

時無症状であった肝内結石症128例を対象としその自然経過を観察した。経過中に症状が出現した症例は16例(12.5%)であり、その発症様式は胆管炎(単独)5例、落下結石6例、肝膿瘍3例、肝内胆管癌併発2例であった。症状出現例は無症状例に比べてIE型、L型の頻度が高く、肝葉萎縮例が有意に多かった。また、肝内結石症に関連する死亡は、症状出現例で肝内胆管癌死3例、肝不全死1例の計4例であったが、無症状例には見られなかった。肝葉萎縮が症状出現の危険因子であることが示唆され、肝葉萎縮を重視して治療方針を決定することが重要であると考えられた。

(2) 診断・治療

榑野研究協力者は、過去21年間に肝切除を施行した肝内結石症60例(男性33例、女性27例、平均年齢60歳)の治療成績を検討した。結石存在部位は肝内型52例、肝内外型8例、右葉型14例、左葉型37例、両葉型9例であった。16例が胆管癌を、1例が肝細胞癌を併発していた。14例で過去に胆道系の手術既往を有していた。肝切除の術式は外側区域切除15例、左葉切除21例、左3区域切除9例、右葉切除11例、右3区域切除2例、その他2例であった。胆道再建は26例で施行されていた。SSIを60例中7例(11.6%)に認めたが、在院死はなく術後平均在院日数は28日であった。術後2例で肝内結石が再発し、PTCSにより切石した。肝内結石症に対する治療法として肝切除術は適切であると考えられた。

山上研究協力者は、最近15年間の肝内結石症治療のために肝切除を施行した43例で、最も一般的な術後合併症である手術部位感染(SSI)の頻度について、原発性肝癌や転移性肝癌の肝切除術後と比較検討した。SSIの頻度はSuperficial incisional, Deep incisional, Organ/Space SSIの全てを合わせて原発性肝癌では11.4%、転移性肝癌で2.8%であったが、肝内結石症では23.8%と有意に高頻度であった。肝内結石症では胆汁中細菌の検出頻度が83.3%と高いことが原因の1つと考えられた。

露口研究協力者は、原発性硬化性胆管炎(30症例)をretrospectiveに検討し、肝内結石を合併した症例の背景や危険因子を考察した。観察期間内に5例に肝内結石症を合併した。肝内結石合併症例と非合併症例について比較した結果、肝内結石合併症例は非合併例に比べ比較的高齢であった。高度多発狭窄と末梢肝内胆管のびまん性の拡張を合併しており、左右両葉に複数個の結石を生じていた。5例中3例で重症胆管炎を発症した。入院を要する胆管炎の発症や乳頭切開の有無、内視鏡的治療の介入の有無については有意差を認めなかった。肝内結石合併症例で有意に胆管結石の合併が多く、重症胆管炎の合併も有意に多くみられた。PSCでは胆管炎や内視鏡的治療の有無に関わらず肝内結石の合併を認める症例があり、肝内結石合併例では有意に重症胆管炎の合併が多く、急性胆管炎のリスクが高いことを念頭に慎重に対応する必要があると考えられた。

海野研究協力者は、手術術式の選択に難渋した肝内結石症治療例から「肝外側区域切除術後に残肝再発をきたし肝右葉切除を施行した症例」「胆道癌との鑑別に苦慮した肝内結石症の2症例」でその治療方針に関する検討を行った。

(3) 発癌・治療

田妻研究協力者は、肝内結石症での胆管癌合併メカニズム解明を目的として、胆汁脂質成分変化に伴う肝内胆管障害からの発癌プロセスの可能性を検討した。リン脂質の分解産物であるリゾ・リン脂質は胆管上皮細胞のアポトーシスを誘導した。そのメカニズムとしてGPCR(G2A)発現増強が関与していたことから、PLA2およびG2Aを標的とした治療戦略の可能性が示唆された。

