

検討する必要があると思われる。興味深いことに、SMA では陽性・陰性の間で ALT に有意差がみられたが、ANA ではこのような有意差は存在しなかった。ただここには測定バイアスが潜んでいる可能性も考えられ、さらなる検討が必要である。

この43例の解析では、それ以外の PBC と比較してやや若年、総ビリルビン高値であった。比較的強い肝細胞障害を反映して黄疸が出現しやすいことは詳細調査でも確認されており、OLS の特徴の一つといえるだろう。一方、治療及び予後に関しては各症例の治療内容についての記載が比較的貧弱であったため、解析に足る情報が得られなかったことは残念である。

一方、全国7施設の班員に依頼して行った OLS 詳細調査では38例の症例が集積され、診断時から予後まで詳細な情報が得られた。PBC 中の頻度は3.7%であり、これは欧米の報告よりやや低い(4.8%-8.5%)。わが国では OLS が低頻度なのか、それとも他の理由によるものかは不明である。年齢・性別は PBC とほぼ同等であり、自己免疫疾患の合併プロフィールも変わらず、この点 PBC と特別な違いはない。大きく異なるのは診断時の有症状率であり、46%の症例で黄疸・腹水など何らかの症状を伴っていた。

しかし、有症状症例が多いにもかかわらず、本邦の OLS 症例の予後は極めて良好である。初期治療として既に UDCA と PSL が12例で併用されており、最終確認時には全体の6割の症例で併用が行われていた。その結果38例中30例では肝機能正常・症状なしという予後に至っており、10年生存も無症候性 PBC とほぼ同等である。欧米からの OLS の報告では UDCA と PSL の併用を推奨するものが多いが、本邦では UDCA と PSL の併用がかなり一般的となっており、そのことが良好な予後につながっているものと考えられる。

ただ、この詳細調査では OLS の診断自体は各施設で行われており、必ずしも統一した診断基準が用いられていないことに留意すべきである。現在各施設から病理組織標本を借用中であり、今後病理組織の解析を踏まえ、どのような診断基準が適当であるかについて検討していきたい。加えて、既報では OLS は PBC と遺伝的背景が異なるという報告もみられることから、新たに各症例の DNA を集積して、HLA および non-HLA 遺伝子につき、PBC との比較を行いたいと考えている。

## E. 結 論

今回、OLS の病態・診断基準、及び治療法の策定を目的とし、PBC 全国調査からの OLS 症例の抽出、および班員に依頼した詳細調査を行った。全国調査では主に診断基準策定に有用な診断時の情報が得られた。詳細調査では診断時のみならず治療内容・予後についての情報が集積され、本邦の OLS 症例は UDCA と PSL とを早期から併用することにより良好な予後が得られていることが判明した。今後病理組織標本の解析を追加し、平成22年度中には OLS 診断基準の策

定を行う予定である。

## 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

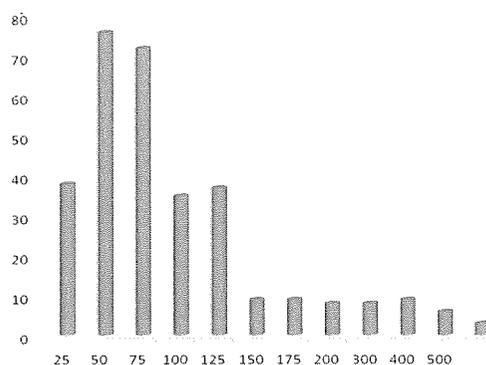


図1 PBC全国調査からの抽出：SMA陽性者のALT値の分布

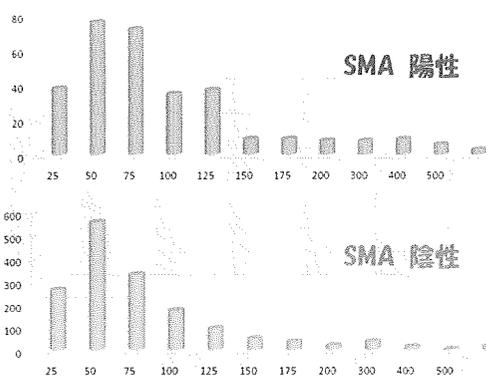


図2 PBC全国調査からの抽出：SMA陽性者・陰性者の診断時ALT値の比

	SMA+ve and ALT>150 (n=43)	Others (n=5,315)	P
age	52.5 ± 12.1	56.2 ± 11.3	0.034
sex (M/F)	4/39	669/4683	ns
T.Bil	1.83 ± 2.22	1.13 ± 1.93	0.017
AST	250 ± 140	68 ± 77	<0.001
Alb	3.9 ± 0.4	4.0 ± 0.5	ns
γ-glb	2.1 ± 0.7	1.9 ± 0.7	ns

表1 PBC 全国調査からの抽出：「SMA 陽性 + ALT150超」43例とそれ以外の PBC 症例との比較

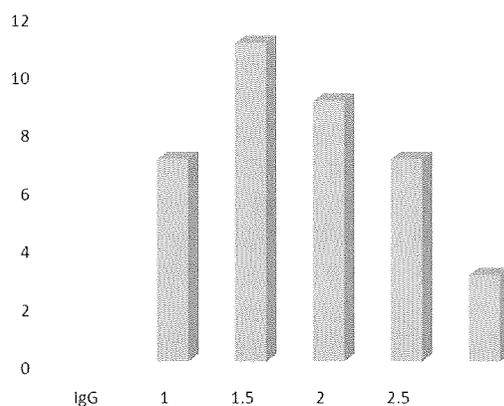


図3 詳細調査：診断時 IgG 値の分布

診断時	最終確認時	n	ステロイド投与例数
asymptomatic	asymptomatic	27	3
symptomatic	symptomatic	4	1
symptomatic	asymptomatic	7	0
asymptomatic	symptomatic	4	1

表2 PBC 全国調査からの抽出：「SMA 陽性 + ALT150以上」43例についての診断時・最終確認時の症候性・無症候性の変化

		AMA	
		pos	neg
ANA/SMA	pos	28	5
	neg	4	0

表3 詳細調査：診断時自己抗体

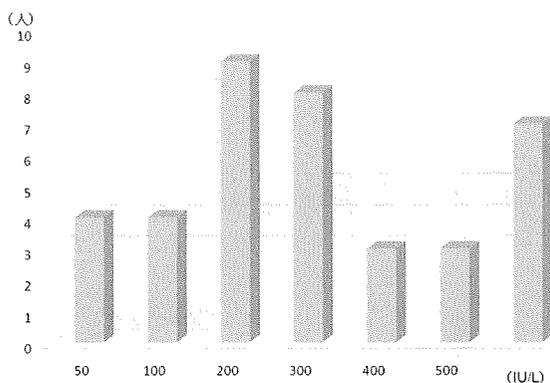


図2 詳細調査：診断時 ALT 値の分布

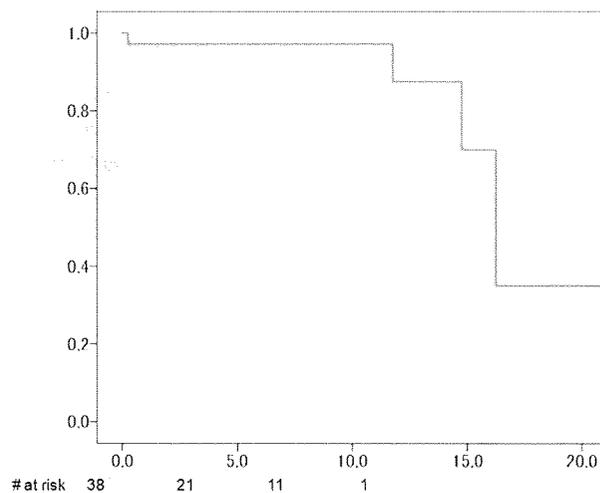


図4 詳細調査：Kaplan-Meier 法による生命予後

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

PBC 調査研究分科会

分担研究報告書

## 診療ガイドラインの作成WG報告

研究分担者 石橋 大海 国立病院機構 長崎医療センター 臨床研究センター長

**研究要旨：**3年計画の2年目であり、原発性胆汁性肝硬変（PBC）患者の診療のガイドラインの作成を目的として、1）重症度分類、予後予測と、2）PBC診療にあたっての薬物投与・合併症対策等の指針、について検討を行った。抗gp210抗体測定の前後判定に関する有用性については、班員から収集された検体にてその有用性が検証された。重症度判定のためのMayoあるいはupdated Mayo予後予測式の日本人における検証は、厚労研究班疫学班で蓄積されている全国調査の登録症例をデータベースとして解析するためにそのデータを入手した。PBC患者の診療のための指針の存在が望まれる項目に関しては、クリニカルクエスチョンを挙げ文献検索を行ったが、高いエビデンスレベルの文献は極めて少なかった。そのため、エビデンスレベルは高くはないが、我が国で現在標準的に行われている診療に合わせた指針作りを進めている。また、最近新たに公表された諸外国のガイドラインも参考にし、3年目での完成を目指して、診断基準ワーキング、治療ワーキングとも連携をとり、策定作業を進めている。

### 共同研究者

上野 義之 東北大学消化器内科学  
江川 裕人 朝日大学村上記念病院  
向坂彰太郎 福岡大学消化器内科学  
下田 慎治 九州大学医学院病態修復内科学  
銭谷 幹男 東京慈恵会医科大学大学院  
中村 稔 長崎大学大学院肝臓病学講座  
前原 喜彦 九州大学大学院消化器・総合外科  
中牟田 誠 九州医療センター肝臓病センター

