

III-2. 原発性胆汁性肝硬変分科会

10. 原発性胆汁性肝硬変全国調査 (第28報)	33
関西医科大学 内科学第三講座 講師 廣原 淳子	
11. 抗gp210抗体測定による原発性胆汁性肝硬変の予後予測	41
国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター センター長 石橋 大海	
12. ①門脈圧亢進症性PBCの臨床像と病態	44
②制御性樹状細胞とPBC治療	
愛媛大学大学院医学系研究科 先端病態制御内科学 教授 恩地 森一	
13. 沖縄県のPBCの遺伝および環境要因についての検討	46
琉球大学医学部 非常勤講師 佐久川 廣	
14. PBCの分子疫学	48
高知大学医学部 消化器内科学 教授 大西 三朗	
15. PBCにおける脂質代謝の検討: <i>in vivo</i> における核内レセプター活性評価方法の検討	50
東京医科大学霞ヶ浦病院 消化器内科 教授 松崎 靖司	
16. PBC患者肝の胆汁酸トランスポーターの変化とその相関-FXR, SHP, LXR, CYP7A1	52
福岡大学医学部 消化器内科 教授 向坂彰太郎	
17. 原発性胆汁性肝硬変症例の末梢血単核球遺伝子発現解析	54
金沢大学大学院医学系研究科 恒常性制御学 教授 金子 周一	
18. 原発性胆汁性肝硬変の重症度に関連する遺伝子の同定と予後診断への応用	56
県立長崎シーボルト大学看護栄養学部 栄養健康学科 教授 大曲 勝久	
19. フェニルブチレートによるトランスポーター安定化作用機構の解析	58
東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学 教授 杉山 雄一	
20. PBCにおける自己抗原反応性T細胞の解析 (健常者での自己抗原反応T細胞との比較)	60
九州大学大学院医学研究院臨床医学部門 病態修復内科学 助教 下田 慎治	
21. PBCの病態形成に関わる自然免疫異常の研究	62
帝京大学医学部附属溝口病院 第四内科 非常勤講師 宮川 浩	

22. 原発性胆汁性肝硬変におけるCpG DNA結合蛋白の解析	63
福島県立医科大学医学部 内科学第二講座 教授 大平 弘正	
23. ①原発性胆汁性肝硬変の新しい病期および活動度分類の提唱	65
②原発性胆汁性肝硬変の胆管病変の免疫病理学的解析	
金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学 教授 中沼 安二	
24. PBCの病態形成における細胞傷害性T細胞の研究	69
高知大学医学部 免疫学 教授 宇高 恵子	
25. 胆汁うっ滞性肝疾患の新規バイオマーカーの探索	70
東北大学病院 消化器内科 講師 上野 義之	
26. PBCにおけるコレステロール代謝関連遺伝子発現の検討	72
国立病院機構九州医療センター 消化器科 医長 中牟田 誠	
27. ①PSC患者におけるイムノプロット法を用いたp-ANCAの検出	74
②PBC患者の疲労度・QOLの国際比較	
③PSCの全国疫学調査	
帝京大学医学部 内科 教授 滝川 一	
28. 高齢発症の硬化性胆管炎の病態	78
東京大学大学院医学系研究科 消化器内科学 教授 小俣 政男	
29. 生体肝移植後PSC再発のリスク調査	81
京都大学医学部附属病院 臓器移植医療部 准教授 江川 裕人	

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

原発性胆汁性肝硬変全国調査（第28報）

研究協力者 廣原 淳子 関西医科大学 内科学第三講座 講師

研究要旨：本研究の目的は、原発性胆汁性肝硬変（PBC）全国調査の長期追跡症例の検討により、本邦におけるPBCの実態と予後の変遷を明らかにすることにある。2007年2月に実施した第13回PBC全国調査で、既登録症例 2064例と新規登録 954例の報告が得られ、総登録症例は 6676例となった。5年生存率は無症候性-PBC97.6%，症候性-PBC79.2%，10年生存率は各々92.9%，64.8%でありs-PBCの予後は前回調査時に比較してやや改善していた。PBC診断後経過中にHCCを発生した群は明らかに予後不良であった。肝細胞癌累積発癌率はPBC診断後15年で4.7%程度、組織学的病期の進展に伴い発癌率は有意に上昇した。経過中肝移植が施行された症例は103例あり、移植後生存率は5年生存率77%，10年生存率72%であった。

共同研究者

仲野 俊成 関西医科大学
大学情報センター医療情報部
關 壽人 関西医科大学 内科学第三講座
岡崎 和一 関西医科大学 内科学第三講座

A. 研究目的

本邦における原発性胆汁性肝硬変（primary biliary cirrhosis, PBC）の全国調査は1980年より実施され、その集計・解析を継続して行なってきた。今回は、2007年2月に実施した第13回全国調査の最終集計結果を報告するとともに、登録症例のうち経過中に肝細胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）を発症した例および肝移植例について解析を行った。

B. 方法

1. 研究方法

第13回PBC全国調査は、全国480の既登録施設に対し、2006年12月末までの既登録症例の予後調査と2004年1月から2006年12月末までに新たに診断された新規症例についてアンケート調査により報告を求め、これら臨床像と予後について解析した。なお、本調査は2～3年毎に実施してきたが、既登録症例の中には長期消息不明例が蓄積しているため今回は2000年以降の記録が確認されてない症例1064例を除外した既登録3737例を予後追跡調査の対象とした。予後解析の検討では、全登録症例6676例のうち解析可能であった5821例を対象とし生存率はKaplan-Meier法により解析し、統計学的解析にはSAS JMP Ver.5を用い、 $p<0.05$ を有意とした。

登録例における発癌症例の検討では診断時あるいは経過観察時においてHCC発生に関する情報が確認されており診断時にはHCCの合併のない症例3003例を対象とした。なお、B型、C型肝炎ウイルス感染例は解析対象から除外した。

2. 個人情報の管理

「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17日付け）告示以降の本研究にあたっては同告示を遵守し、「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」（厚生労働省、平成16年12月24日付け）に則り、研究グループ外に個人情報管理者を設置することを含めた厳格な個人情報管理システムを構築し、研究対象とした登録症例の個人情報漏洩等について十分な配慮を行った。第13回調査はこの個人情報管理システム構築後はじめての調査となったが、各登録施設の協力により同指針を遵守しかつ円滑に実施された。

C. 研究結果

- 第13回PBC全国調査の最終集計結果を以下に示す。
 - 各調査回の新規登録症例数および総症例数（表1）：既登録症例2064例（回収率55.2%）と新規登録954例の報告が得られ、登録症例総数は6676例となった。平均観察期間は77.5ヶ月である。

表1 調査回収別登録症例数

	新規登録例数	総調査例数
第1回調査（1980）	166	166
第2回調査（1982）	95	126
第3回調査（1984）	165	238
第4回調査（1987）	420	527
第5回調査（1989）	569	693
第6回調査（1990）	295	987
第7回調査（1992）	487	1310
第8回調査（1994）	711	2060
第9回調査（1996）	765	2526
第10回調査（1998）	707	2666
第11回調査（2001）	769	2539
第12回調査（2003）	630	3127
第13回調査（2006）	954	3018
		6676

