。

CD25⁺CD4⁺制御性T細胞(Regulatory T cell, Treg)は、Th1/Th2バランスの調節に重要な役割を果たしている⁸⁾。Tregを除去すると自己免疫疾患の発症することから、Tregは自己反応性T細胞を抑制し、免疫自己寛容の維持に関与していると考えられている。さらに、正常個体中のTregにおいて特異的に発現しているFoxP3遺伝子(forkhead box protein P3)は、ヒトおよびマウスの自己免疫性・炎症性疾患(IPEC症候群)では遺伝的に欠損しており、またNaïve T細胞にFoxP3遺伝子を導入すると、正常個体中のTregの表現型と類似したTregに転換されることから、FoxP3はTregのマスター制御遺伝子であると考えられている⁹⁾。

以上より、IPHでは免疫異常の関与が推測されており、Th1が優位であれば、Tregの頻度や機能に異常がみられることが予想される。今回、IPHにおける免疫異常とTregの関与を明らかにする目的で、FoxP3をマーカーに肝組織内に浸潤しているTregの頻度を検討した。

目 的

IPHにおける免疫異常、特にTregの関与を明らかにする目的で、IPHと各種肝疾患の肝組織内に浸潤しているTregの解析を行った。

対象と方法

対象は、IPH:20例、AIH:19例、PBC:21例、C型慢性肝炎(CH-C):27例、転移性肝癌の背景肝

組織(control):14例、合計101例である。

肝組織のパラフィン包埋切片を用い、CD4、CD8、FoxP3の免疫組織化学染色を行った。FoxP3の免疫染色は熱による抗原賦不活化処理を行い、一次抗体を500倍希釈した。顕微鏡下に門脈域を中心に200倍で3視野を観察し、平均細胞数を算出した。各陽性細胞の頻度は、総単核球数に対するCD4、CD8、FoxP3陽性細胞数の割合を算出し、百分率(%)で表した。

結 果

肝浸潤単核球数は、IPHでは $2.8 \pm 1.1\%$ に対し、AIHは $8.6 \pm 2.9\%$ 、PBCは $9.1 \pm 2.2\%$ 、CH-Cは $9.1 \pm 2.0\%$ 、controlは $5.4 \pm 2.0\%$ であり、各種肝疾患およびcontrolに比較し有意に低かった(Fig. 1)。

CD8陽性細胞は、IPH、各種肝疾患(AIH、PBC、CH-C)およびcontrolにおいてほぼ30%前後であり、有意差は認められなかった(Fig. 2)。一方、CD4陽性細胞は、IPHでは $7.1 \pm 5.1\%$ に対し、AIHは $36.5 \pm 9.9\%$ 、PBCは $46.5 \pm 10.4\%$ 、CH-Cは $44.0 \pm 9.2\%$ 、controlは $41.1 \pm 10.9\%$ であり、各種肝疾患およびcontrolに比較し有意に低かった(Fig. 2)。

FoxP3の免疫染色をFig. 3に示す。FoxP3陽性細胞、いわゆるTregは、IPHでは $0.2 \pm 0.4\%$ に対し、AIHは $5.3 \pm 2.3\%$ 、PBCは $7.3 \pm 3.5\%$ 、CH-Cは $6.4 \pm 4.0\%$ 、controlは $1.1 \pm 1.1\%$ であり、各種肝疾患およびcontrolに比較し有意に低かった(Fig. 4)。IPHではもともと浸潤細胞数が少数であり、FoxP3陽性細胞も少数であった。

考 案

今回の研究では、IPHは各種肝疾患に比較し肝浸潤単核球数の頻度が明らかに少なく、FoxP3陽性細胞もほとんど認められなかった。よって、IPHにおける免疫異常とTregの関与を積極的に示唆する結果は得られなかった。