### 研究協力者

小森 敦正 長崎医療センター臨床研究センター  
小池 和彦 東京慈恵会医科大学大学院  
副島 雄二 九州大学大学院消化器・総合外科  
竹山 康章 福岡大学消化器内科学

### A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）患者の診療の指針となるガイドラインの作成を目的として、ワーキンググループ研究を行う。診断基準ワーキングが作成した診断基準、治療ワーキングが作成した治療法を含め、現場での診療に即した、我が国のPBC患者の標準的診療を行うための非専門家向けの診療ガイドラインを作成する。

### B. 研究方法

調査研究項目は、1）重症度分類、予後予測と、2）PBC診療における薬物投与・合併症対策等の指針とし、各共同研究者間で分担を決めて作業を行った。3年計画の2年目である本年度は、抗gp210抗体測定の有用性については、班員より献体を収集し、測定結果と患者の経過を解析することにより、確認を行った。診療指針として必要な項目については、クリニカルクエスチョンを挙げ、それらに対して既に報告されているエビデンスレベルの高い文献等の資料を抽出し、問題点を洗い出す。エビデンスの検証のために、既存の

データベースを活用することとした。

#### 1）重症度分類、予後予測

① Mayoの前後判定方式の我が国症例での検証作業（江川、前原、向坂）

厚労省難治性疾患調査研究班で継続して行われている全国調査（事務局：関西医大）のデータベースを使用して、Mayoモデル、Mayo updatedモデルの妥当性を検討し、必要あれば改訂ないしは新規に作成する。

② 抗gp210抗体測定（石橋・中村WG）

抗gp210抗体の予後予測因子としての有用性について、重症度評価因子、および予後予測因子としての有用性について、班員間で症例、検体を収集し、解析して検証した。

#### 2）診療指針

① 経過観察測定項目（上野、中牟田）

i) 臨床症状、ii) 併発症・生活習慣、iii) 臨床検査のそれぞれについて、患者の経過観察において、どのような項目が適しているか、文献、データベースを基に検討を行った。

② UDCA使用の対象設定（銭谷）

UDCAをどのような症例に、いつ使い始めたらよいか、どの症例にも使用したがよいのか等々、実際の使用指針について、文献、データベースを用いて検討した。

③ UDCAに不応の場合の対応（下田）

UDCAに不応の場合の対応として、有効な薬物に関して文献を蒐集して検討を行い、候補薬物を抽出した。既に評価が確立しつつあるベザフィブラートとステロイド薬について、使用基準を策定する。

④ 症状、合併症に対する予防・治療（上野、中牟田）

搔痒感、骨粗鬆症、肝癌等の重要な症状、合併症に対して、エビデンスの高い文献を収集し、検討を行った。

⑤ 移植医へのコンサルト時期（向坂、江川、前原）

- ⑥肝移植時期（前原，江川）
- ⑦肝移植患者の管理（前原，江川）
- ⑤～⑦について，文献での検討と共に，自験例ないしは使用可能なデータベースを使用して検討した。

## C. 研究結果

### 1) 重症度分類，予後予測

① Mayo の予後判定方式（江川，前原，向坂）  
解析方法について検討した結果，厚労科疫学班で長年継続してきた PBC 全国集計データをデータベースとして用いて検討することが妥当であろうとの結論に至ったため，坪内代表研究者，中沼文化会長の了解を得て事務局の関西医大（廣原，仲野先生）より入手した。Mayo Risk Score を計算するためのデータが揃っている症例をピックアップした。score 計算し，計算された時点での score と予後を検証する予定である。問題点として，① PBC のフォローで胆道系酵素の評価はされているが凝固機能の欠損が多いこと，② 同一症例のピックアップ作業が複雑であること，③ 膨大な作業量になることが予想されること，が挙げられた。

#### ② 予後予測判定に関する抗 gp210 抗体測定の有用性の検証

岡山大学，慈恵医大，福島県立医大，東京女子医大，金沢大学，帝京大学，九州大学から提供された PBC 症例 162 例を対象として解析した結果，抗 gp210 抗体の重症度評価因子と予後予測因子としての有用性，および抗 centromere 抗体の肝不全に至らぬも静脈瘤を生じるリスクの予知因子としての有用性が確認された。詳細は，今年度より，中村稔班員を責任者として独立した WG として報告する。

### 2) 治療指針

#### ① 経過観察測定項目（上野，中牟田）

i) 臨床症状として，疲労感 (SF37, PBC40)，搔痒感，リウマチ様症状，肝・脾腫，皮膚，食道静脈瘤，腹水，黄疸，ii) 併発症・生活習慣として，甲状腺炎，Sicca syndrome, Scleroderma, 喫煙，肝細胞癌，男性，高齢，輸血歴，門亢症，iii) 臨床検査として，生化学，ビリルビン，治療後の ALP 値，ヒアルロン酸，アミノトランスフェラーゼ，高脂血症，自己抗体，AMA, ANA, 抗 gp210 抗体，を選択した。それぞれの項目について，エビデンスレベル，推奨度等の検討を行っているが，経過観察では血清総ビリルビン値，ALP 値が重要である。

#### ② UDCA 使用の対象設定（銭谷）

UDCA の有用性についてはエビデンスレベルの高い報告が多く，ほぼ確立されているので，UDCA の使用法に関するクリニカルクエスチョンを作成し，RCT を含むエビデンスレベルの高い研究報告を蒐集して，Answer とその推奨グレード（案）を策定した。

#### ③ UDCA に不応の場合の対応

文献検索の結果，Prednisolone, Budesonide, Bezafibrate の 3 剤が候補として挙げられた。しかし，

いずれもエビデンスレベル，推奨度の高い文献は見いだせず，この 1 年間にも新しい報告はなかった。エビデンスが蓄積しつつあるベザフィブラートが候補として高いが，治療ワーキングのデータを参考にしたい。

#### ④ 症状，合併症に対する予防・治療（上野）

i) 軽度の搔痒感：温浴などの非特異的対症療法（抗ヒスタミン剤の併用）grade 2C, ii) Bile acid resin：コレステラミンもしくはコレステポール grade 2, iii) 上記無効例：リファンピシン grade 2B, iv) さらに無効例にはフェノバルビタール grade 2C, v) 無効例，非適応例；オピオイド拮抗薬 grade 2B, vi) 上記無効例，非適応例：肝移植 grade 2B。

搔痒感の治療としてリファンピシンの報告が蓄積されているが，エビデンスレベルの高い文献は認められなかった。

#### ⑤ 移植医へのコンサルト時期（向坂，江川，前原）

肝移植医へのコンサルト時期はいつが適切か？肝移植時期はいつが適切か？PubMed-MEDLINE を使用して論文の検索を行った。Key Words を “Primary biliary cirrhosis” と “Liver transplantation”, Publication Type として 01/1998～12/2008 の期間における Clinical Trial, RCT, Meta-Analysis を検索した結果，49 の文献が選出された。しかし，エビデンスレベル 1, 2 の論文は，UDCA や Azathioprine, CyA など薬剤の有用性を検討したものばかりであり，「移植医へのコンサルト時期」や「肝移植時期」に関するエビデンスレベルの高い論文は見いだし得なかった。

肝移植患者の管理については，九大移植外科の自験例の検討の結果，5 年後のグラフ生着率と生存率は 71.4% であったが，9 年後は 54.5% と低下がみられた。肝移植後のグラフ生着率と生存率を上げるべく管理の指針を検討中である。

## D. 考 察

予後予測として中村班員が Hepatology で報告した抗 gp210 抗体の意義は，班員の献体を使用してもその有用性が確認された。今後どのようにガイドラインに盛り込むか検討する。

Mayo の予後判定方式の妥当性に関しては，PBC 全国調査の登録症例をデータベースとして用いて検討中である。

観察測定項目については非専門医が参考にできる項目設定が必要と考えられる。UDCA に関しては，RCT を含む多くのエビデンスレベルの高い研究報告がなされている。UDCA 不応の際のベザフィブラート，ステロイド薬の使用基準に関しては，どのようにエビデンスを作るか，問題である。

症状，合併症に対する予防・治療に関しては，皮膚搔痒感の他，骨粗鬆症の予防とチェックのための測定項目，肝癌早期発見のための定期検査の項目と頻度等についての検討が必要である。