- 2) 年次別発生数 (図1) および有病者数 (図2) と診断時臨床病期, 無症候性 (asymptomatic PBC : a-PBC), 症候性PBC (symptomatic PBC : s-PBC) の割合 : 1990年以降年間発生数は250例前後でほぼ横ばいであるが, 有病者数は漸増している。改訂された診断基準 (肝臓46 : 232-233, 2005) に基づく診断時臨床病期a-PBCの占める割合は今回の調査対象である2004-2006年の新規症例では70%以上となっている。
- 3) 年齢構成および性別 (図3) : 男女比721 : 4996 (1 : 6.9), 診断時平均年齢55.5±11.2歳 (男性58.4±11.9歳, 女性55.1±11.2歳) であった。好発年齢層が50-60歳代中心であることや男女比にも大きな変化は認められない。
- 4) 自己抗体陽性頻度 : 抗ミトコンドリア抗体 (蛍光抗体法) antimitochondrial antibody:AMA) 陽性率は84.3%, 抗核抗体 (antinuclear antibody : ANA) 45.5%, 抗平滑筋抗体 (antismooth muscle antibody:ASMA) 5.0%で, 抗ミトコンドリア抗体 (ELISA法) 陽性率は74.4%であった。また蛍光抗体法またはELISA法いずれかの方法で抗ミトコンドリア抗体陽性であったのは87.8%であった (表2, 3)。
- 5) 自己免疫疾患の合併頻度 (表4) に既報と差異はない。
- 6) 診断時に合併する悪性腫瘍は3.2%でありその内訳と頻度は (図4) に示すごとくで, 肝細胞癌の合併は悪性腫瘍のうち26%を占める。
- 7) Scheuer分類による診断年次別の肝生検組織学的病期 (図5) の割合に, 大きな変化はない。
- 8) 13回調査時点での新規および追跡症例の投与薬物を (図6) に示す。ウルソデオキシコール酸単独61.6%, ベザフィブラートとの併用14.8%, ステロイドとの併用は3.6%であった。
- 9) 予後 (表6) と死亡年次別にみた死亡例数と死因 (図7) : 1029例の死亡例が報告され, 肝不全と消化管出血が主たる死因であった。なお, 経過中に103例の肝移植の報告があった。
- 10) 臨床病期別症例数とその転帰 (表7) : 診断時a-PBCのうち最終確認時まで無症候であったのは82.3%でありその99%は最終確認時まで生存していた。
- 11) 診断時臨床病期別生存率 : 診断時a-PBC4109例, s-PBC1712例について各々の5年生存率は97.6%, 79.2%, 10年生存率は92.9%, 64.8%, 20年生存率は81.2%, 49.9%であり, 各群相互間に $p < 0.0001$ で有意差が認められた (図8)。

2. HCC発生症例の検討

- 1) 解析対象となった3003例中, 経過中HCCが発生した症例は53例であった (平均観察期間81.5ヶ月)。診断時臨床所見をHCC発生群と非発生群について比較検討した結果を (表8) に示す。男女比, 年齢, アルブミン値, 組織学的病期, 症候性

の有無の項目に有意差が認められた。

- 2) 予後 : HCC発生群とHCC非発生群について予後を (表9) に, 各々の生存率を (図9) に示す。HCC発生群の死因では癌死が55%を占めた。HCC発生群とHCC非発生群における5年生存率は91.7%, 98.5%, 10年生存率は各々75.8%, 97.0%であり, 両群間に明らかな有意差が認められた ($p < 0.0001$)。
- 3) 累積発癌率はPBC診断後10年で2.2%, 15年で4.7%であった (図10)。診断時組織学的病期別 (Scheuer分類I~IV期) にみた累積発癌率の検討では各病期群間に有意差が認められた (図11)。
- 4) HCC発生例における症候の発現に関する検討 : HCCを発生した群ではPBC診断時56%が無症候であったが, 観察終了時まで無症候のまま経過したものは5%程度であった。HCC発生前の各症候の発現の頻度は搔痒感91%, 食道胃静脈瘤82%, 消化管出血70%, 黄疸65%, 腹水55%, 浮腫52%, 肝性脳症36%であった。

3. 肝移植例の予後追跡調査

- 1) 経過中に103例 (既登録症例中90例, 新規登録例中13例) の肝移植の報告があった。男女比は8:95 (1 : 11.9), 移植時平均年齢は50.7±8.5歳であった。移植方法は脳死肝移植4例, 生体肝移植87例, 不明12例であった。生体肝移植のドナー続柄は記載のあった82例中, 子供44例, 兄弟姉妹17例, 配偶者17例, 非血縁者2例, 他血縁者1例, ドミノ1例, 両親0例であった。予後 (不明を除く92例, 移植後観察期間45.4ヶ月) は生存68名, 死亡24例 (死因 : 肝不全6例, 感染症4例, 拒絶反応3例, 消化管出血1例, 他病死10例) であった。
- 2) 肝移植後生存率は, 5年生存率77%, 10年生存率72% (各々脳死肝移植100%, 100%, 生体肝移植76%, 71%) であった (図12)。

D. 考 察

第13回PBC全国調査の実施により総登録症例は6676例が得られたが, 性差, 好発年齢, 自己抗体陽性頻度, 合併症などにはこれまでの報告と大きな差異は認められなかった。また年間発生数がほぼ一定であるのに対し有病者数の増加が顕著であるという数年来の疫学的動向も同様である。死亡例数は減少傾向にあることは明らかであり, その他の死因による死亡数が増加していることと肝細胞癌による癌死が死因となった例もみられることが最近の傾向である。第12回調査結果 (第26報) で5年生存率a-PBC97.5%, s-PBC77.6%, 10年生存率は各々92.1%, 61.7%であったのに対し, 今回の調査結果では5年生存率a-PBC97.6%, s-PBC79.2%, 10年生存率は各々92.9%, 64.8%とa-PBCの予後に変化はないがs-PBCの予後は若干改善の傾向にあり, 種々の内科的治療が及ぼす効果と考えられる。本調査における登録例においても肝細胞癌合併例の

報告が集積されつつある。既に診断時HCC合併例に関して報告してきたが（第26, 27報）、今回は経過中HCCを発症した症例について解析をすすめた。HCC発生群では、診断時の年齢および性別の検討では高齢の男性患者例が多く、組織学的病期また臨床病期の進展した症例に多い傾向が認められた。累積発癌率の検討でも診断時組織学的病期進展に伴って発癌率が上昇する結果が得られた。ウイルス性肝炎からの発癌と同様に診断時年齢と性別が危険因子であり、病期の進展とともに発癌の危険性が高まることが推定される。PBCには門脈圧亢進症症状が先行する病型があることまたそれらの病型とHCC発生との関連性についての報告がみられる（当研究班平成18年度総括・分担報告書p69-70, 2007）。全国調査例においてHCCの発生と病態の進行との関連性について肝障害に基づく各症候の発現時期を検討したところ、HCCの発生前に特に食道胃静脈瘤が発現する例が多く、発癌との関連からみて興味深い点である。

PBC全国調査において年次別死亡数は明らかに減少しているが、内科的治療効果に加えて肝移植例の増加が寄与しているものと考えられる。日本肝移植研究会からの2005年末までの集計肝移植症例登録報告によれば（移植 41：599-608, 2006）PBCの肝移植例数は352例（脳死2例、生体350例）で、生体肝移植例の5年生存率75.2%、10年生存率73.6%とされており、本調査でもほぼ同様の成績であった。今後肝移植症例の手術前後のデータ解析をさらに進める予定である。

E. 結 論

第13回PBC全国調査で、既登録例2064と新規登録954例の報告が得られ、総登録症例は6676例となった。5年生存率はa-PBC 97.6%、s-PBC 79.2%、10年生存率は各々92.9%、64.8%でs-PBCの予後は前回調査時に比較してやや改善している。PBC診断後経過中にHCCを発生した群は明らかに予後不良であった。肝細胞癌の累積発癌率はPBC診断後15年で4.7%であり、組織学的進展に伴い発癌率は有意に上昇した。肝移植症例は103例で、移植後生存率は5年生存率77%、10年生存率72%であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 廣原淳子, 仲野俊成, 關壽人, 他: 原発性胆汁性肝硬変の全国調査からみた他臓器疾患との関連, 消化器科 45: 652-657, 2007.

2. 学会発表

1) 廣原淳子, 仲野俊成, 關壽人, 他: 原発性胆汁性肝硬変全国調査における肝細胞癌合併例の予後規定因子に関する検討. 第43回日本肝臓学会総会, 東京, 2007.