各種肝疾患においてTregの細胞数減少や機能異

常は既に報告されている。AIHでは、健常者に比較して末梢血中のTregは減少し、Tregの機能異常が発症に関与している^{10, 11)}。PBCでも、AIHやHCV持続感染に比較して肝組織、末梢血中のTregは減少する。これには遺伝的背景が関与し、免疫寛容の破綻を起こしている¹²⁾。一方、HCV持続感染では健常者に比較して末梢血中のTregは増加し、HCV特異的T細胞の機能を抑制している^{13~15)}。各報告を参考にすると^{10~15)}、健常者の末梢血中のTregは2.3~6.8%であるが、自己免疫性肝疾患(AIH、PBC)では減少、HCV持続感染では増加するというのが一般的である。肝組織中のTregに関する報告は少ないが、AIH、PBCはHCV持続感染よりも少数であり¹²⁾、末梢血と同様の動態を示していると思われる。これらの肝疾患では、肝臓にリンパ球浸潤が認められ、その病態に深く関連している。IPHの病理組織所見は、肝硬変は認められず、門脈末梢枝の潰れを伴う肝線維化を特徴とし、また炎症細胞浸潤はほとんど認められない。よって、肝組織内のFoxp3陽性細胞の減少は、Th1反応が有意であることも考慮されるが、むしろ肝浸潤単核球が少ないことから、肝リンパ球浸潤が病態に関与していない可能性もある。

以上より、今後の研究課題として、IPHにおける免疫異常の存在の有無を含め、末梢血および脾臓内のTregの動態、機能解析としてサイトカイン産生などに注目することが必要であると考えている。

結 論

肝組織内に浸潤しているTregの解析では、Tregはほとんど存在せず、IPHにおける免疫異常とし

て、Tregの関与を積極的に示唆する結果は得られなかった。

参考文献

- 1) Saito K, et al. *Hepato-Gastroenterol.* 40: 163-166, 1993.
- 2) 門脈血行異常症調査研究班平成9年度研究報告: 3-5.
- 3) Tokushige K, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 7: 270-273, 1992.
- 4) Tokushige K, *Clin. Immunol. and Immunopathol.* 75: 206-213, 1995.
- 5) Tokushige K, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15: 1312-1317, 2000.
- 6) Terada T, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 115: 993-997, 1991.
- 7) Tokushige K, et al. *J. Gastroenterol.* 37: 1086-1089, 2002.
- 8) Sakaguchi S, et al. *J. Immunol.* 155: 1151-1164, 1995.
- 9) Hori S, et al. *Science* 299: 1057-1061, 2003.
- 10) Longhi MS, et al. *J. Hepatol.* 41: 31-37, 2004.
- 11) Longhi MS, et al. *J. Autoimmun.* 25: 63-71, 2005.
- 12) Lan RY, et al. *Hepatology* 43: 729-737, 2006.
- 13) Sugimoto K, et al. *Hepatology* 38: 1734-1448, 2003.
- 14) Cabrera R, et al. *Hepatology* 40: 1062-1071, 2004.
- 15) Boettler T, et al. *J. Virol.* 79: 7860-7867, 2005.