肝移植 移植医へのコンサルト時期は非専門医にとって必要である。しかし，エビデンスは全くない。今後諸外国のガイドラインも参考にするとともに，

PBC 全国調査のデータをデータベースとして用いて解析する。肝移植患者の管理については、九大移植外科症例に加え、京都大学や他の大学の症例を加え、検討を継続する。

#### E. 結 論

PBC 患者予後予測に関する抗 gp210抗体測定 of 検証に関しては、班員からの収集検体にてその有用性が確認された。PBC 診療ガイドラインの存在が望まれるクリニカルクエスションに対して、高いエビデンスレベルの文献は極めて少ないが、現存するエビデンスを参考に、我が国で行うべき標準的診療のガイドラインとなる指針を作成中である。また、厚労省研究疫学班で蓄積されている PBC 全国調査の登録症例データをデータベース入手しており、今後解析予定である。諸外国のガイドラインも参考にし、診断基準ワーキング、治療ワーキングとも協調し策定を行う。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 中村 稔, 石橋 大海: <特集>自己免疫性肝臓疾患-最新知見. 原発性胆汁性肝硬変の長期予後診断と治療. 医学のあゆみ 228(9):889-894, 2009.2.28
- 2) 本吉康英, 石橋大海, 下田慎治. 自己免疫性肝臓疾患. 特集: 患者さんの背景・病態で考える 薬の選び方・使い方のエッセンス, 治療 91(4):増刊号:972-976, 2009.4
- 3) 右田清志, 小森敦正, 石橋大海: 治療抵抗性自己免疫性肝炎. <特集>自己免疫性肝炎2009. 肝胆膵 59(1):125-129, 2009.7
- 4) 石橋大海: 原発性胆汁性肝硬変患者への対応. In 熟練医から“日常診療のさまざまなコツ”を伝授. 日本プライマリ・ケア学会編集, 南山堂, 東京, 2009.3.29, pp98-99, A6版, 261頁
- 5) 本吉康英, 右田清志, 石橋大海: PBC と自己免疫性肝炎. In Annual Review 消化器. 林 紀夫, 日比紀文, 上西紀夫, 下瀬川徹編, 中外医学社, 東京, 2009.1.30 A4版, 313頁, p209-214
- 6) 石橋大海: 自己免疫性肝炎 (AIH), 原発性胆汁性肝硬変 (PBC), AIH の簡略化診断基準. In: 消化器 研修ノート, 永井良三総監修, 白鳥敬子, 菅野健太郎, 坪内博仁, 日比紀文編集, 初版, 診断と治療社, 東京, 2009.12.25, A6版, 656頁, P447-480, 481-483
- 7) 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変. In 今日の治療指針 2010, 医学書院, 2010, 447-448
- 8) 石橋大海, 上平幸士: 原発性胆汁性肝硬変. In 北村 聖創編集, 井廻道夫編集. 臨床病態学. ヌーヴェルひろかわ, 東京, 2010.2.1, 120-122頁
- 9) 石橋大海, 中村 稔, 小森敦正: 肝疾患診療に

おける彼我の違い: 黒船は来るのか? 「10. 原発性胆汁性肝硬変ガイドラインの作成」. 肝胆膵60 (2号) 印刷中, 2010.2

- 10) 石橋大海, ほか: 原発性胆汁性肝硬変の診療ガイドライン. 文光堂, 2010, 印刷中
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）

原発性胆汁性肝硬変分科会

分担研究報告書

## 抗 gp210抗体の有用性の検証WG 報告

研究協力者 中村 稔 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科肝臓病学講座 教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）における血清抗 gp210抗体測定の意義を検証する目的で、平成19年度から当班の中に抗 gp210抗体検証ワーキンググループを組織し、参加16施設による多施設共同研究を行っている。平成22年1月までにPBC 190症例が登録され、血清475検体の測定、肝生検組織307標本の評価を行った。その結果、①抗 gp210抗体が黄疸・肝不全進行の強い危険因子であること、②抗セントロメア抗体が門脈圧亢進症進行の有意な危険因子であることが検証された。また、③胆管消失や肝炎の所見が高度であることが抗 gp210抗体陽性症例の病理学的特徴であることも確認された。今後は、肝移植に至ったPBC 進行症例を解析対象として、抗 gp210抗体測定の予後予測と病型分類における有用性を検証する必要がある。また、PBCの診断基準ワーキング、治療ワーキングと連携をとり、PBC 診療における抗 gp210抗体測定のガイドラインを作成する必要がある。

### 共同研究者

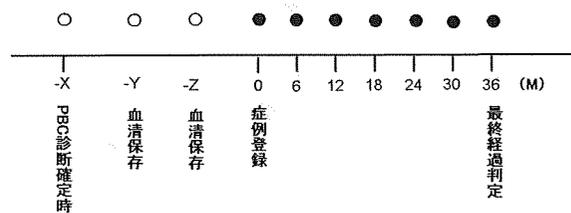
上野 義之 東北大学消化器病態学  
大平 弘正 福島県立医科大学消化器・リウマチ・  
膠原病内科  
橋本 悦子 東京女子医科大学消化器内科  
銭谷 幹男 東京慈恵会医科大学器官病態・治療学  
滝川 一 帝京大学内科  
宮川 浩 帝京大学医学部附属溝口病院  
中沼 安二 金沢大学形態機能病理学  
金子 周一 金沢大学恒常性制御学  
本田 政夫 金沢大学先端医療技術学  
山本 和秀 岡山大学消化器・肝臓・感染症内科学  
恩地 森一 愛媛大学先端病態制御内科学  
西原 利治 高知大学医学部消化器内科  
向坂彰太郎 福岡大学医学部消化器肝臓病内科  
下田 慎治 九州大学病態修復内科学  
坪内 博仁 鹿児島大学消化器疾患生活習慣病学  
森實 敏夫 国際福祉大学  
近藤 義久 長崎大学原爆後障害研究所  
石橋 大海 長崎医療センター臨床研究センター  
伊東 正博 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

24日の第二回会議を経て、同年3月から患者登録、血清抗 gp210抗体測定を開始した。平成21年度から“難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究”班（研究代表者：坪内博仁教授）のPBC分科会（研究代表者：中沼安二教授）の中に、本ワーキングが正式に発足し、参加16施設による多施設共同研究を下記のプロトコルで継続している。

抗gp210抗体の測定により予後を予測できるか否かについての臨床研究プロトコル(retrospective/prospective cohort study)。

- : prospective study での血液検査 (1/6M)
- : retrospective study での血液検査 (保存血液があれば測定する)

今回は、経過観察期間(診断確定時あるいは登録時から最終経過判定時までの間)が36ヶ月以上の症例を解析対象とする。



### 検討項目：

- ・PBCの診断における抗 gp210抗体の有用性
- ・PBCの活動性評価因子としての抗 gp210抗体の有用性
- ・PBCの重症度評価因子としての抗 gp210抗体有用性
- ・PBCの予後予測因子としての抗 gp210抗体の有用性
- ・PBCの病型分類のための抗 gp210抗体の有用性

### 対象：

診断時に肝生検が施行されており1980年以降に確定診断されたPBC症例。

### 評価項目：

- ・血清抗 gp210抗体価 (ELISA)

### A. 研究目的

血清抗 gp210抗体測定がPBC患者の診断、活動性評価、重症度評価、予後予測、病型分類に有用であるかどうかを検証するために“抗 gp210抗体検証ワーキンググループ”を組織し、多施設共同研究を行う。

### B. 研究方法

平成19年8月31日に“難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究”班（研究代表者：大西三朗教授）でgp210ワーキンググループ（研究責任者：中村 稔）を立ち上げるための第一回会議を開催し、同年9月に研究実施計画書を作成、同年10月より各施設の倫理委員会へ研究計画の承認申請を開始した。平成20年1月

- ・血清抗セントロメア抗体価 (ELISA)
- ・肝生検組織の病理学的評価
- ・患者情報 (血液生化学, 免疫学, 画像所見, 内視鏡所見など)

### C. 研究結果

- 1) 162症例の中間解析では, 抗 gp210抗体陽性率 30.4%, 抗セントロメア抗体陽性率29.2%, 抗ミトコンドリア抗体陽性率94.4%であった。
- 2) 臨床病期を下記の如く定義して病期の進行に対する相対危険度を logistic regression analysis で解析した。

Clinical Stage I (非進行期): 食道静脈瘤, 腹水, 肝性脳症, 黄疸, 画像上高度の肝不整, 線維化など肝硬変の所見を認めない。

Clinical Stage II (門脈圧亢進症進行期): 食道静脈瘤, 画像上肝不整, 線維化など肝硬変の所見を認めるが黄疸は認めない。

Clinical Stage III(黄疸進行期): 持続する黄疸 (T.Bil >2.0mg/dl) を認める。

下記の表の如く, 抗 gp210抗体陽性は黄疸進行の強い危険因子であり, セントロメア抗体陽性は門脈圧亢進症進行の有意な危険因子であった。

	clinical stage 2	clinical stage 3
sex	1.07 (0.15, 4.71)	-
age	1.01 (0.97, 1.05)	0.94 (0.88, 0.99)
gp210 (+)	2.93 (0.99, 9.12)	11.05 (2.49, 66.73)
cenp (+)	3.13 (1.10, 9.46)	1.36 (0.17, 7.99)

- 3) 長崎医療センターの肝生検組織を含めた307検体の解析では, 抗 gp210抗体陽性症例は, 胆管消失, 肝炎の有意な危険因子であった。

### D. 考察

gp210ワーキングの研究責任者である中村らが国立病院機構肝疾患ネットワークの検体を用いて報告した (Hepatology 2007; 45:118-127) 抗 gp210抗体と抗セントロメア抗体の意義は, 本ワーキング参加施設の PBC 症例を用いた検討でも確認された。また, 抗 gp210抗体陽性症例では胆管消失や肝炎が発症早期より高度であることが, 中沼安二教授らにより提唱されている PBC の病理学的活動性の評価方法を用いて明らかとなった。今後は, 肝移植に至った PBC 進行症例を解析対象として, 抗 gp210抗体測定の予後予測と病型分類における有用性を検証する必要がある。

既に, 本ワーキングの研究責任者の中村らにより, 平成21年度, 厚生労働省科学研究費補助金「難治性疾患克服事業横断的基盤分野「生体試料などの収集に関する研究」「難治性肝臓疾患 (原発性胆汁性肝硬変) の生体試料などの収集に関する研究」班が組織され, 東京大学肝胆膵外科・人工臓器移植外科 (國土典弘教

授), 京都大学肝胆膵・移植外科 (上本伸二教授), 九州大学消化器・総合外科学 (前原喜彦教授) との共同研究で, 肝移植に至った PBC 進行症例の血清ならびに DNA 収集が開始された。平成22年度からは, 本ワーキングの中で, これらの生体試料の収集活動を継続し, 抗 gp210抗体測定の PBC 予後予測と病型分類における有用性を検証する予定である。