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

図1 年次別発生数

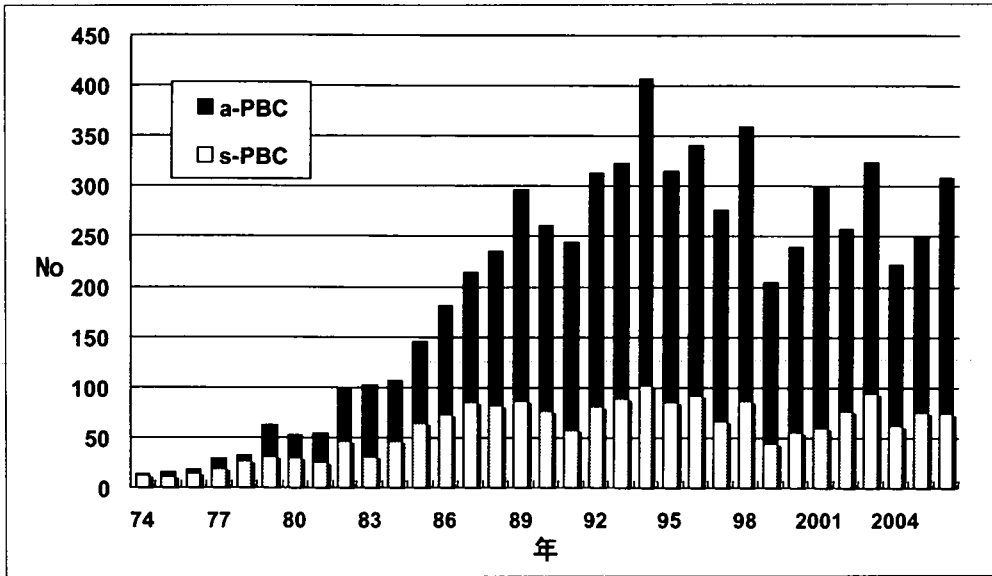


図2 年次別有病者数

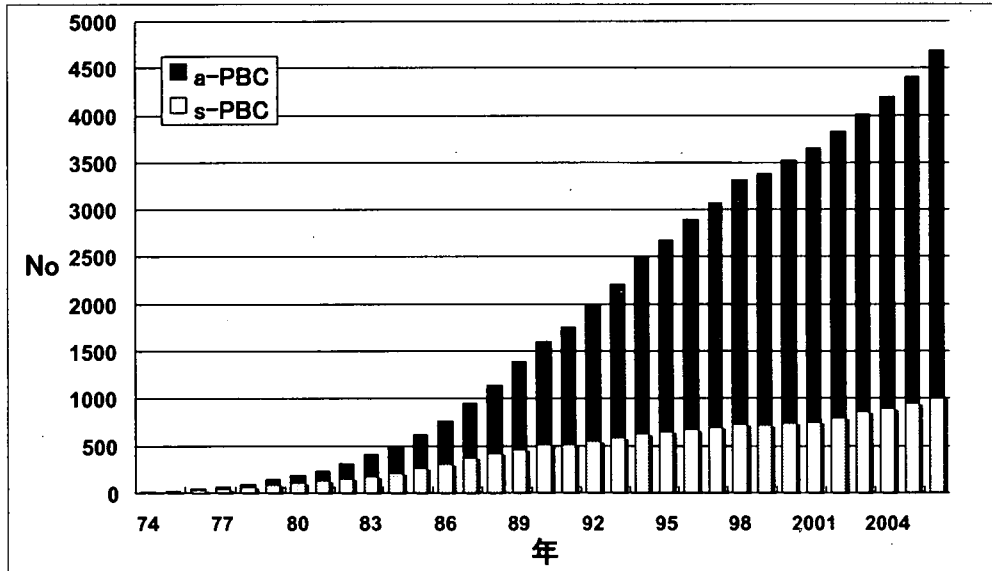


図3 年齢構成および性別

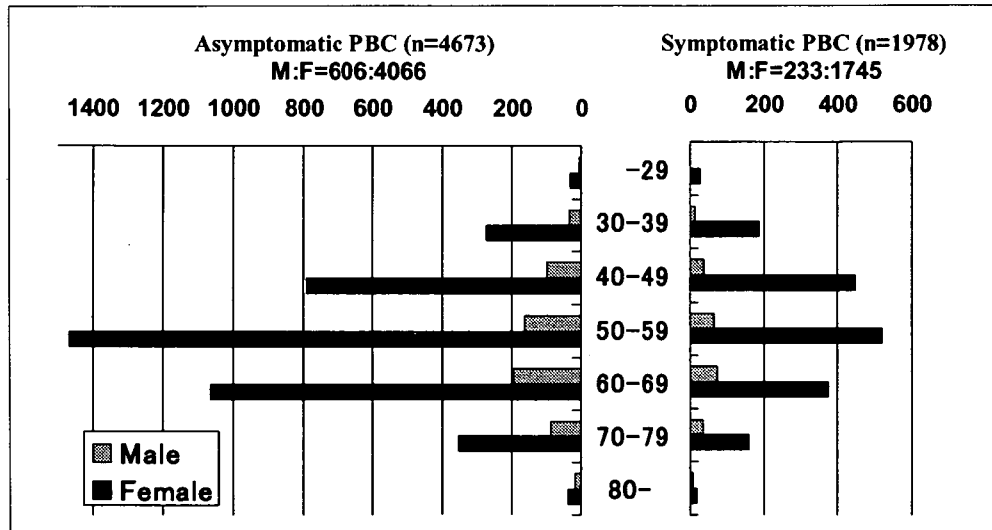


表2 自己抗体の陽性頻度

	抗ミトコンドリア抗体 (蛍光抗体)		Total
	(+)	(-)	
ANA	(+)	2093 (36.3)	2640 (45.5)
	(-)	2763 (48.0)	
ASMA	(+)	165 (2.9)	290 (5.0)
	(-)	4691 (81.4)	
Total	4856 (84.3)	906 (15.7)	5762 (100.0)

表3 抗ミトコンドリア抗体の陽性頻度

(第7～13回調査例で両者が測定されている2089例)

	蛍光抗体法		Total
	(+)	(-)	
ELISA	(+)	1407 (67.4)	1554 (74.4)
	(-)	281 (13.5)	
Total	1688 (80.8)	401 (19.2)	2089 (100.0)

表4 自己免疫疾患の合併 (記載のあった6202例)

Sjögren症候群	802例 (12.9%)
橋本病	401例 (6.5%)
関節リウマチ	231例 (3.7%)
Raynaud現象	192例 (3.1%)
強皮症	148例 (2.4%)
潰瘍性大腸炎	17例 (0.3%)

図4 診断時悪性腫瘍の内訳 (198/6202例, 3.2%)

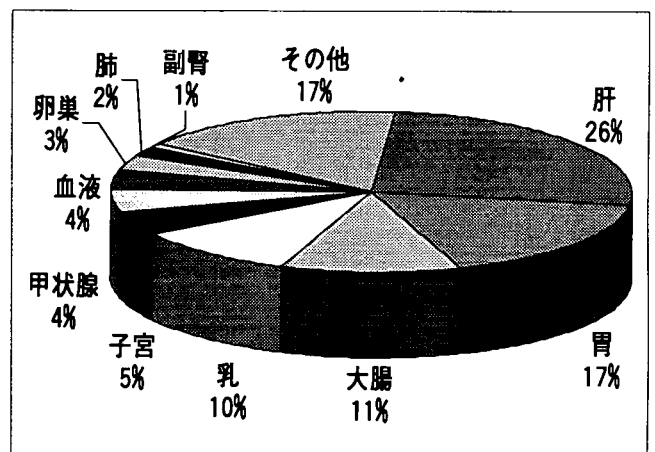


図5 肝組織学的病期 (Scheuer分類)