中沼研究分担者は、肝内結石症における上皮内癌の出現様式を病理組織学的に検討した。肝内結石症の外科的切除材料の組織プレパラートを観察し、上皮内癌を正常胆管上皮への顕微鏡的な移行形態に基づき、BilIN-3(多段階発癌の過程が推測される上皮内病変)とintraepithelial carcinoma(IEC;正常胆管上皮との間に明瞭なフロントを形成する病変で、癌の表層進展やde novoの発癌病変が含まれる)の2つに分類して検討した。その結果、肝内結石症で出現する上皮内癌の多くは多段階発癌に由来するBilIN-3と考えられたが、それとは異なる上皮内癌(IEC)の出現様式が存在し、両者はいくつかの異なる病理組織学的特徴を有することが明らかとなった。

正田研究協力者は、肝内胆管癌細胞に対するSorafenibの抗腫瘍効果を*in vivo*モデルにおいて検討した。Sorafenibは用量依存性に皮下腫瘍の増大を抑制し、また、腫瘍組織における血管新生をも抑制した。腹膜播種モデルにおいても、用量依存性に腫瘍の進展を抑制し、モデル動物の生存期間を有意に延長した。Sorafenibは*in vivo*モデルにおける肝内胆管癌の増大と進展を抑制したことより、本癌腫に対する新しい治療薬として有用である可能性が示唆された。

本多研究協力者は、肝内結石症からの発癌の早期発見を目的とし、胆汁におけるmicroRNA(miRNA)に着目し腫瘍マーカーとしての可能性を検討した。腫瘍群13例、非腫瘍群11例の胆汁中における380種のmiRNAをTaqMan-PCR法を用いて測定した結果、クラスター解析により腫瘍群と非腫瘍群で概ね群別され、胆汁中におけるmiRNA発現が腫瘍群と非腫瘍群で異なることが明らかとなった。さらに有意変動の大きいmiRNAから腫瘍群と非腫瘍群を分ける15個のmiRNAを同定した。以上より、胆道系腫瘍に特異的なmiRNAを同定し、腫瘍マーカー候補を抽出できる可能性が示唆された。