また, PBC の薬物治療反応性についても検討を開始し, 抗 gp210抗体測定が治療効果判定に有用かどうかの結論も出す予定である。

### E. 結論

抗 gp210抗体の測定は, PBC の病理学的活動性の評価と PBC 患者の長期予後予測に有用であることが検証された。今後は, PBC の診断基準ワーキング, 治療ワーキングと密に連携をとり, PBC 診療における抗 gp210抗体測定のガイドラインを作成する予定である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 中村 稔, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変の長期予後診断と治療. 自己免疫性肝胆膵疾患 - 最新知見. 医学のあゆみ Vol.228 No9:889-894, 2009.2.28
- 2) 中村 稔, 相葉佳洋, 小森敦正, 石橋大海. 肝疾患難病「原発性胆汁性肝硬変」の新規マーカーによる予後予測. 医療 Vol.63.No6:357-362,2009

### 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

### 原発性胆汁性肝硬変全国調査（第30報） －第14回原発性胆汁性肝硬変全国調査結果－

研究協力者 廣原 淳子 関西医科大学内科学第三講座 准教授

**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。2009年8月に実施した第14回PBC全国調査で、既登録症例2,129例と新規登録702例の報告が得られ、総登録症例は7,376例となった。5年生存率は無症候性-PBC 97.7%，症候性-PBC 79.5%，10年生存率は各々93.3%，65.5%であった。経過中肝移植が施行された症例は120例あり、移植後生存率は5年生存率86.7%，10年生存率84.5%で、前回調査時に比較して改善していた。

#### 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、2009年8月に実施した第14回全国調査の集計結果を報告する。

#### A. 方法

##### 1. 研究方法

第14回PBC全国調査は、全国516の既登録施設に対し、2008年12月末までの既登録症例の予後調査と2007年1月から2008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、本調査はこれまで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いない症例を除外した既登録3,740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7,376例のうち解析可能であった6,161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。

##### 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、平成19年8月16日改正）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回調査以降はこの個人情報管理システム構築後の調査である

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ている。

#### C. 研究結果

1. 第14回PBC全国調査の最終集計結果を以下に示す。

- 1) 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2,129例（回収率56.9%）と新規登録702例の報告が得られ、登録症例総数は7,376例となった。平均観察期間は80.3ヶ月（1-443ヶ月）である。
- 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例前後では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2007-2008年の新規症例では約80%程度となっている。
- 3) 年齢構成および性別（図3）：男女比929：6353（1：6.8）、診断時平均年齢 $55.8 \pm 11.4$ 歳（男性 $58.6 \pm 11.9$ 歳、女性 $55.4 \pm 11.3$ 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83.9%、抗核抗体（antinuclear antibody: ANA）46.4%、抗平滑筋抗体（antismooth muscle antibody: ASMA）5.6%で、抗ミトコンドリア抗体（ELISA法）陽性率は74.6%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81.7%であった。（表2, 3）。なお、第14回調査時新規登録症例では蛍光抗体法または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90.8%となっている。
- 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3.1%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24%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) 登録時全例におけるウルソデオキシコール酸の治療の有無を表5に、14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61.1%, ベザフィブラートとの併用16.5%, ステロイドとの併用は3.3%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): 1,114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120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80.8%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-PBC4389例, s-PBC1772例について各々の5年生存率は97.7%, 79.5%, 10年生存率は93.3%, 65.5%, 20年生存率は82.1%, 50.2%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. 肝移植症例の予後追跡調査

- 1) 経過中に120例の肝移植の報告があった。男女比は8:112 (1:14), 移植時平均年齢は  $50.7 \pm 8.7$  歳であった。移植方法は脳死肝移植4例, 生体肝移植104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98例中, 子供53例, 兄弟姉妹18例, 配偶者22例, 非血縁者2例, 他血縁者0例, ドミノ1例, 両親2例であった。診断から移植までの平均期間は73.2ヶ月であった。
- 2) 移植後予後 (不明を除く108例, 移植後観察期間51.4ヶ月) は生存78名, 死亡30例 (死因: 肝不全10例, 感染症3例, 拒絶反応4例, 他病死13例) であった。移植数の年次推移を図9に示す。肝移植後生存率は、5年生存率86.7%, 10年生存率84.5% (各々脳死肝移植100%, 100%, 生体肝移植86.2%, 83.8%) であった (図10, 11)。

## D. 考 察

第14回 PBC 全国調査の実施により総登録症例は7,376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うけられることが最近の傾向である。第13回調査結果 (第28報) で5年生存率 a-PBC97.6%, s-PBC79.2%, 10年生存率は各々92.9%, 64.8%であったのに対し、今回の調査結果では5年生存率 a-PBC97.7%, s-PBC79.5%, 10年生存率は各々93.3%,

65.5%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。

PBC 全国調査において年次別死亡数は明らかに減少しており、内科的治療効果に加えて肝移植症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2008年末までの集計肝移植症例登録報告によれば (移植44: 559-571, 2009) PBC の肝移植例数は466例 (脳死3例, 生体463例) で、生体肝移植例の5年生存率76.5%, 10年生存率72.6%, 15年生存率37.2%とされている。今回の全国調査登録生体肝移植例では5年生存率86.2%, 10年生存率83.8%であり前回調査時生体肝移植例5年生存率76.0%, 10年生存率71%と比較して (第28報), 明らかな予後の改善が認められた。日本肝移植研究会登録例との累積生存率の差異を含めて、今後肝移植症例のデータ解析をさらに進める予定である。

## E. 結 論

第14回 PBC 全国調査で、既登録例2,129と新規登録702例の報告が得られ、総登録症例は7,376例となった。5年生存率は a-PBC 97.7%, s-PBC 79.5%, 10年生存率は各々93.3%, 65.5%であった。肝移植症例は120例で、移植後生存率は5年生存率86.7%, 10年生存率84.5%と前回調査に比較して明らかな改善が認められた。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 廣原淳子, 仲野俊成, 關壽人, 岡崎和一, 大西三朗: 合併する自己免疫疾患別にみた原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の病態の相違 - PBC 全国調査結果から - 消化器病学の進歩 - 原点から未来への情報発信. 飯田三雄編, pp251-254, 日本消化器病学会, 2009
- 2) 廣原淳子, 關壽人, 岡崎和一: 原発性胆汁性肝硬変. 内科学症例図説. 杉本恒明, 小俣政男編, pp252-255, 朝倉書店, 2009

### 2. 学会発表 無し

## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

表1 調査回数別症例数

	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	572
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
第14回調査(2009)	702	2831
		7376

図1 年次別発生数

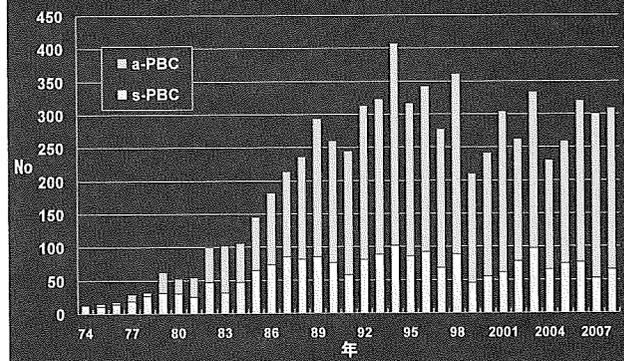


図2 年次別有病者数

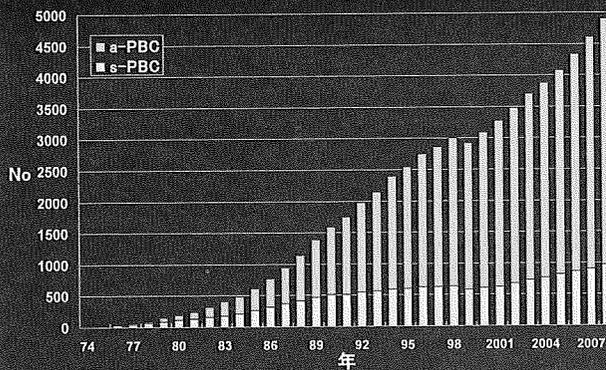


図3 年齢構成および性別

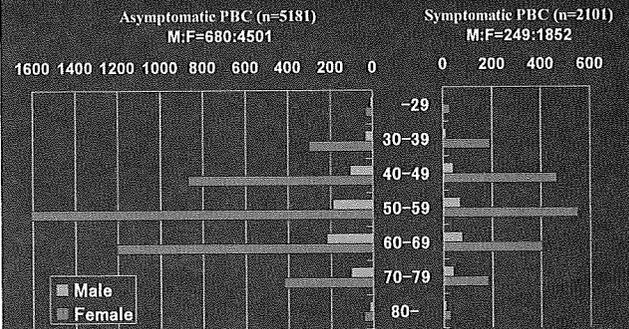


表2 自己抗体の陽性頻度

	抗ミトコンドリア抗体 (蛍光抗体)		Total
	(+)	(-)	
ANA	(+)	2275(36.9) 587( 9.5)	2862(46.4)
	(-)	2897(47.0) 409( 6.6)	3306(53.6)
ASMA	(+)	168( 2.7) 175( 2.8)	343( 5.6)
	(-)	5004(81.1) 821(13.3)	5825(94.4)
Total	5172(83.9)	996(16.1)	6168( 100)

表3 抗ミトコンドリア抗体の陽性頻度  
(第7~14回調査例で両者が測定されている2395例)