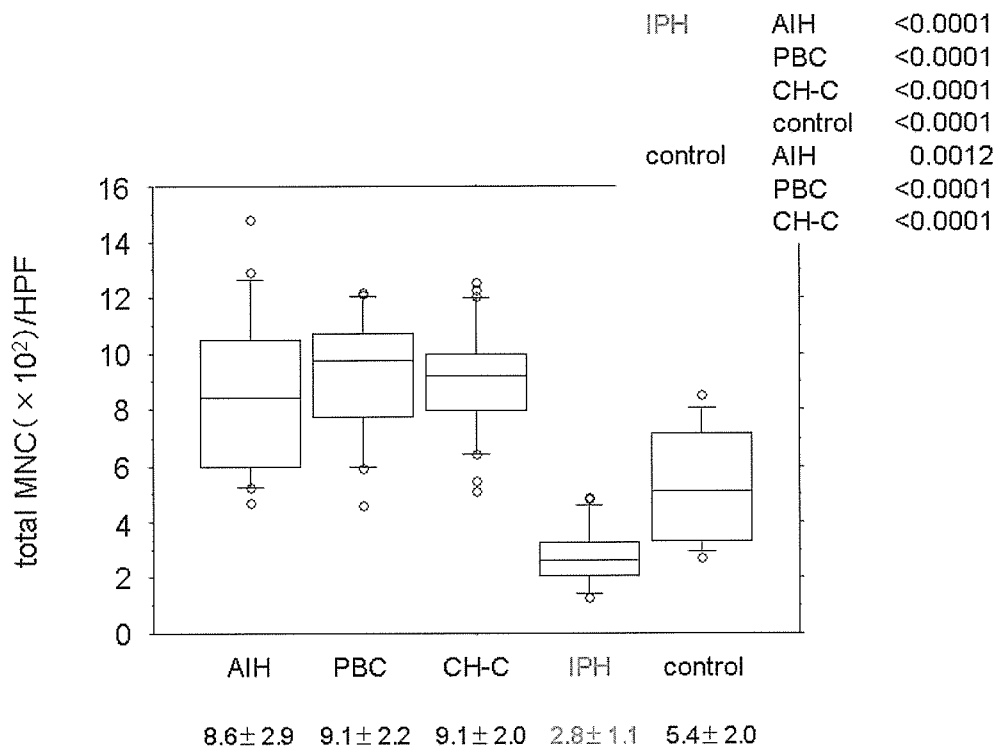


Fig. 1 肝浸潤単核球

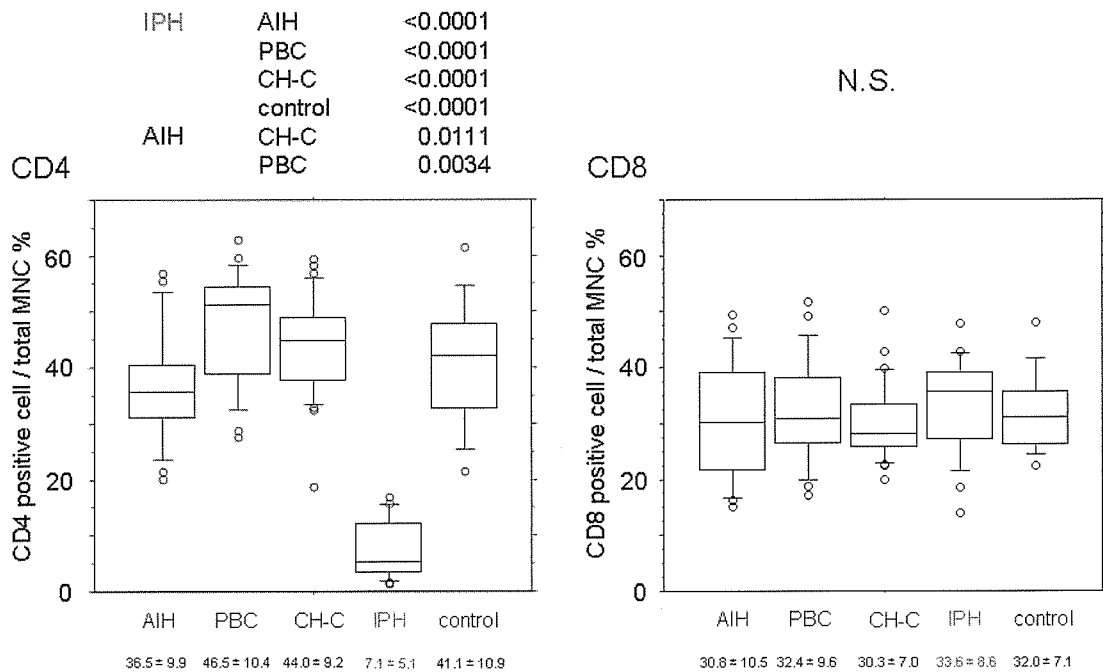


Fig. 2 CD4 および CD8 陽性細胞