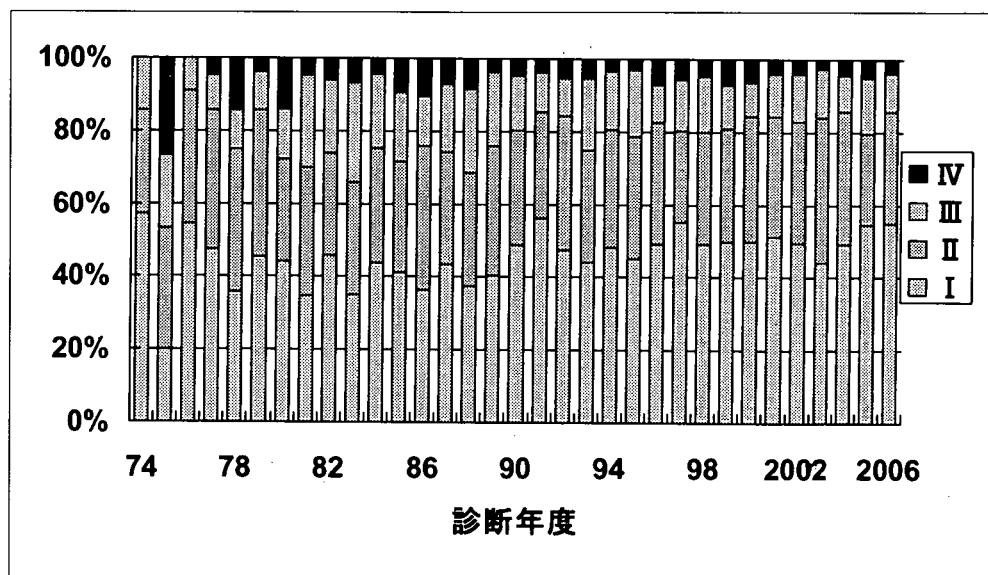


図6 第13回調査時における治療薬物（記載のあった3021例）

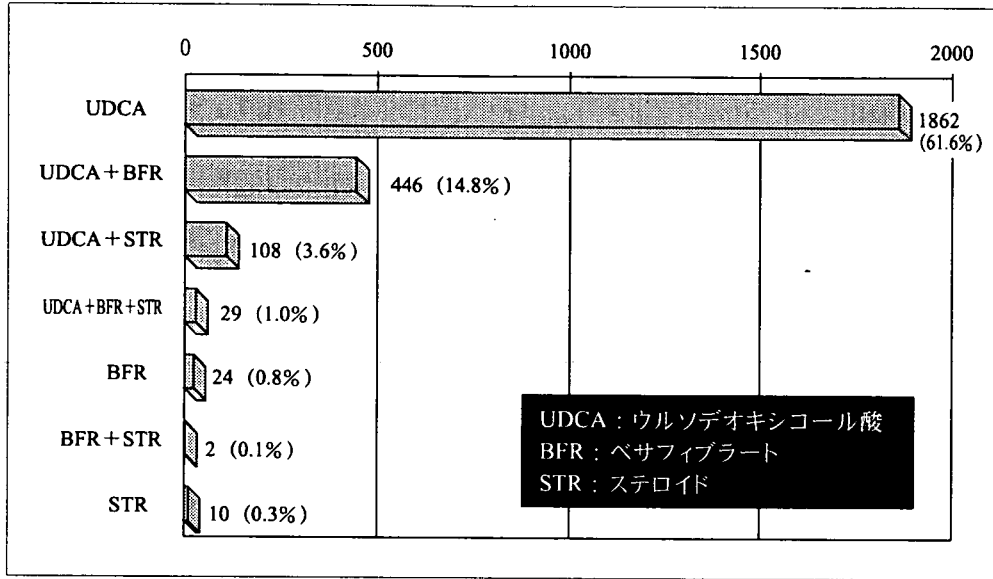


表6 予後（不明を除く5251例）

生存中	4119例
死亡	1029例
肝不全	547例
消化管出血	138例
肝不全+消化管出血	13例
肝細胞癌	20例
その他	311例
肝移植	103例

表7 臨床病期の推移別症例数とその転帰

診断時病期	最終確認病期	症例数 (%)
	a	生存/死亡 s
a (n=4325)	3560 (82.3)	765 (17.7)
	3522/38	596/169
s (n=1769)	611 (34.5)	1158 (65.5)
	600/11	748/410

図7 死亡年次別にみた死因

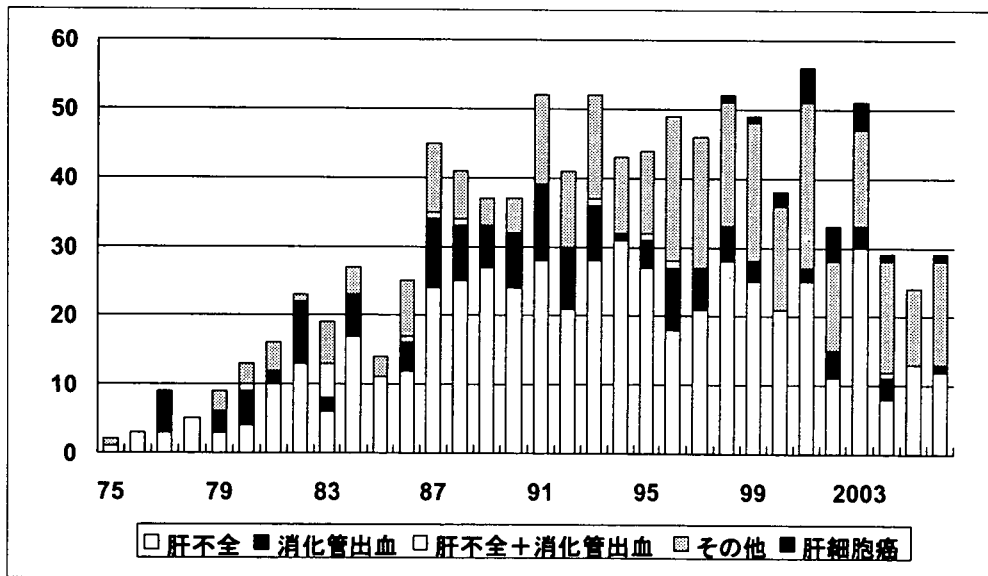


図8 診断時臨床病期別生存率

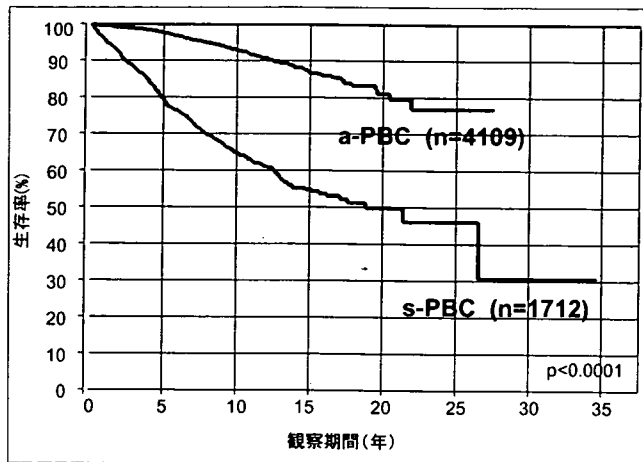


表8 HCC発生群と非発生群における診断時臨床所見

	HCC (+)	HCC (-)	p
N	53	2950	
Sex (M:F)	15:38	350:2600	0.0014
Age (Mean±SD)	60.47±9.86	55.7±11.0	0.0020
T-Bil. (Mean±SD)	1.46±1.83	0.96±1.46	0.0723
Alb (Mean±SD)	3.75±0.55	4.06±0.49	<0.0001
T-cho (Mean±SD)	204.9±62.7	217.2±70.1	0.1503
Histology (I/II/III/IV)	8/14/10/6	1111/712/277/64	<0.0001
Use of UDCA (%)	84.6	89.3	0.3712
Stage (a:s)	30/23	2237/713	0.0024

表9 予 後

	HCC発生群 (不明を除く50例)	HCC非発生群 (不明を除く2612例)
生存中	28	2472
死 亡	20	129
肝不全	6	66
消化管出血	1	2
肝不全+消化管出血	0	7
肝細胞癌	11	0
その他	2	54
肝移植	2	11

図9 HCC発生群と非発生群の生存率

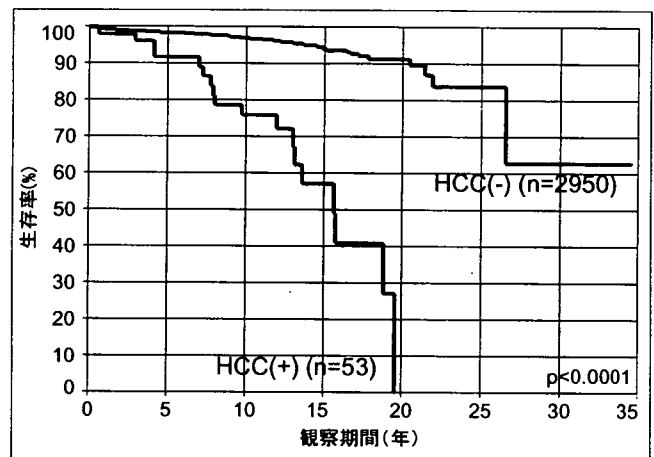


図10 累積発癌率

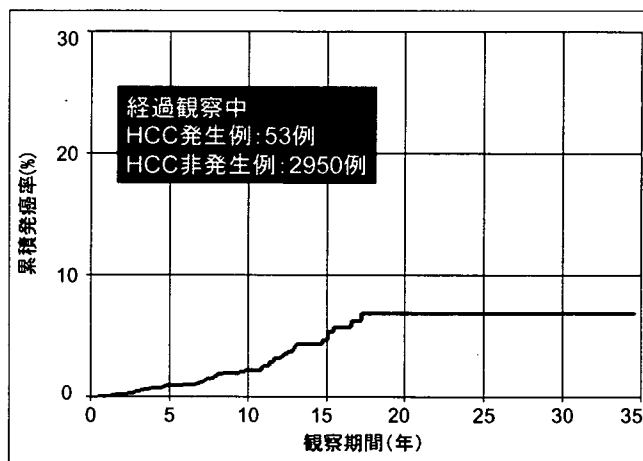


図11 診断時組織学的病期別の累積発癌率 (Scheuer分類)