	蛍光抗体法		Total
	(+)	(-)	
ELISA	(+)	1630(68.1) 156( 6.5)	1786(74.6)
	(-)	327(13.7) 282(11.8)	609(25.4)
Total	1957(81.7)	438(18.3)	2385(100)

表4 自己免疫疾患の合併

(記載のあった6871例中)

Sjogren症候群	856例 (12.5%)
橋本病	451例 ( 6.6%)
関節リウマチ	250例 ( 3.6%)
Raynaud現象	219例 ( 3.2%)
強皮症	178例 ( 2.6%)
潰瘍性大腸炎	17例 ( 0.2%)

図4 診断時の悪性腫瘍の内訳  
(214/6871例,3.1%)

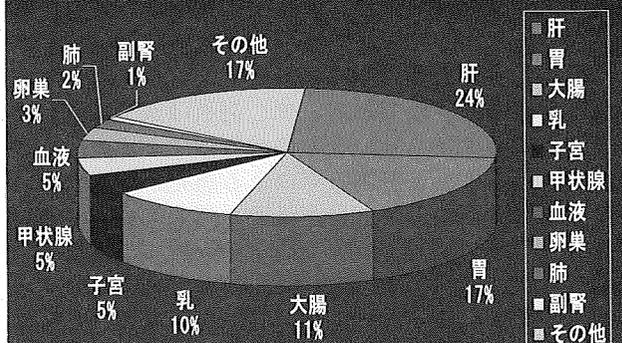


図5 診断時肝組織学的的病期 (Scheuer分類)

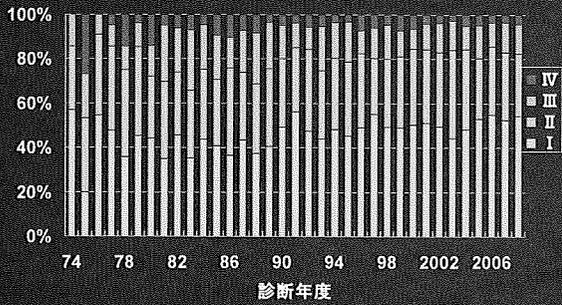


表5 登録時ウルソデオキシコール酸(UDCA)による治療の有無

	a-PBC	s-PBC	Total
非使用	853(12.0)	491( 6.9)	1344(18.9)
使用	4180(58.9)	1574(22.2)	5754(81.1)
Total	5033(70.9)	2065(29.1)	7098(100)

( ):%

図6 第14回調査における治療薬剤

新規702例、追跡2129例の計2831例

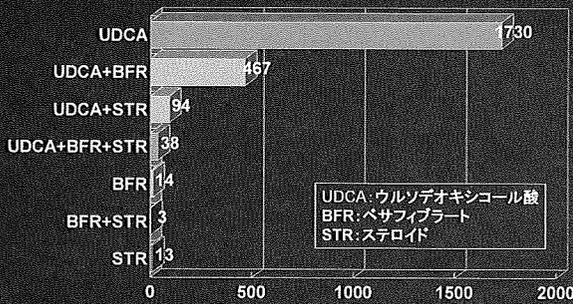


表6 予 後 (不明を除く4970例)

生存中	3736例
死 亡	1114例
肝不全	583例
消化管出血	146例
肝不全+消化管出血	13例
肝細胞癌	25例
その他	347例
肝移植	120例

図7 死亡年次別にみた死因

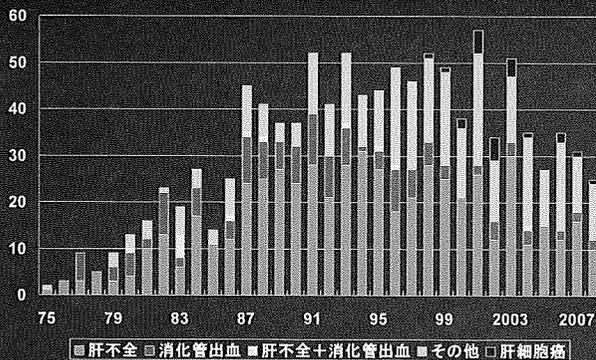


表7 臨床病期の推移別症例数とその転帰

診断時病期	最終確認病期	
	a	S
a (n=4624)	3734(80.8)	890(19.2)
	3693/41	704/186
s (n=1834)	563(30.7)	1271(69.3)
	552/11	838/433

図8 診断時臨床病期別生存率

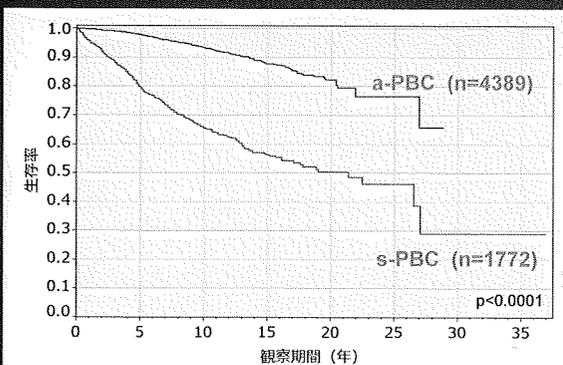


図9 肝移植数の年次推移

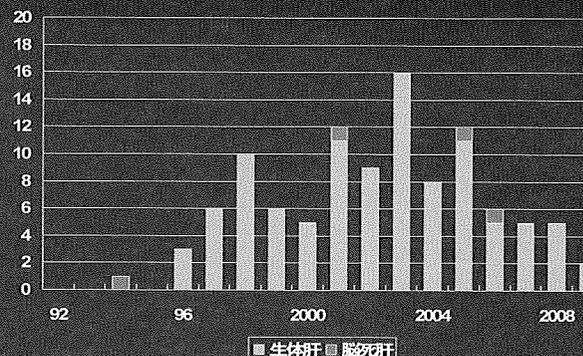


図10 肝移植症例の生存率 (n=108)

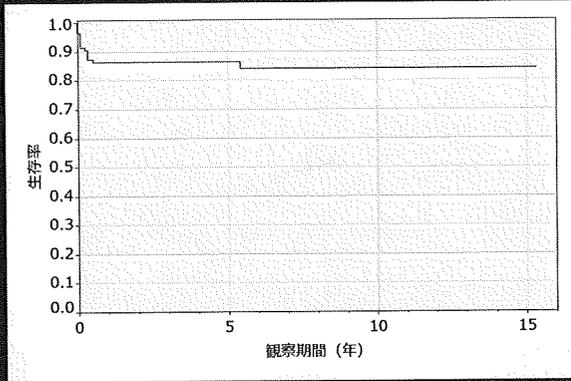
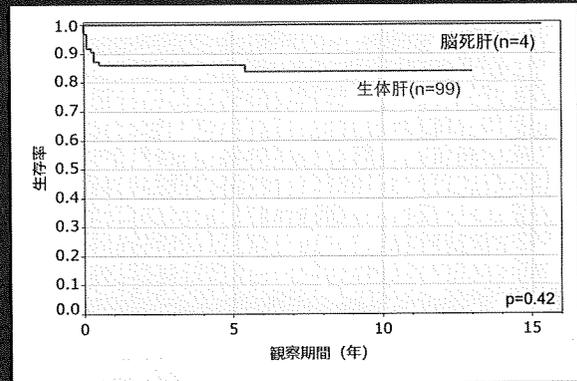


図11 移植方法別にみた生存率



# 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の長期予後予測のためのバイオマーカーの同定

研究分担者 石橋 大海 長崎医療センター 臨床研究センター長

**研究要旨：**我々は、国立病院機構肝疾患共同研究グループ（NHOSLJ）による多施設共同研究を行い、抗 gp210抗体と抗セントロメア抗体がPBC進行の異なった危険因子であることを報告してきた。今年度は、HLA-DRB1遺伝子多型がこれらの危険因子に及ぼす影響について検討した。抗 gp210抗体陽性、抗セントロメア抗体陽性は順に黄疸進行、門脈圧亢進症進行の危険因子であり、HLA-DRB1\*0405と\*0803は順に抗 gp210抗体産生、抗セントロメア抗体産生の危険因子であった。また、HLA-DRB1\*0803と\*0405はPBC発症の危険因子、HLA-DRB1\*1502と\*0901は門脈圧亢進症進行の危険因子であった。HLA-DRB1で層別化して解析すると、抗 gp210抗体はHLA-DRB1の遺伝子多型にかかわらず黄疸進行の危険因子であったのに対し、抗セントロメア抗体はHLA-DRB1\*0405と\*0803において門脈圧亢進症進行の有意な危険因子であった。HLA-DRB1遺伝子多型は、PBC発症・進行、抗 gp210抗体や抗セントロメア抗体の産生と関連があるだけでなく、抗核抗体のPBC進行に対する相対危険度を規定していることが明らかとなった。

#### 共同研究者

中村 稔 長崎大学大学院肝臓病学講座)  
小森 敦正 長崎医療センター臨床研究センター)  
安波 道郎 長崎大学熱帯医学研究所)  
国立病院機構肝疾患共同研究班 (NHOSLJ)  
PBC共同研究参加施設 (27施設)

#### A. 研究目的

抗 gp210抗体と抗セントロメア抗体がPBC進行の異なる危険因子であることを報告してきたが、今年度は、HLA-DRB1遺伝子多型がこれらの危険因子に及ぼす影響について検討した。