Ⅲ. 分 担 研 究 報 告

Ⅲ-1. 自己免疫性肝炎分科会

【ワーキンググループ (WG) 研究報告】

1. 診療指針の作成 WG

愛媛大学大学院 先端病態制御内科学 恩地 森一

2. 診断指針の作成 WG

東京慈恵会医科大学大学院医学系研究科 器官病態・治療学 消化器内科 銭谷 幹男

3. 治療 WG

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・肝臓内科学 山本 和秀

【分担研究報告】

1. 自己免疫性肝炎における BAFF とインスリン抵抗性

愛媛大学大学院 先端病態制御内科学 恩地 森一

2. 自己免疫性肝炎患者における末梢リンパ球抑制性マーカーの検討

昭和大学医学部 内科学講座消化器内科学部門 広石 和正

3. 自己免疫性肝炎の病態とサイトカインネットワークの解析

信州大学医学部 内科学第二 吉澤 要

4. 自己免疫性肝炎モデルにおける肝内 NKT 細胞の動態解析

東京慈恵会医科大学大学院医学系研究科 器官病態・治療学 消化器内科 銭谷 幹男

5. 自己免疫性肝炎におけるエストロゲンレセプターの解析

福井県立医科大学 消化器・リウマチ膠原病内科 大平 弘正

6. 自己免疫性肝炎の診断：3 因子スコア加算モデルによる複数の疾患を想定する場合

国際医療福祉大学 塩谷病院 森實 敏夫

7. 自己免疫性肝炎の病態と予後の解明

慶応義塾大学医学部 消化器内科 日比 紀文

8. 自己免疫性肝炎治療難治例の解析

虎の門病院分院 臨床検査部 鈴木 義之

9. 自己免疫性肝炎における抗 HLA 抗体に関する研究

新潟大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器内科学 青柳 豊

10. AIH 例の血清中可溶性 CTLA-4 値と臨床像の関連

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・肝臓内科 山本 和秀

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

自己免疫性肝炎分科会

分担研究報告書

診療指針の作成 WG

研究分担者 恩地 森一 愛媛大学大学院先端病態制御内科・教授

研究要旨：今回の全国調査では以前の調査と比較して、血清 IgG 値が顕著に低下していたため、ウイルス性慢性肝疾患を対象として AIH 診断における血清 IgG のカットオフ値を解析した。ROC 解析の結果から、血清 IgG のカットオフ値は慢性肝炎1961mg/dl、肝硬変2091mg/dl となり、AIH 診断には IgG 2g/dl は妥当と思われる。ただし、IgG 2g/dl 以下であっても AIH の診断は否定できないことを念頭においておく必要がある。

共同研究者

青柳 豊 新潟大学消化器内科
広石 和正 昭和大学消化器内科
吉澤 要 信州大学消化器内科
阿部 雅則 愛媛大学大学院地域医療学

A. 研究目的

自己免疫性肝炎分科会では、日本肝臓学会の理事、東西支部評議員が所属する施設（462施設）を対象に2006-2008年の新規 AIH 症例の全国アンケート調査を行った。今回集積した1056例を解析した結果、以前の調査と比較して、以下の特徴が明らかとなった。①診断時年齢の高齢化、②男性患者の比率が増加、③非黄疸例が増加（図1）、④抗核抗体陰性例・低力価例の増加（図2）、④血清 IgG 低値例の増加（表1、図3）、⑤組織学的に急性肝炎例の増加、⑥ UDCA 投与症例の増加（表2）。なお、臨床背景については昨年度の報告書に報告している。

なかでも、血清 IgG 値は前回調査に比し低下が顕著であったため、AIH 診断における IgG 値のカットオフ値を求めることを目的に検討を行った。

B. 研究方法

今回の全国集計で集計した AIH 症例のうち組織学的に慢性肝炎、肝硬変と診断された AIH739例（慢性肝炎687例、肝硬変52例）の診断時 IgG 値と AIH 分科会研究者が所属する施設のウイルス性（HBV、HCV）陽性慢性肝疾患1467例（慢性肝炎687例、肝硬変52例）の IgG 値を用いて ROC 解析を行った。

C. 研究結果

AIH 診断において、慢性肝炎例でのカットオフ値は1961mg/dl（感度63.8%、特異度77.9%）であった。

また、肝硬変例でのカットオフ値は2091mg/dl（感度87.1%、特異度57.1%）であった。

D. 考 察

今回の全国調査では、AIH 症例における血清 IgG 値の低下が顕著にみられた。この理由としては、1）国際診断基準の提唱により、AIH の非典型例が広く拾い上げられるようになったこと、2）急性肝炎症例

が増加したこと、3）IgG 測定法の標準化が行われ、多くの施設で基準値が変更になったこと、などが考えられた。

現在の本邦の自己免疫肝炎の診断指針には血清 IgG 値が2g/dl 以上が項目として挙げられており、その妥当性についてウイルス性慢性肝疾患を対象として検討を行った。今回の解析では、血清 IgG のカットオフ値は2g/dl が妥当であると考えられたが、IgG 値が2g/dl 以下の症例数は増加している。IgG 2g/dl 以下であっても AIH は否定できず、自己抗体測定と肝生検等により診断する必要があると考えられた。

E. 結 論

AIH 診断に血清 IgG 値は有用であるが、IgG 値が低値であっても AIH は否定できないことを念頭におく必要がある。

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

(n=1037)