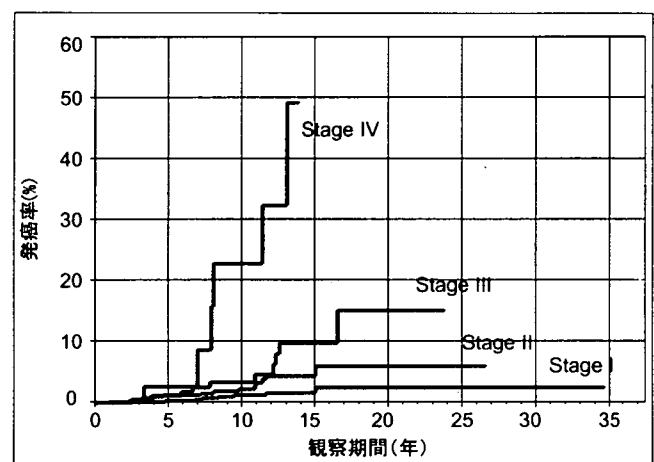
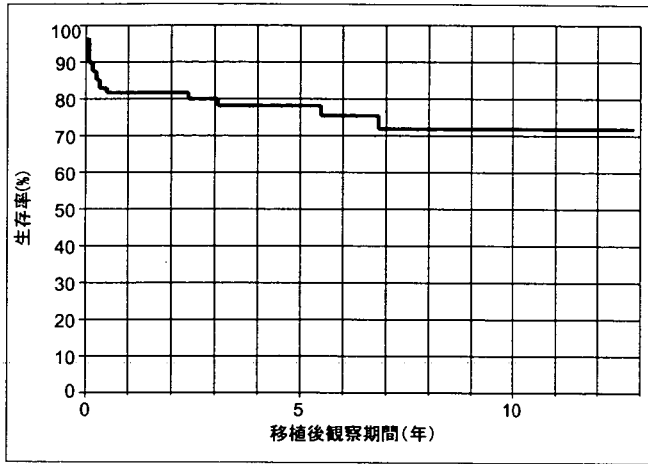


图12 肝移植後生存率 (89例)



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

抗gp210抗体測定による原発性胆汁性肝硬変の予後予測

研究協力者 石橋 大海 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター センター長

研究要旨: 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) には、長期間経過を観察してもほとんど進行しない症例 (予後良好群) から、黄疸、肝硬変、肝不全へ進行し肝移植以外に救命方法がない症例 (予後不良群) までさまざまな重症度の症例が存在する。しかし、PBCの発症早期に、これらの予後良好群と不良群を鑑別するための有用なバイオマーカーは知られていなかった。我々は、PBCの予後予測に有用な血清バイオマーカーを同定することを目的として、国立病院機構肝疾患共同研究グループ (NHOSLJ) を組織して多施設共同研究を行い、①抗gp210抗体はPBCに極めて疾患特異性が高い自己抗体であり、抗ミトコンドリア抗体陰性PBCの診断に有用であること、②抗gp210抗体が陰性あるいは治療により陰性化した症例は予後良好であるのに対し、抗gp210抗体が持続陽性の症例は予後不良であること、③抗gp210抗体が肝不全型進行の強い危険因子であるのに対して、抗セントロメア抗体は門脈圧亢進症型進行の危険因子であることを明らかとした。

共同研究者

中村 稔 長崎医療センター 臨床研究センター
小森 敦正 長崎医療センター 臨床研究センター
右田 清志 長崎医療センター 臨床研究センター

A. 研究目的

PBCの予後予測に有用な血清バイオマーカーを同定する。

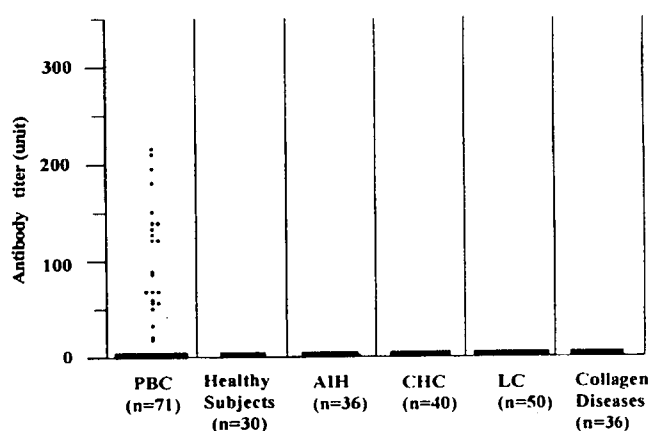
B. 研究方法

国立病院機構肝疾患共同研究グループ (23施設) を組織し、PBCの予後予測に有用な血清バイオマーカーを同定することを目的として多施設共同研究を行った。PBCの患者登録、定期的血清保存、患者情報の提供は、各参加施設で倫理審査委員会の承認を得た後に、原則として患者から書面での同意を得た後に行った。血清中の抗gp210抗体、抗セントロメア抗体は、長崎医療センター臨床研究センターで一括して測定した。統計解析は長崎大学原研情報施設に依頼した。

C. 研究結果

① 抗gp210抗体はPBCに極めて疾患特異性が高い自己抗体であり (疾患特異性100%, 感受性20-30%), 抗ミトコンドリア抗体陰性PBCの診断にきわめて有用であった (図1)。②抗gp210抗体が陰性あるいは治療により陰性化した症例は予後良好であるのに対し、抗gp210抗体が持続陽性の症例は予後不良であった (図2)。③抗gp210抗体が肝不全型進行の強い危険因子 (OR:33.8, 95% CI:5.9,636.7) であるのに対して、抗セントロメア抗体は門脈圧亢進症型進行の危険因子 (OR:4.2,95% CI:1.3, 14.8) であった (表1)。④病理学的には、抗gp210抗体がinterface hepatitisの程度と、抗セントロメア抗体がductular reactionの程度と有意に相関していた。

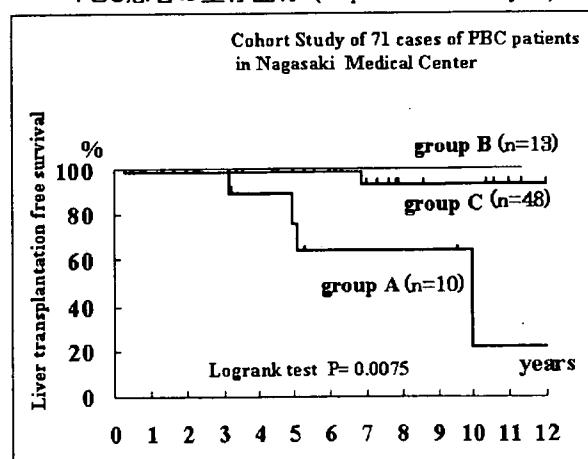
図1 各種疾患におけるgp210-C未ペプチドに対する血清抗体価



(Nakamura M et al J.Hepatol 2005;42:386-392)

図2 抗gp210抗体の有無による予後

PBC患者の生存曲線 (Kaplan-Meier analysis)



group A : anti-gp210 antibodies sustained at a high level
group B : anti-gp210 antibodies decreased to negative or low level
group C : anti-gp210 antibodies negative

(Nakamura M et al J.Hepatol 2005; 42:386-392)

表1 病期の進展に関わる危険因子

Variables	Odds ratio (95% confidence interval) for progression		
	total	portal hypertension type progression	hepatic failure type progression
sex, male	—	—	—
age (one year ¹)	—	1.078 (1.009–1.159)	—
anti-gp210 + ve	7.086 (2.649–20.206)	—	33.777 (5.930–636.745)
anti-centromere + ve	4.486 (1.659–12.778)	4.202 (1.307–14.763)	—
anti-sp100 + ve	—	—	—
anti-chromatin + ve	—	—	—

Unconditional step-wise logistic regression analysis of 217 cases of PBC patients in National Hospital Organization Study Group for Liver Disease in Japan (NHOSLJ)

(Nakamura m et al, Hepatology 2007;45:118-127)

D. 考 察

以上のことから、抗gp210抗体測定は、PBCの予後予測だけでなくPBCの新しい病型分類にも有用であることが明らかとなった。今後は、症例数を増やしてこれらのデータの再現性を検証するとともに、PBCの予後に関する新しい血清および遺伝子バイオマーカーを同定する必要がある。

E. 結 論

抗gp210抗体はPBCの予後予測にきわめて有用な血清バイオマーカーであることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura M, Funami K, Komori A, et al : Increased expression of toll-like-receptor 3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers. *Hepatol Int* : in press, 2008.
- 2) Nakamura M, Komori A, Ito M, et al: Predictive role of anti gp210 and anticentromere antibodies in long-term outcome of primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 37 : S412-S419, 2007.
- 3) Nakamura M, Kondo H, Mori T, et al : Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 45 : 118-127, 2007.
- 4) Nakamura M : Anti-gp210 antibody mirrors disease severity in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 45 : 1583-1584, 2007.
- 5) Kawano A, Shimoda S, Kamihira T, et al:

Peripheral tolerance and the qualitative characteristics of autoreactive T cell clones in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 179 : 3315-3324, 2007.