#### B. 研究方法

国立病院機構肝疾患共同研究グループ（NHOSLJ）PBC研究班（27施設）を組織し、PBCの患者登録、定期的血清保存、DNA採取を、各施設の倫理審査委員会による承認後、患者から書面で同意を得た後に行った。今回の解析対象は、研究班に登録されたPBC症例の中で、2008年8月までに遺伝子解析の同意の得られた334症例（男45、女289、年齢30～85歳、中央値58）。抗核抗体（抗 gp210、抗セントロメア）はELISA法で測定し、HLA-DRB1の遺伝子多型はsequence-based typing（SBT）法で決定した。PBCの臨床病期を以下の如く定義して、PBC進行とHLA-DRB1の遺伝子多型や抗核抗体との関連について解析した。

Clinical Stage I（非進行期）：食道静脈瘤、腹水、肝性脳症、黄疸、画像上高度の肝不整、線維化など肝硬変の所見を認めない。

Clinical Stage II（門脈圧亢進症進行期）：食道静脈瘤、腹水、肝性脳症、画像上高度の肝不整、線維化など肝硬変の所見を認めるが黄疸は認めない。

Clinical Stage III（黄疸進行期）：持続する黄疸（T.Bil >2.0mg/dl）を認める。

#### C. 研究結果

観察開始時には、clinical stage I, II, IIIの症例数は順に283, 49, 2であったが、観察終了時（観察期間：1～42ヵ月、median 57）には、順に238, 78, 18症例であった。抗ミトコンドリア抗体、抗 gp210抗体、抗セントロメア抗体陽性率は、観察開始時には順に89.5%, 30.8%, 25.1%であったが、観察終了時には順に88.6%, 32.0%, 24.6%であった。PBC患者のHLA-DRB1 alleleの頻度は、HLA-DRB1\*0405 (OR:1.53,95%CI:1.11-2.11)と\*0803 (OR:2.24, 95%CI:1.48-3.41)が日本人一般集団に比べて有意に増加していた。PBC病期進行の危険因子は、抗 gp210抗体陽性 (OR:46.56,95%CI:9.20-850.1)、抗セントロメア抗体陽性 (OR:2.36, 95%CI:1.28-4.35)が順に黄疸進行、門脈圧亢進症進行の危険因子であった。HLA-DRB1\*0405と\*0803が順に抗 gp210抗体産生 (OR:1.61, 95%CI:1.08-2.39)、抗セントロメア抗体産生 (OR:2.30,95%CI:1.41-3.73)の危険因子であった。HLA-DRB1遺伝子多型がPBCの進行に及ぼす影響は、HLA-DRB1\*1502 (OR:1.98, 95%CI: 1.13-3.40)、\*0901 (OR:1.78, 95%CI: 1.02-3.03)が門脈圧亢進症進行の危険因子であった。HLA-DRB1 allele別の抗核抗体による予後予測は、抗 gp210抗体はHLA-DRB1の遺伝子多型にかかわらず強い黄疸進行の危険因子であったのに対し、抗セントロメア抗体はHLA-DRB1\*0405 (OR:6.89,95%CI:2.18-26.56)と\*0803 (OR:5.42,95%CI:1.47-24.62)においてのみ門脈圧亢進症の有意な危険因子であった。

#### D. 考察

HLA-DRB1遺伝子多型はPBC発症や進行、抗 gp210抗体や抗セントロメア抗体の産生と関連があるだけでなく、抗核抗体によるPBC進行の相対危険度を規定していることが明らかとなった。従って、抗核抗体をPBC進行の血清マーカーとして用いる場合には、HLA-DRB1遺伝子多型の影響を考慮する必要があると思われる。

## E. 結 論

抗 gp210抗体, 抗セントロメア抗体の測定に加えて HLA-DRB4遺伝子多型を調べることにより, より正確な PBC の予後予測が可能であることが示唆された。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakamura M, Yasunami M, Kondo H, Horie H, Aiba Y, Komori A, Migita K, Yatsushashi H, Ito M, Shimoda S, Ishibashi H and PBC Study Group in NHOSLJ. Analysis of HLA-DRB1 polymorphisms in Japanese patients with primary biliary cirrhosis (PBC): the HLA-DRB1 polymorphism determines the relative risk of antinuclear antibodies for disease progression in PBC. *Hepatology Research* in press 2010
- 2) Migita K, Ilyassova B, Kovzel EF, Nersesov A, Abiru S, Maeda Y, Komori A, Ito M, Yano K, Yatsushashi H, Shimoda S, Ishibashi H and Nakamura M. Serum Baff and APRIL levels in patients with PBC. *Clin Immunol* 2010;134:217-225.
- 3) Nakamura M, Yasunami M, Kondo H, Aiba Y, Komori A, Migita K, Yatsushashi H, Nakamura M, Hayashi S, Saito A, Honda K, Shimada M, Watanabe Y, Yagura M, Kohno H, Sugi K, Ota H, Komatsu T, Mannami T, Koga M, Satoh T, Takesaki E, Yamamoto T, Oohara Y, Masaki N, Ishibashi H. Analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Japanese patients with primary biliary cirrhosis- HLA-DRB1 polymorphism determines the relative risk of anti-nuclear antibodies for the disease-progression in PBC. *Hepatology*, Volume 50, Number 4 (Suppl), October 2009, 1004A, 1521.
- 4) Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Shimoda S. Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol* 2009 Sep;31(3):399-409
- 5) 中村 稔, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変の長期予後診断と治療. 自己免疫性肝胆膵疾患 - 最新知見. *医学のあゆみ* Vol. 228 No9:889-894, 2009
- 6) 中村 稔, 相葉佳洋, 小森敦正, 石橋大海. 肝疾患難病“原発性胆汁性肝硬変”の新規マーカーによる予後予測. *医療* Vol.63, No6:357-362, 2009
- 7) 中村 稔, 塚元和弘, 安波道郎, 近藤久義, 中牟田誠, 小森敦正, 相葉佳洋, 右田清志, 八橋 弘, 石橋大海. Multidrug resistant protein 3(MDR3) 遺伝子多型による原発性胆汁性肝硬変の予後遺伝子診断. 消化器疾患におけるエピゲノミクスとゲノミクス, 第16回浜名湖シンポジウム論文集, p81-83, アークメディア, 東京.

### 2. 学会発表

- 1) 中村 稔, 塚元和弘, 安波道郎, 近藤久義, 相葉佳洋, 小森敦正, 右田清志, 八橋 弘, 竿代丈夫, 林 茂樹, 中牟田誠, 本田浩一, 杉 和洋, 島田昌明, 小林正和, 渡部幸夫, 森本日出雄, 矢倉道泰, 正木尚彦, 高野弘嗣, 竹崎英一, 小松達司, 山下晴弘, 加藤道夫, 古賀満明, 長岡進矢, 矢野公士, 阿比留正剛, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変の予後診断法の確立のための遺伝子解析. 第45回日本肝臓学会総会. 神戸, 2009.6.4-5. 肝臓 50巻 2009, suppl.(1), A162, O-78.
- 2) 小森敦正, 中村 稔, 本吉康英, 橋元 悟, 裴成寛, 立山雅邦, 長岡進矢, 柳 謙二, 田 直太, 阿比留正剛, 矢野公士, 右田清志, 八橋 弘, 石橋大海. 当科における PBC-AIH overlap 症候の特徴と予後. 第45回日本肝臓学会総会. 神戸, 2009.6.4-5. 肝臓 50巻 2009, suppl.(1), A391, P-291.
- 3) 右田清志, 中村 稔, 阿比留正剛, 小森敦正, 矢野公士, 八橋 弘, 石橋大海. PBC 患者における血清 BAFF の測定. 第45回日本肝臓学会総会. 神戸, 2009.6.4-5. 肝臓 50巻 2009, suppl.(1), A392, P-293.
- 4) 中村 稔, 安波道郎, 近藤久義, 相葉佳洋, 小森敦正, 長岡進矢, 阿比留正剛, 八橋 弘, 右田清志, 石橋大海. HLA-DRB1 遺伝子多型が抗核抗体による原発性胆汁性肝硬変の予後予測に及ぼす影響の検討. 第46回日本消化器免疫学会総会. 松山, 2009.7.23-4.
- 5) 相葉佳洋, 中村 稔, 小森敦正, 右田清志, 八橋弘, 塚本和弘, 石橋大海. 日本人原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 患者の CTLA-4 一塩基多型 (SNP) の解析. 第46回日本消化器免疫学会総会. 松山, 2009.7.23-4.
- 6) 下田慎治, 中村 稔, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変における慢性非化膿性破壊性胆管炎の場で特異的発現を示すケモカイン, 特に CX3CL1 の産生機序と自然免疫の関与. 第17回浜名湖シンポジウム, 2009.12.22-3, 浜松
- 7) Nakamura M, Yasunami M, Kondo H, Aiba Y, Komori A, Migita K, Yatsushashi H, Nakamura M, Hayashi S, Saito A, Honda K, Shimada M, Watanabe Y, Yagura M, Kohno H, Sugi K, Ota H, Komatsu T, Mannami T, Koga M, Satoh T, Takesaki E, Yamamoto T, Oohara Y, Masaki N and Ishibashi H. Analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Japanese patients with primary biliary cirrhosis (PBC) - HLA-DRB1 polymorphism determines the relative risk of anti-nuclear antibodies for the disease-progression in PBC. *Hepatology*, Volume 50, Number 4 (Suppl), October 2009, 1004A, 1521. Boston 2009.11.3
- 8) Nakamura M, Ito M, Aiba Y, Komori A, Migita K, Yatsushashi H and Ishibashi H. Hepatic

expression of peroxisome proliferators activated receptors A(PPARA) in primary biliary cirrhosis. Joint EASL-AASLD Monothematic Conference. Nuclear Receptors and Liver Disease. Abstract page 87. Vienna 2009.2.28