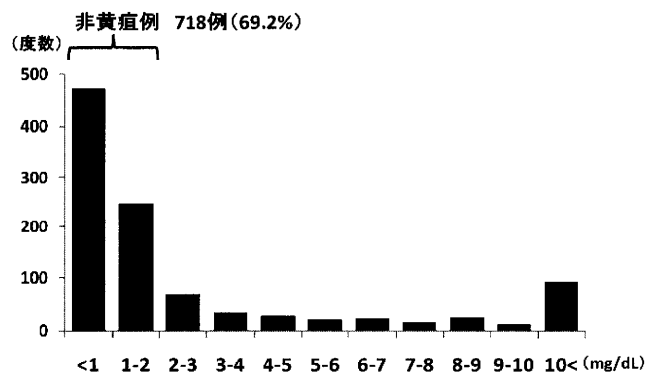


図1 血清総ビリルビン

表1 血液生化学データ

| | 今回 | 1997年 | 1992年 |
|-------|---------------------------|-----------|---------------|
| ALT | 368.0±432.5 (n=1046) | 301±378 | 332±343 |
| AST | 348.6±433.0 (n=1044) | 296±355 | 413±458 |
| T.Bil | 3.3±5.4 (n=1037) | 3.2±5.3 | 5.9±8.4 |
| IgG | 2393.8±1015.1 (n=1007) | 3242±1039 | 3451.4±1571.3 |

表2 治療の内訳 (995例)

| | |
|----------|--------------|
| PSL単独 | 300例 (30.2%) |
| UDCA単独 | 208例 (20.9%) |
| PSL+UDCA | 381例 (38.3%) |
| 無治療 | 38例 (3.8%) |
| その他 | 68例 (6.8%) |

(n=994)

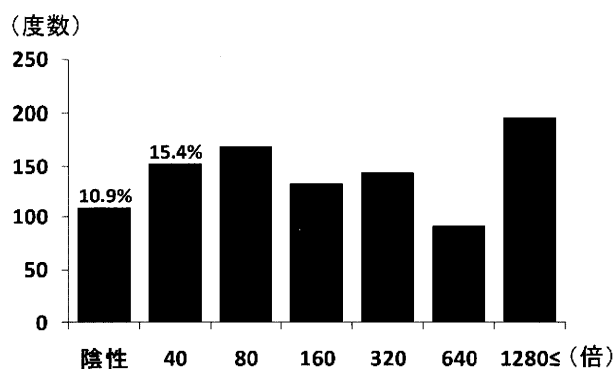


図2 抗核抗体の力価

(n=1008)

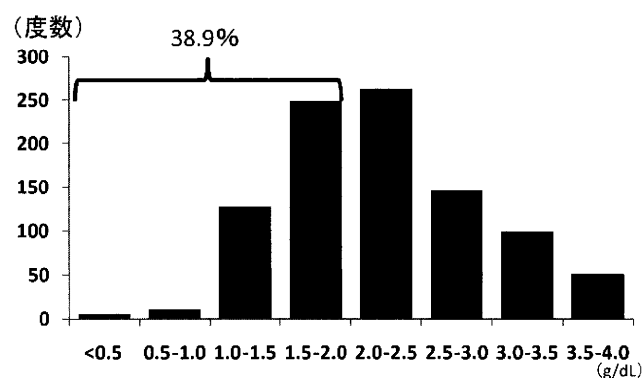


図3 血清IgG値

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

自己免疫性肝炎分科会

分担研究報告書

自己免疫性肝炎 診断指針の作成 WG

研究分担者 銭谷 幹男 東京慈恵会医科大学大学院 消化器内科 教授

研究要旨：日常診療での自己免疫性肝炎（AIH）診断に有用な指針の作成を目標に、AIH 診断に重要な位置を占める抗核抗体（ANA）の各種測定法の有用性について、AIH 症例の同一血清を用い、間接蛍光抗体法（IF）：培養ヒト HEp-2細胞（IF1）・凍結ラット肝組織（IF2）を用いたキット、ELISA 法：ANA 認識リコンビナント蛋白を固相化したキット（ELISA1）・リコンビナント蛋白に加え HEp-2核抽出抗原を固相化したキット（ELISA2）により測定し検討した。陽性率は IF1 94%、IF2 86%、ELISA1 57%、ELISA2 79% だった。ELISA1では IF1陽性例の39%、IF2陽性例の33%が陰性で、それらの78%、76%は IF80倍以下の低力価例だった。IF1と IF2の抗体価は有意の正の相関を示し（ $r=0.83$, $p<0.001$ ）、全例の85.6%は両測定法の誤差が2倍希釈以内だった。また IF1では IF2に比し陰性例が少なく低力価例が多かった。以上より、IF 法で陽性でも ELISA 法、特にリコンビナント蛋白のみを固相化したキットでは疑陰性となる例が多く、測定に際し注意を要することが明らかとなった。また HEp-2細胞、凍結ラット肝組織を用いた IF 法の両者で測定結果に大きな差異はなく、HEp-2細胞を用いた IF 法の有用性が示された。