- 6) Migita K, Maeda Y, Abiru S, et al: Polymorphisms of interleukin-1 beta in Japanese patients with hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 46 : 381-386, 2007.
- 7) Komori A, Nakamura M, Fujiwara S, et al : Human intrahepatic biliary epithelial cell as a possible modulator of hepatic regeneration: Potential role of biliary epithelial cell for hepatic remodeling in vivo. *Hepatol Res* 37 : S438-443, 2007.
- 8) Migita K, Abiru S, Maeda Y, et al : Elevated serum BAFF levels in patients with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol* 68 : 586-591, 2007.
- 9) Shimoda S, Ishibashi H, Harada M : Autoreactive T-cell responses in primary biliary cirrhosis are proinflammatory whereas those of controls are regulatory. *Hepatol Res* 37 : S396-401, 2007.
- 10) Ishibashi H, Komori K, Shimoda S, et al: "Lymphocytes and liver: domestic bliss or dangerous liasons?" #7 Guidelines for therapy of the chronic inflammatory liver diseases. *Seminars in Liver Disease* 27 : 214-226, 2007.
- 11) Ishibashi H : Editorial: Liver and immune disorder. *Hepatol Res* 37 : S309, 2007.
- 12) Ishibashi H, Shimoda S, Nakamura M, et al : Chapter 34 Autoimmune Diseases in Transplanted Livers. ME Gershwin, JM Vierling, MP Manns ed, *Liver Immunology-Principles and Practice*, 451-457, Human Press, Totowa, 2007

- 13) 中村稔, 小森敦正, 伊東正博, 他: 抗核抗体による原発性胆汁性肝硬変の新しい分類-肝不全型(gp210 type)と門脈圧亢進型(centromere type). 小俣政男編, 消化器発癌における炎症, 再生, 細胞応答の役割. 第14回浜名湖シンポジウム, 168-172, アークメディア, 東京, 2007.
 - 14) 中村稔, 下田慎治, 小森敦正, 他: 原発性胆汁性肝硬変における抗ミトコンドリア抗体と抗核抗体の意義-自己免疫疾患と抗細胞質抗体- 山本一彦, 高崎芳成, 三森経世, Jack D. Keen編, 自己抗体と自己免疫, 44-51, 2007.
2. 学会発表
- 1) Nakamura M: PBC update-Postgraduate course lecture in Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Kyoto, 2007.
 - 2) 中村稔, 相葉佳洋, 小森敦正, 他: 自己抗体, HLA, サイトカインSNPsによる原発性胆汁性肝硬変の予後不良群の早期診断. 第43回日本肝臓学会総会, 東京, 2007.
 - 3) 相葉佳洋, 松山睦美, 小森敦正, 他: 日本人原発性胆汁性肝硬変患者のHLAとサイトカインの遺伝子多型. 第35回日本臨床免疫学会総会, 大阪, 2007.
 - 4) Nakamura M, Kondo H, Aiba Y, et al: Genetic polymorphism of HLA-DR and cytokine genes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. - HLA-DRB1*0405 confers susceptibility to gp210-type progression of PBC - The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2007.
 - 5) Aiba Y, Matsuyama M, Komori A, et al: Genetic polymorphism of HLA-DR and cytokine genes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. 第37回日本免疫学会総会, 東京, 2007.

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

①門脈圧亢進症性PBCの臨床像と病態

②制御性樹状細胞とPBC治療

研究協力者 恩地 森一 愛媛大学大学院医学系研究科 先端病態制御内科学 教授

研究要旨：①本研究では、門脈圧亢進症の一症候である脾腫とPBCの病態の関係を明らかにする目的で解析を行った。当科にて経過観察中に腹部造影CT検査を行ったPBC77例についてCT画像を用いて肝容積・脾容積を計測し、その容積比（LV/SV比）を求めた。LV/SV比<6.5（LV/SV low群）では、LV/SV \geq 6.5（LV/SV high群）に比し、生命予後が不良であった（ $p=0.0008$ ）。また、多変量解析では、血清総ビリルビンとLV/SV比がPBCの予後に関与する因子であった。

②制御性樹状細胞を用いて標的抗原が明らかである自己免疫疾患の動物モデル（自己免疫性胃炎モデル）での基礎検討を行った。制御性樹状細胞の投与により、病変部の組織学的改善と自己抗体価の低下がみられ、本療法が自己免疫疾患の治療に有用である可能性が示唆された。

共同研究者

阿部 雅則 愛媛大学大学院医学系研究科
先端病態制御内科学
村田 洋介 愛媛大学大学院医学系研究科
先端病態制御内科学

①門脈圧亢進症性PBCの臨床像と病態

A. 研究目的

当教室では、食道・胃静脈瘤が皮膚掻痒感・黄疸に先行するPBC（p-PBC）では、無症候性PBC（a-PBC）に比し予後不良であること、a-PBCや皮膚掻痒感・黄疸が先行した症候性PBC（s-PBC）に比し、HCCの合併率が有意に高いことを報告した。今回、門脈圧亢進症状の一つである脾腫とPBCの病態との位置づけを解析することを目的で以下の検討を行った。

B. 研究方法

当科にて診断、経過観察を行い、経過観察中に腹部造影CT検査を行っているPBC症例77例を対象とし、腹部造影CTより測定した肝容積、脾容積を測定した。肝・脾容積比（LV/SV比）が6.5未満（LV/SV low）と6.5以上（LV/SV high）の2群に分けて、その臨床像や予後を解析した。

C. 研究結果

LV/SV low群では、① s-PBCの割合が多かった。② 白血球数や血小板数が低かった。③ 血清アルブミンやコリンエステラーゼが有意に低く、総ビリルビン、AST、血清IgGが有意に高かった。両群の予後を解析したところ、LV/SV low群ではLV/SV high群に比し、予後不良であった（ $p=0.0008$ ）。

Cox比例ハザード解析でPBCの予後に関与する因子は総ビリルビン値とLV/SV比であった。

D. 考察

当教室においては、門脈圧亢進症状としての食道・

胃静脈瘤とPBCの病態について報告を行ってきた。今回は、門脈圧亢進症を反映する項目のうち非侵襲的であり、容易に評価できる画像所見である脾腫に着目した。現在まで、PBCの予後は、年齢、症候、血液検査、組織像との関係で解析されてきたが、画像所見を用いた検討はみられない。

今回の検討で、CT画像を用いて測定したLV/SV比が低値（脾腫が著明）である症例は、予後不良であることが明らかとなった。また、LV/SV比がPBCの予後を規定する因子の一つであることも示した。今後は、症例数を蓄積し、prospectiveな解析をすすめていくこととしている。

E. 結論

CT画像を用いたLV/SV比の計測は、PBCの予後を推測するのに有用であることが示された。

②制御性樹状細胞を用いたPBC治療

A. 研究目的

当教室では、PBCにおいて、樹状細胞（DC）の機能異常があることを報告してきた。DCは生体内で免疫応答の反応指向性を調節する重要な役割を担っている。近年、免疫寛容を誘導するDC（制御性DC）を作成する方法が報告され、動物モデルでは自己免疫疾患や移植において有用なツールであることが示されている。今回、標的抗原が明らかである自己免疫性胃炎モデルを用いて、制御性DCを用いた治療の有用性を検討した。

B. 研究方法

制御性DCは、マウス骨髄細胞をGM-CSF、IL-4存在下に7日間培養したのち、LPSとIL-10を加えてさらに2日間加えて培養することにより得た。

生後3日目のBALB/Cマウスから胸腺を摘出し、その後、polyI:C（5mg/kg）を週2回投与することにより、自己免疫性胃炎モデルを作成した（Kobayashi Y et al. Clin Exp Im Immunol, 2004）。標的抗原をパルスし

た制御性DCまたは成熟DCを2週間に1回、マウスに投与した。

3. その他 なし

C. 研究結果

制御性DCは、MHC class II, CD80, CD86の発現が成熟DCより弱く、CD40の発現がほとんどみられなかった。このDCはCpG-ODN刺激により多量のIL-10を産生した。