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

I. 国立病院機構肝疾患共同研究班（NHOSLJ）

PBC 共同研究参加施設（27施設）

西札幌病院，仙台医療センター，東京病院，横浜医療センター，まつもと医療センター松本病院，金沢医療センター，大阪医療センター，呉医療センター，岡山医療センター，小倉医療センター，九州医療センター，大分医療センター，災害医療センター，西埼玉中央病院，相模原病院，名古屋医療センター，京都医療センター，嬉野医療センター，東京医療センター，米子医療センター，熊本医療センター，別府医療センター，東広島医療センター，道北病院，南和歌山医療センター，国立国際医療センター戸山病院，長崎医療センター

# 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 肝臓における CX3CL1 の産生機序

研究協力者 下田 慎治 九州大学大学院 病態修復内科学 助教

研究要旨：PBC では病理学的解析より慢性非化膿性破壊性胆管炎の場合には胆管上皮細胞での CX3CL1 の産生が亢進していることが明らかとなっていた。今回我々は、非代償性肝硬変からの摘出肝臓検体を用いた解析より、自然免疫である Toll 様受容体3リガンド、Toll 様受容体4リガンドが各々胆管上皮細胞と単球に作用して、細胞間接触とその間に単球より産生される TNF- $\alpha$  の刺激で胆管上皮細胞から CX3CL1 が産生されることを明らかとした。この事実は今後 PBC において、自然免疫に対する反応性の亢進を制御することで新規治療の基盤となる可能性を示すものである。

#### A. 研究目的

PBC において、CX3CL1 の末梢血中濃度の上昇、傷害胆管での CX3CL1 産生亢進、傷害胆管周囲への CX3CL1 受容体陽性細胞の浸潤が明らかになった。すなわち PBC の胆管傷害に、胆管の産生する CX3CL1 と、このケモカインに反応する細胞が病因病態に関与することが明らかになった。そこで今回我々は、胆管がどのようにして CX3CL1 を産生するかについてを明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

九州大学病院で、非代償性肝硬変の生体肝移植の際に摘出された PBC 肝臓（例）と非 PBC 肝臓（例）を対象とした。肝臓は無菌的にコラゲナーゼ処理後、密度勾配法で単核球分画を採取した。壁付着細胞と非壁付着細胞にわけ、非壁付着細胞は肝臓浸潤リンパ球として液体窒素に保存した。壁付着細胞は抗上皮細胞抗体付きイムノビーズで選択し、サイトケラチン7、19 陽性アルブミン陰性であることから胆管上皮細胞と同定し以後専用培養液で培養した。継代培養は3代までとして実験を行った。

- (1) 胆管上皮細胞は Toll 様受容体2, 3, 4, 5 を発現していることから、胆管上皮細胞を各々のリガンドであるリポタイコ酸 (LTA), Poly I:C, リポポリサッカロイド (LPS), フラジェリン (Flagellin) で刺激し、その上清を回収し CX3CL1 の産生を ELISA で検討した。
- (2) 炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 を Toll 様受容体リガンドとともに用いて胆管上皮細胞での CX3CL1 産生を検討した。
- (3) 自己肝臓浸潤リンパ球を液体窒素から凍結解凍し、radiation をあてることでリンパ球からの CX3CL1 の産生はされない状態で、炎症性サイトカイン、Toll 様受容体リガンドの存在下で胆管上皮細胞と自己肝臓浸潤リンパ球を共培養して、胆管上皮細胞での CX3CL1 を検討した。
- (4) 肝臓浸潤リンパ球はどの Toll 様受容体リガンドで刺激した際に強く TNF- $\alpha$  を産生するかを検討した。
- (5) 肝臓浸潤リンパ球のどの分画が TNF- $\alpha$  を産生す

るかをしらべるために、肝臓浸潤リンパ球をイムノビーズで T 細胞, 単球, NK 細胞, NKT 細胞, ミエロイド樹状細胞に分けて LPS での刺激を行い、上清の TNF- $\alpha$  産生を ELISA で検討した。

- (6) 最後に胆管上皮細胞での CX3CL1 産生の系を単純化する目的で、Poly I:C 刺激した胆管と LPS 刺激した単球を共培養しその上清中の CX3CL1 の産生を ELISA で検討した。

#### C. 研究結果

- (1) 胆管上皮細胞は Toll 様受容体2, 3, 4, 5 リガンドで刺激しても CX3CL1 の産生を認めなかった。
- (2) IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 を Toll 様受容体リガンドとともに用いたが、胆管上皮細胞での CX3CL1 産生は認められなかった。
- (3) 炎症性サイトカイン、Toll 様受容体リガンドの存在下で胆管上皮細胞と自己肝臓浸潤リンパ球を共培養した結果、TNF- $\alpha$ , Poly I:C の刺激で胆管上皮細胞が CX3CL1 を産生する事が明らかとなった。この産生量に PBC と非 PBC で有意差はなかった。
- (4) 肝臓浸潤リンパ球は LPS 刺激でもっとも TNF- $\alpha$  を産生することが明らかとなった。
- (5) 肝臓浸潤リンパ球の中では単球が最も強く TNF- $\alpha$  を産生することが明らかとなった。単球 LPS 刺激での TNF- $\alpha$  産生は PBC で有意に非 PBC よりも亢進していた。
- (6) 上清中に CX3CL1 の産生を認め、かつ PBC で有意に非 PBC よりも亢進していた。

#### D. 考 察

単球を Toll 様受容体4のリガンドで刺激した際に PBC で有意に TNF- $\alpha$  の産生亢進を認め、さらに胆管上皮細胞を Toll 様受容体3のリガンドで、単球を Toll 様受容体4のリガンドで刺激した際に PBC で有意に CX3CL1 の産生亢進を認めたことから、PBC での単球と胆管上皮細胞は、各々別の Toll 様受容体リガンドに対する反応性が亢進しており、その結果として、PBC で特徴的な慢性非化膿性破壊性胆管炎の像を呈することが示唆された。

## E. 結 論

PBCにおいて、自然免疫に対する反応性の亢進を制御することが新規治療の基盤となる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) CX3CL1 (fractalkine) : A signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis. Shimoda S, Harada K, Niuro H, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Kikuchi K, Nakanuma Y, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K. Hepatology in press.
- 2) Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. Harada K, Shimoda S, Sato Y, Isse K, Ikeda H, Nakanuma Y. Clin Exp Immunol. 2009 Aug;157(2):261-70.
- 3) Lymphocyte recruitment and homing to the liver in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. Borchers AT, Shimoda S, Bowlus C, Keen CL, Gershwin ME. Semin Immunopathol. 2009 Jun 17.
- 4) Liver architecture, cell function, and disease. Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Shimoda S. Semin Immunopathol. 2009 May 26.
- 5) T cell leukemia/lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naive and IgM+ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. Tabrizi SJ, Niuro H, Masui M, Yoshimoto G, Iino T, Kikushige Y, Wakasaki T, Baba E, Shimoda S, Miyamoto T, Hara T, Akashi K. J Immunol. 2009 Feb 1;182(3):1490-9.

### 2. 学会発表

CX3CL1を産生する肝臓構築細胞の検索  
第45回 日本肝臓学会総会

## 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

### 胆汁うっ滞におけるコレステロールの実態-ABCA1トランスポーターの働き

研究協力者 向坂彰太郎 福岡大学医学部 消化器内科 教授

**研究要旨：**胆汁うっ滞時に血清コレステロール値が上昇するが、その機序については明らかではない。以前の研究で、ラットの胆管結紮モデル肝とPBC患者の生検肝を用いて肝内 ABCA1トランスポーターの発現について検討し、ラットモデル、PBC患者ともに肝内 ABCA1トランスポーターの発現が増強している事を報告した。今回、培養肝細胞に Si-ABCA1 をトランスフェクトし、ABCA1 の発現を抑えて、上清中のコレステロール値を測定した。発現を抑えた細胞の上清中のコレステロール濃度は、コントロール群に比べて優意に低下していた。肝細胞を用いた研究でも、ABCA1トランスポーターは、肝細胞からコレステロールを排出する機能に働いているものと考えられた。

#### 共同研究者

竹山 康章 福岡大学医学部消化器内科 講師

#### A. 研究目的

胆汁うっ滞では、胆汁の流出または生成の障害により、通常胆汁中に排出される物質の血中濃度の上昇をきたす。胆汁うっ滞性疾患である原発性胆汁性肝硬変症（PBC）や原発性硬化性胆管炎（PSC）などの患者では、血清コレステロール値が増加する事が知られている。その機序に関しては胆汁中コレステロールの大循環への逆流と考えられており、我々はPBC、PSC患者の胆管細胞あるいは肝細胞間の tight junction の破綻を形態学的に確認し報告した（Sakisaka S. et al. Hepatology 2001）。さらに肝細胞内の ABCA1トランスポーターに着目し、ラットモデル、PBC患者肝（in vivo）において、ABCA1トランスポーターの発現を検討し、胆汁うっ滞時における高コレステロール血症の出現に関わる事を報告した。今回は、培養肝細胞（in vitro）を用いて、ABCA1トランスポーターの発現を抑制した状態での、コレステロール動態について検討した。

#### B. 研究方法

##### ① SiABCA1培養

肝細胞（WIF-B細胞）に、Si-ABCA1 RNA（Dharma社）をDharma社のプロトコルに基づいてトランスフェクトした。（Transfection 試薬 FECT4）。