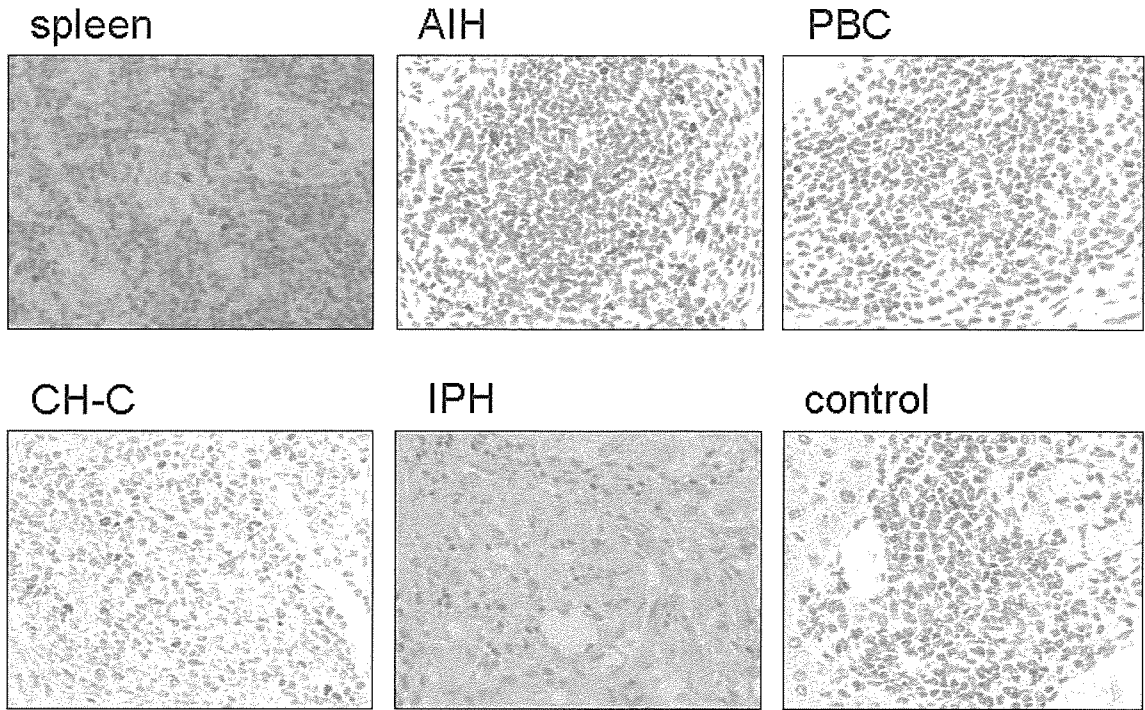


Fig. 3 FoxP3 免疫組織化学染色

(x400)

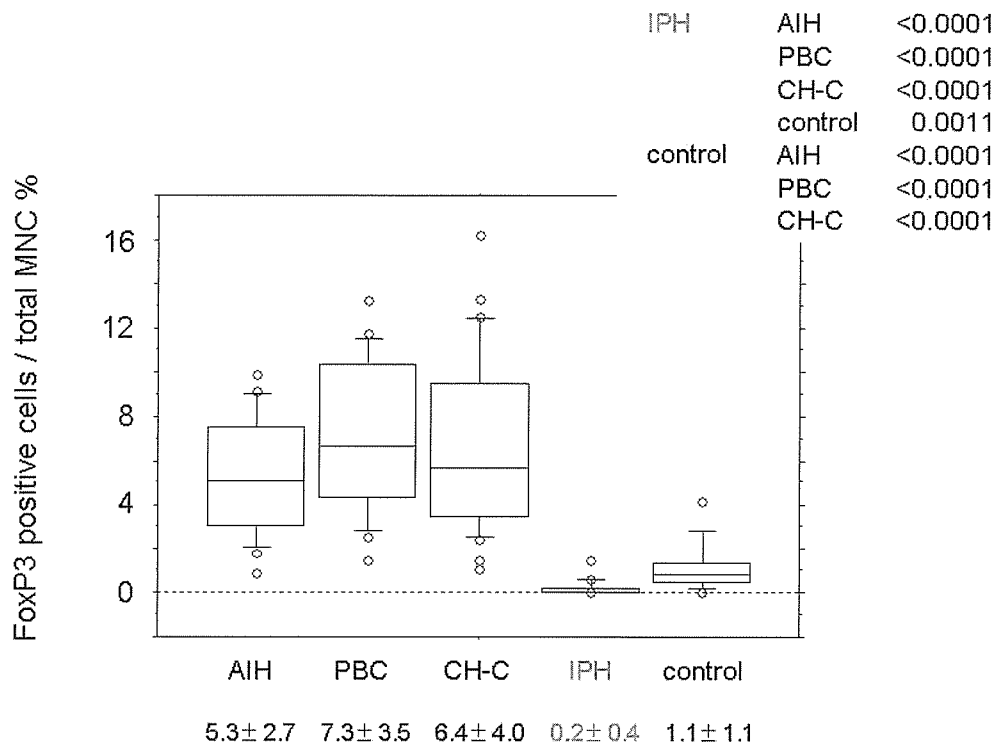


Fig. 4 FoxP3 陽性細胞