制御性DCの投与により、病変部(胃)の炎症細胞浸潤は有意に低下し、自己抗体(抗胃壁細胞抗体)の力価も低下した。制御性DC投与マウスでは、成熟DC投与マウスに比し、胃内のIFN- γ mRNAの発現が有意に低かった。

また、制御性DCの投与により、脾臓におけるCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺制御性T細胞産生細胞数が増加していた。

D. 考 察

今回の検討では、PBCにおける制御性DCを用いた治療法を開発するための基礎実験として、標的抗原が明らかとなっている自己免疫性胃炎マウスモデルを用いた解析を行った。

制御性DCは、in vitroのみならずin vivoの炎症環境においても免疫応答を抑制することが示された。また、自己抗体の力価も低下した。これらの結果は、我々が作成している制御性DCが自己免疫疾患の治療に有用である可能性を示していると思われる。また、その機序としては、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞の誘導が行われていることが考えられる。

現在、PBCのマウスモデルを用いた検討を開始している。

E. 結 論

制御性DCを用いた細胞療法がPBCを含めた自己免疫疾患の治療に有用であ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

- 1) Murata Y, Abe M, Furukawa S, et al : Clinical features of symptomatic primary biliary cirrhosis initially complicated with esophageal varices. J Gastroenterol 41 : 1220-1226, 2006.
- 2) Torisu M, et al : Protective role of interleukin-10-producing regulatory dendritic cells against murine autoimmune gastritis. J Gastroenterol 43 : 100-107, 2008.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出現・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

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

沖縄県のPBCの遺伝および環境要因についての検討

研究協力者 佐久川 廣 琉球大学医学部 非常勤講師

研究要旨: PBCは原因不明の疾患で、その発症には様々な要因が関連すると言われている。遺伝的要因に関して、胆汁酸代謝にとって重要なfarnesoid X receptor (FXR) の遺伝子多型について、また、環境的要因として、沖縄県に蔓延している糞線虫感染との関連について疫学的に検討した。FXR対応遺伝子の翻訳開始領域のG-1T変異はPBCの約半数の症例にみられ、変異の有無による臨床像の差はなかった。一方、PBC患者の糞線虫保有率は対象群と比較して明らかに低かった。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は原因不明の疾患で、その発症には多くの要因が関連すると言われている。

PBCは肝内胆汁うっ滞をきたす代表的な疾患であるが、胆汁酸の合成、代謝、輸送を制御する核内受容体としてfarnesoid X receptor (FXR) が注目されており、その機能に影響を及ぼす遺伝子多型が妊娠性肝内胆汁うっ滞の発症と関連すると報告されている。そこで、日本人にみられるFXRの遺伝子多型G-1Tについて調査した。

PBCは自己免疫性疾患であるが、自己免疫性疾患と寄生虫感染との関連も注目されている。そこで、沖縄県に蔓延する糞線虫感染とPBCとの関連についても検討した。

B. 研究方法

FXRの遺伝子多型の調査として、2007年4月~12月の期間内に当院を受診したPBC患者 31例を対象に行った。31例中、男性 2例、女性 29例で、年齢は28~85歳に分布した (平均年齢: 55.1±13.3)。事前に本研究への参加の同意が得られた患者の全血を採取し、DNA抽出後、遺伝子多型G-1TについてSNIP解析した。

PBCと糞線虫感染の関連について調査するために1988~2006年の期間に琉球大学第一内科に入院した4117名を対象とした。4117名の内訳は: PBC 74名、自己免疫性肝炎 30名、原発性硬化性胆管炎 1名、ウイルス性慢性肝炎・肝硬変 367名、アルコール性肝障害 66名、対象群 3579名、であった。糞線虫の検出は原則として入院翌日の便を採取し、寒天平板培養法を行った。

C. 研究結果

31例のPBC患者の中で15例にG-1T変異を認めた。そのうち1例はhomozygoteの変異例であった。G-1T変異を認めた15例と野生型16例の臨床像を比較した。年齢、無症候性/症候性の割合、組織学的線維化の程度、臨床検査値 (T.Bil, ALT, ALP, γ -GTP, IgM) の比較において両群間に差はなかった (表1)。

表1 野生型とG-1T変異を有するPBC症例の臨床像の比較

	野生型n=16	G-1T変異(+) n=15	
無症候性/症候性	8/8	9/6	NS
F1/F2/F3/F4	8/1/3/4	9/3/0/3	NS
Age	53.0±14.3	57.2±12.7	NS
T.Bil	0.9±0.3	1.2±1.1	NS
ALT	60.8±42.2	87.5±81.6	NS
ALP	580.7±275.2	645.4±445.3	NS
γ -GTP	228.4±226.6	254.3±218.6	NS
IgM	389.8±173.2	393.4±50.2	NS

次にPBCと糞線虫感染との関連であるが、PBC74例中男性1例のみに糞線虫が検出された。また、PBCを含めて自己免疫性肝疾患105例中1例のみが糞線虫陽性で (1.0%)、対象群と比較して低率であった (表2)。糞線虫の陽性率は、男性が高く、また1955年以前に出生した人が高い。そこで年齢と性をマッチさせるために1955年以前に出生した女性のPBC患者60名と同じく1955年以前に出生した女性 1225名と比較した。PBC 60名中糞線虫感染者はゼロで、対象群の陽性率5.9%と比較して有意に低かった (P=0.045)。

表2 各種慢性肝疾患における糞線虫陽性率

	検査数	男/女	出生年 ~1955年	糞線虫陽性 (%)
自己免疫疾患	105	7/98	81%	1 (1.0)*
PBC	74	3/71	84%	1 (1.4)
AIH	30	3/27	77%	0
PSC	1	1/0	0%	0
慢性ウイルス性肝炎	367	238/129	68%	14 (3.8)
B型	108	88/19	56%	4 (3.7)
C型	255	147/108	73%	10 (3.9)
B+C	4	3/1		0
アルコール性肝疾患	66	60/6	80%	6 (9.1)
コントロール	3579	2133/1446	77%	252 (7.0)
計	4117	2438/1679	76%	273 (6.6)

*P<0.01対コントロール

D. 考察および E. 結論

今回の調査で、遺伝子多型G-1Tが20%以上に見られ、北欧、イギリスで2%、中国人の12%と比較して高率であった。G-1T変異はFXR対応遺伝子の翻訳開始部位の1つ手前の塩基がgからtに変異するもので、この変異により翻訳効率は野生型の37%に低下すると報告されている。FXRは胆汁酸の輸送において重要な役割を果たしており、その産生の低下は胆汁うっ滞に影響を与えらると思われるが、今回の検討では変異のある症例とそうでない症例の間に臨床像の差はなかった。しかしながら、今回検討した症例数は十分でなく、また対象群の検討を行っていないため、遺伝子多型G-1Tと病態の関連を論じることはできない。今後、症例を増やし、さらに対象群も加えて検討する必要がある。

糞線虫は沖縄や奄美など亜熱帯地域に多い感染症で、経皮的に感染し、主に十二指腸や上部小腸で増殖する。感染しても無症状で経過することが多いが、宿主の免疫能が低下すると、hyperinfectionの状態となり、腸内細菌を伴って肺や髄腔に進入し、重篤な感染症を引き起こす。

寄生虫と自己免疫性疾患との関連についての報告は少ないが、クローン病や1型糖尿病、多発性硬化症は寄生虫の蔓延している地域で少ないとの報告がある。PBCを含めた自己免疫性肝疾患と寄生虫感染の関連についての報告はない。今回の調査で糞線虫に感染すると自己免疫性肝疾患に罹患しにくいと推測された。この結果はPBCを含めて自己免疫性肝疾患の病態を考える上で興味深い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aoyama H, Hirata T, Sakugawa H, et al : An inverse relationship between autoimmune liver diseases and strongyloides stercoralis infection. Am J Trop Med Hyg 76 : 972-976, 2006.