共同研究者

日比 紀文 慶應義塾大学医学部 消化器内科
藤澤 知雄 済世会横浜市東部病院こどもセンター
松崎 靖司 東京医科大学霞ヶ浦病院 消化器内科
森實 敏夫 国際医療福祉大学 塩谷病院

研究協力者

高橋 宏樹 東京慈恵会医科大学 内科学講座
消化器・肝臓内科 講師

A. 研究目的

AIHの診断において抗核抗体（ANA）の測定は重要である。我が国ではANAの測定はヒト HEp-2細胞を用いた間接蛍光抗体法（IF）により行われてきたが、近年はELISA法により測定される頻度が増えてきている。またアメリカ肝臓学会が2010年に発表した診療ガイドラインでは、凍結ラット肝組織を用いたIFによるANA測定が推奨されている。

しかし、これら各種のANA測定法の有用性の差異は不明で、日常診療でいかなる測定法を用いるべきか明らかにされていない。そこで本研究では、AIHの同一血清を用いて種々のIF、ELISAキットを用いてANAを測定し、得られた結果を比較して、AIHの診断における各種ANA測定法の臨床的有用性について検討した。

B. 研究方法

臨床病理学的にAIHと診断された139症例（男性13例、女性126例）の保存血清を用いて検討した。

§ ANA測定に用いたキット

- 1) ヒト HEp-2細胞を用いた免疫蛍光染色（IF-1）（FLUORO HEPANA テスト：MBL社）
- 2) ラット肝組織用いた免疫蛍光染色（IF-2）（BIOCHIP Mosaics テスト：EUROIMMUNE社）
- 3) ANA対応リコンビナント抗原を固相化した

ELISA（ELISA-1）（MESACUP ANA テスト：MBL社）

固相化されているリコンビナントタンパク：
RNP（A, 70k）、SS-A（60k,52k）、SS-B, Sm, CENP-B, Scl-70, Jo-1, ds-DNA, ss-DNA

- 4) ANA対応リコンビナント抗原と HEp-2細胞の核抽出抗原を固相化した ELISA（ELISA-2）（QUANTA Lite ANA ELISA：INOVA社）
固相化されているリコンビナントタンパク：
RNP, SS-A, SS-B, Sm, Centromere, Scl-70, Jo-1, mitochondria（M-2）, ribosomal-P protein, PCNA, ds-DNA, histones

以上の各キットで得られた結果から、陽性率、測定法間での一致率、不一致例の臨床的特徴について検討した。

C. 研究結果

§ ANA陽性率

ANA陽性率は、IF-1で93.5%、IF-2で85.6%、ELISA-1で56.8%、ELISA-2で79.1%と、IFの方がELISAよりも高かった。ELISA間で比較すると、HEp-2核抽出抗原を固相化したELISA-2の方が陽性率は高かった。