##### ② 発現抑制確認

ABCA1のタンパクレベルをWestern blotを用いて、mRNAレベルをreal-time RT PCR法を用いて測定した。

##### ③ コレステロール測定

Si-ABCA1 RNAトランスフェクト前後の培養細胞上清中のコレステロール濃度を測定した。濃度値はトランスフェクト後よりトランス前の値を差し引いた。

#### C. 研究結果

##### ① Si-ABCA1をトランスフェクトしたWIF B細胞

の ABCA1トランスポーターの RNA レベル、蛋白レベルは、コントロール群と比べて優位に減少していた（ $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ）（Fig.1）。

②細胞培養液中のコレステロール濃度は、コントロールは $0.62 \pm 0.14 \mu\text{g/dl}$ 、Si-ABCA1群では $-0.12 \pm 0.078 \mu\text{g/dl}$ と ABCA1を抑制した群は、優意に低下していた（ $P < 0.001$ ）（Fig.2）。

#### D. 考 察

In vitroの実験系において、ABCA1トランスポーターの発現をノックアウトすると、細胞外のコレステロール濃度は低くなった。同じ細胞（WIF-B細胞）を用いた他研究者の報告で、ABCA1トランスポーター発現を増強させた時に、細胞外のコレステロール濃度が高くなる結果が得られている。さらに以前、我々が胆汁うっ滞ラットモデル肝、PBC患者肝を用いた結果から、ABCA1トランスポーターは、肝細胞外へのコレステロールの排出に重要な役割をなしているものと考えられた。

#### E. 結 論

1. In vitroの培養肝細胞を用いての研究において、ABCA1トランスポーターは、コレステロールの肝細胞外への排出に関わっている事が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takeyama Y, Uehara Y, Inomata S, et al. Alternative transporter pathways in patients with untreated early-stage and late-stage primary biliary cirrhosis. Liver International 29, 406-414, 2009.
- 2) Takeyama Y, Kanegae K, Inomata S, et al. Sustained upregulation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide and bile salt export pump and downregulation of cholesterol

7 *a* -hydroxylase in the liver of patients with end-stage primary biliary cirrhosis. Medical Molecular Morphology (in Press) 2010

3) 「肝移植が難治性原発性胆汁性肝硬変と原発性硬化性胆管炎を救う：問題点とその解決」向坂彰太郎, 竹山康章, PBC, PSCと肝移植 第4回伊豆肝臓カンファレンス記録, 118-121, 2009. アークメディア 市田隆文 編集

4) 「7. 体質性黄疸」竹山康章, 向坂彰太郎. 消化器研修ノート 464-465, 2009年12月25日, 診断と治療社. 永井良三 編集

5) 「13. 肝内胆汁うっ滞」竹山康章, 向坂彰太郎. 消化器研修ノート 484-485, 2009年12月25日, 診断と治療社. 永井良三 編集

6) 「8. 肝・胆・膵疾患 薬物性肝障害 drug-induced liver injury」向坂彰太郎. 今日の治療指針 2009, 403-404, 医学書院

7) 「原発性硬化性胆管炎」向坂彰太郎. 新臨床内科学 (第9版) 2009, 628-630, 医学書院

## 2. 学会発表

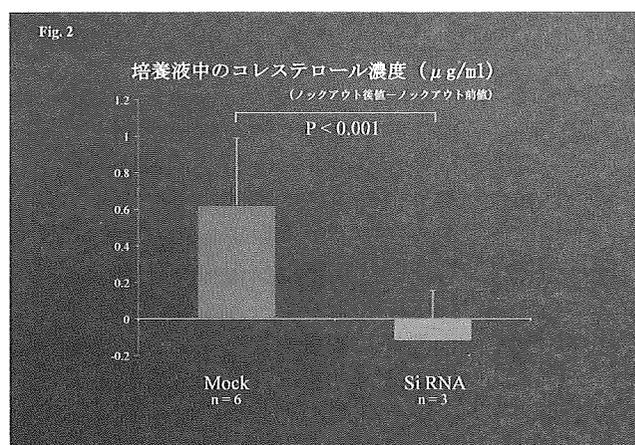
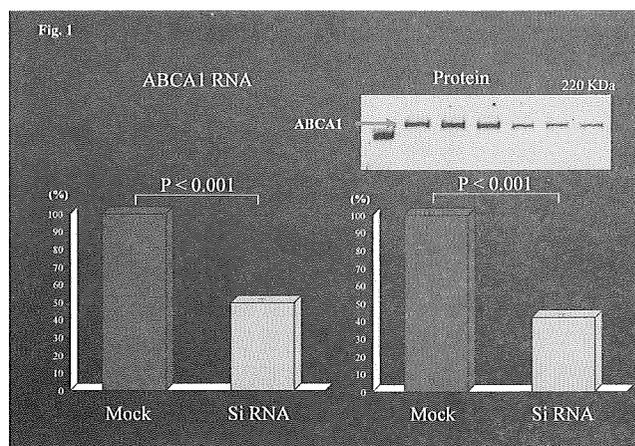
### 1. ウィルソン病10症例の検討

竹山康章, 早田哲郎, 向坂彰太郎

第38回日本肝臓学会西部会 2009年12月4日

## 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MDR3の発現意義

研究協力者 中牟田 誠 国立病院機構九州医療センター 医長

研究要旨：MDR3は胆汁へのリン脂質を排出するトランスポーターであるが、PBC肝においてはMDR3の遺伝子発現は亢進しており、胆管傷害のマーカーであるALPと正の相関を示す。今回は、リン脂質であるフォスファチジルコリン産生関連遺伝子の発現をPBC肝において検討したので報告する。フォスファチジルコリン産生経路には、コリンからCCTにより産生されるCDPコリン経路（Kennedy経路）とエタノールアミンからPEMTやBHMTにより産生されるメチル化経路の二つが存在する。PBC肝においては、正常肝に比べてCCT、PEMT、BHMTのいずれも発現は低下していた。また、血清コリン値は逆に増加していた。以上のことは、PBC肝においては、コリンの取り込みが低下し肝内コリンが欠乏していることが示唆され、今後、コリン取り込みに関連するトランスポーターの解析が必要と思われた。

#### 共同研究者

- 大橋 朋子 国立病院機構九州医療センター・臨床研究センター・消化器科
- 福島 伸良 国立病院機構九州医療センター・臨床研究センター・消化器科
- 藤野 達也 国立病院機構九州医療センター・臨床研究センター・消化器科
- 青柳 葉子 国立病院機構九州医療センター・臨床研究センター・消化器科
- 矢田 亮子 国立病院機構九州医療センター・臨床研究センター・消化器科
- 山本 直子 国立病院機構九州医療センター・臨床研究センター・消化器科
- 原田 林 国立病院機構九州医療センター・臨床研究センター・消化器科
- 吉本 剛志 国立病院機構九州医療センター・臨床研究センター・消化器科
- 福泉公仁隆 国立病院機構九州医療センター・臨床研究センター・消化器科
- 武富 紹信 九州大学大学院消化器・総合外科学
- 前原 喜彦 九州大学大学院消化器・総合外科学
- 塚元 和弘 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬物治療学
- 野崎 雄一 横浜市立大学大学院分子消化管内科学
- 中島 淳 横浜市立大学大学院分子消化管内科学

#### A. 研究目的

MDR3は肝細胞において胆汁へのリン脂質のトランスポーターである。近年、フィブレート系薬剤がPPAR $\alpha$ を介してMDR3の発現を増強することが知られている。PBCにおいても、ウルソ酸にて効果不十分な症例に対してセカンドラインの薬剤として使用されている。その作用機序としては、胆汁中へのリン脂質の排出を増加させ、胆管傷害を起こしうる疎水性胆汁酸をミセル化することにあると考えられている。我々は現在まで本研究班において、PBC肝においては正常肝に比較して、著しくMDR3の遺伝子発現が亢進していること、しかもそれがPBCの初期段階か

ら起こっていることを報告して来た。今回は、MDR3がトランスポートする主要リン脂質であるフォスファチジルコリン（PC）の産生機構につき検討したので報告する。

#### B. 研究方法

治療前の肝生検組織（n=17）と正常肝（生体肝移植ドナー肝）（n=56）よりRNAを抽出し、real-time RT-PCR法により、ターゲット遺伝子の発現を定量化し、比較検討した。また、血清コリン値を測定した。

#### C. 研究結果

PCの産生には、①コリンよりCCT（CTP phosphocholine cytidyryltransferase）を介して産生されるCDPコリン経路（Kennedy経路）と、②エタノールアミンとS-AdenosylmethionineよりPEMT（PE N-methyltransferase）を介するメチル化経路、の2種類が存在する。なお、S-Adenosylmethionineはメチオニンより生成されるが、メチオニンはホモシスチンよりBHMT（betaine homocystein methyltransferase）を介しても生成される。PBC肝においては、これらのいずれの遺伝子（CCT、PEMT、NHMT）の発現も低下していた。また、血清コリン値は正常に比べて明らかに増加していた（図）。

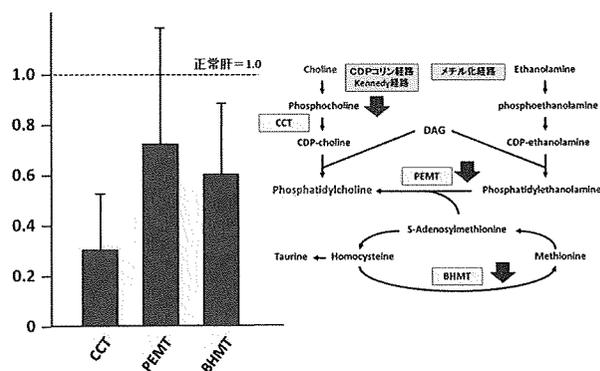


図 PBC肝におけるフォスファチジルコリン産生関連遺伝子の発現