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

PBCの分子疫学

主任研究者 大西 三朗 高知大学医学部 消化器内科学 教授

研究要旨: 進行性の原発性胆汁性肝硬変 (PBC) を識別するマーカーを見出すことは、PBCの予後予測、治療法選択に関して重要な課題である。PBCに対するベザフィブラート投与により生化学的改善がもたらされる事を鑑み、胆汁酸の腸肝循環に関わるorganic anion transporter (OATP), phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT), Farnesoid X receptor (FXR) の遺伝子多型を解析した。いずれの遺伝子もPBCと健常者との間に有意差を認めなかった。

A. 研究目的

本調査研究班で実施しているPBCの全国調査によると、無症候性-PBC、症候性-PBCの10年生存率はそれぞれ92.1%、61.7%で、症候性-PBCの予後は依然として不良である。無症候性-PBCの予後は比較的良好であるが、UDCAが第一選択の治療薬として使用され、無症候性から症候性への移行期間は約10年延長されたが、移行率20%は改善されていない。PBCに対するより効果的治療法としてUDCAとベザフィブラートの併用療法に期待が寄せられている。

最近、胆汁代謝に関わるtransporterなどの分子機構が解明され、ベザフィブラートの作用点も次第に明らかになってきた。

今回はベザフィブレートで調節される胆汁酸代謝に関わる分子に着目し、PBCの予後を識別するマーカーを見出す事を目的として、肝細胞から類洞に胆汁酸をくみ出すOATP、リン脂質の産生に関わるPEMT、そして胆汁酸をリガンドとする核内オーファン受容体FXRの遺伝子多型について検討を行なった。

B. 研究方法

OATPとPEMTではPBC22例を対象とした。OATPに関しては報告された日本人での頻度を対照とし、PEMTは健常者150人を対照として解析した。既に報告されているSNPのうちOATP-B (SLC27A9) のOATP-B*3 (S486F)、OATP-C (SLC27A6) のOATP-C*1b (N130D)、PEMTのV175Mをシーケンス法にて解析した。

C. FXRに関してはPBC23例を対象とし、21例の健常人と比較した。妊娠性肝内胆汁うっ滞で報告された遺伝子多型のうち-1g>tの変異を (Saskia W.C. van Mil et al: Gastroenterology 133 (2), 2007) 解析した。

C. 研究結果

OATP-B (S486F)

	PBC	Control
*1/*1	8	129
*1/*3	13	111
*1/*3	1	27

Odds ratio : 0.61 (0.25-1.51)

OATP-C (N130D)

	PBC	Control
*1a/*1a	3	29
*1a/*1b	12	115
*1b/*1b	6	75

Odds ratio : 1.30 (0.49-3.49)

PEMT (V175M)

	PBC	Control
V/V	21	143
V/M	1	7
M/M	0	0

Odds ratio : 1.03 (0.12-8.78)

FXR (-1g>t)

	PBC	Control
G/G	12	21
T/G	11	12
T/T	0	1

D. 考察

いずれの遺伝子についてもコントロール群とPBC群の間に有意差は認めなかった。また、PBC群において組織学的進行度、生化学検査と遺伝子多型との間に関連は認めなかった。

E. 結論

今回の検討ではPBCの発症、進展に関わる遺伝子多

型を見出せなかった。しかし、今後も同様のアプローチを行い、データを集積していくことが重要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwasaki S, Akisawa N, Saibara T, et al : Fibrates for treatment of primary biliary cirrhosis. *Hepatology Res* 37 : S515-517, 2007.
- 2) Iwasaki S, Ohira H, Nishiguchi S, et al and Group of Intractable Liver Diseases for Research on a Specific Disease, Health Science Research Grant, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan : The efficacy of ursodeoxycholic acid and bezafibrate combination therapy for primary biliary cirrhosis; a prospective, multicenter study. *Hepatology Res* : in press, 2008.

2. 学会発表 なし

G. 健康危険情報

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

PBCにおける脂質代謝の検討: *in vivo*における核内レセプター活性評価方法の検討

研究協力者 松崎 靖司 東京医科大学霞ヶ浦病院 消化器内科 教授

研究要旨: PBC治療薬剤の核内レセプターに対する作用をヒトで明らかにし、最終的に新たな治療薬の開発につなげることを目的として、ヒト *in vivo*における核内レセプター活性評価方法の確立を行った。FXRはCYP7A1の反応産物である血中C4濃度を、LXR α はABCG5/8の基質である血中plant sterol濃度を、またPXRはCYP3A4の反応産物である血中4 β -hydroxycholesterol濃度をLC-MS/MSにて定量する方法を開発し、高い信頼性の下で高感度分析が行えることが確認された。

A. 研究目的

PBCの治療にはウルソデオキシコール酸 (UDCA) とベザフィブラートが用いられ、その有効性が明らかにされている。しかし、これら薬剤の胆汁うっ滞改善機序には、いまだ不明な点が多い。実験動物を用いた研究は行われているが、胆汁酸およびフィブラート系薬剤の代謝には、ヒトと齧歯類 (マウス・ラット) で大きな違いが認められ、最終的にヒトでの研究が不可欠である。本研究は、これら薬剤の核内レセプターに対する作用をヒトで明らかにし、最終的に新たな治療薬の開発につなげることを目的とする。そこで本年度は、ヒト *in vivo*における核内レセプター活性評価方法の確立を行った。

B. 研究方法

血清7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) の定量: 血清50 μ lに重水素標識体の内部標準であるC4-d7 (1ng) を添加し、硫酸アンモニウムとアセトニトリルによる除蛋白を行った。2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride (100mg), 4-dimethylamino pyridine (30mg), picolinic acid (80mg), tetrahydrofuran (1.5ml) およびtriethylamine (20 μ l) を添加し、室温で30分間反応させ、誘導体化を行った。5% sodium bicarbonateを0.5 ml添加後、Bond Elut C18カートリッジによるC4-picolinateの抽出を行い、1/50をLC-MS/MSで分析した。HPLCのカラムはサーモフィッシャーサイエンティフィックのHyperSIL Gold (2.1 \times 150mm, 粒径3 μ m) を使用し、移動相は0.1%の酢酸を含むアセトニトリル:水 (95:5) を200 μ l/minの速度で使用した。SRMはcollision energy 16 VでC4がm/z 506 \rightarrow 383, C4-d7がm/z 513 \rightarrow 390で行った。

血清plant sterol (sitosterolおよびcampesterol) と4 β -hydroxycholesterolの定量: 血清10 μ lに内部標準として100ngのcoprostanolと4 β -hydroxycholesterol-d7 (5ng) を添加し、37 $^{\circ}$ Cの1N KOHを含むエタノール溶液中で1時間加水分解を行った。Sterolをn-Hexane抽出後、上記C4と同様の方法 (但しtriethylamineの代わりに20 μ lのN, N-dimethylethylamineを使用) にてピコリン酸誘導体化を行った。反応後窒素ガスにてtetrahydrofuranを蒸発させ、残渣に100 μ lのアセトニ

トリルを添加。遠心により沈殿物を除去し、上清の1/50をLC-MS/MSで分析した。HPLCのカラムはC4と同様で、移動相はA:0.1%の酢酸を含むアセトニトリル:メタノール:水 (40:40:20), B:0.1%の酢酸を含むアセトニトリル:メタノール:水 (45:45:10) とし、0から20分かけてBを0%から100%まで増加させるグラジエントプログラムを流速300 μ l/minで組んだ。SRMはsitosterolとcoprostanolはcollision energy 14 Vでそれぞれm/z 583 \rightarrow 542, m/z 557 \rightarrow 516で行い、campesterolはcollision energy 12 Vでm/z 569 \rightarrow 528で行った。

臨床検体の分析: 上記方法を用いて、昭和大学第二内科井廻道夫教授より提供していただいたPBC患者3例の薬物治療前後の血清を試験的に分析、比較した。

C. 研究結果

LC-MS/MS法を用いることにより、高い信頼性の下でC4, plant sterol, 4 β -hydroxycholesterolの高感度定量が可能になった。最小検出感度は100fg以下と従来のHPLC法の1000倍以上高い感度であった。再現性はCV値10%未満、添加回収も92-100%と良好であった。

PBC患者3例の分析では、ベザフィブラート投与前に比べて投与後で著明な血清C4濃度の低下を認め、CYP7A1の抑制、すなわちFXRの活性化が起きていることが推測された。

D. 考察

胆汁分泌に関する多くの遺伝子は、FXR, LXR α およびPXRを中心とした核内レセプターによってその発現が制御されている。これら3つの核内レセプターが活性化されると、その下流に存在する多くの標的遺伝子の発現が変化するが、バイオマーカーの選択には1) その遺伝子産物が血液中に存在し、遺伝子の発現変化と共に定量性をもって濃度が変化するもの、さらに2) 他の核内または膜レセプターによる制御より、対象の核内レセプターによる制御を強く受けているもの、という2つの条件を満たすことが必要である。そのような観点から、FXRはCYP7A1の反応産物であるC4を、LXR α はABCG5/8の基質であるplant sterolを、