§ IFとELISA間での一致率

IF-1とELISA-1の一致率は63.3%で、IF-1陽性・ELISA-1陰性例が36.7%存在した。

IF-1とELISA-2の一致率は78.4%で、IF-1陽性・ELISA-2陰性例が18%存在した。

IF-2とELISA-1の一致率は62.6%で、IF-2陽性・ELISA-1陰性例が33.1%存在した。

IF-2とELISA-2の一致率は82%で、IF-2陽性・ELISA-2陰性例が12.2%存在した。

一方、ELISA-1とELISA-2の一致率は72.0%で、ELISA-2陽性・ELISA-1陰性例が25.1%存在した。

§ IF 陽性・ELISA 陰性例の臨床的特徴

* IF 抗体価

IF-1陽性・ELISA-1陰性例は、ともに陽性例に比し IF 抗体価が80倍以下の症例が占める割合が有意に多かった (46.9 vs. 82.4%, $p<0.001$)。また IF-1陽性・ELISA-2陰性例も、ともに陽性例に比し IF 抗体価が80倍以下の症例が占める割合が有意に多かった (54.2 vs. 91.3%, $p<0.01$)。しかし IF 抗体価が160倍以上の高い症例でも ELISA で陰性となる症例は存在し、その傾向は ELISA-2に比し ELISA-1で著明だった。

IF-2陽性・ELISA-1陰性例でも、ともに陽性例に比し IF 抗体価が80倍以下の症例が占める割合が有意に多かった (47.8 vs. 86.1%, $p<0.01$)。一方 IF-2陽性・ELISA-2陰性例では、ともに陽性例に比し IF 抗体価が80倍以下の症例が占める割合が多かったが有意差は認めなかった (55.9 vs. 76.5%, ns)。IF-1と同様 IF-2でも、IF 抗体価が160倍以上の高い症例でも ELISA で陰性となる症例は存在し、その傾向は ELISA-2に比し ELISA-1で著明だった。

* IF 染色パターン

IF-1陽性・ELISA-1陰性例、両陽性例の IF 染色パターンはともに HS, S, NS パターンが優位で、IF-1陽性・ELISA-1陰性例に特異的に認められる染色パターンはなかった。全体では HS の53.8%, S の25.7%, NS の53.8%が ELISA-1で陰性であった。しかし、両陽性例でみられた CS, H, C パターンは IF-1陽性・ELISA-1陰性例ではみられなかった。

IF-1陽性・ELISA-2陰性例でも同様の傾向で、HS の27.7%, S の5.7%, NS の23.1%が ELISA-2で陰性だったが、CS, H, C パターンは IF-1陽性・ELISA-2陰性例ではみられなかった。

IF-2陽性・ELISA-1陰性例、両陽性例の IF 染色パターンはともに HS, S, NS パターンが優位で、IF-2陽性・ELISA-1陰性例に特異的に認められる染色パターンはなかった。全体では HS の42.3%, S の40.0%, NS の58.3%が ELISA-1で陰性であった。しかし、両陽性例でみられた CS, C パターンは IF-1陽性・ELISA-1陰性例ではみられなかった。

IF-2陽性・ELISA-2陰性例でも同様の傾向で、HS の19.2%, S の15.4%, NS の16.7%が ELISA-2で陰性だったが、CS, C, N パターンは IF-2陽性・ELISA-2陰性例ではみられなかった。

§ HEp-2 (IF-1), ラット肝組織 (IF-2) を用いた IF の比較

* 染色パターン

両者の染色パターンの分布に特徴的な偏りはなかったが、IF-2で Sp の症例の45%は IF-1では Sp,H パターンであった。

* 抗体価

両者の抗体価は有意の正の相関を示した ($r=0.83$, $p<0.001$)。全症例の43.9%は IF-1と IF-2の抗体価が同一、41.7%は2倍希釈以内の差異で、4倍希釈以上の差異がみられたのは14.4%のみであった。

IF-1と IF-2の抗体価の分布を比較すると、160倍以

上の高力価例が占める割合はそれぞれ36.7, 35.2%, 80倍以下の低力価例が占める割合はそれぞれ56.8%, 50.1%とほぼ等しかったが、陰性例が占める割合は IF-1は6.5%, IF-2は14.4%で、IF-2に比し IF-1では陰性例が少なく低力価例が多かった。

また、IF-1の抗体価が IF-2より高くなる症例は全症例の32.4%で、そのうちの86.7%は80倍以下の低力価例だった。一方、IF-2の抗体価が IF-1より高くなる症例は全症例の23.7%で、そのうちの72.7%は160倍以上の高力価例だった。

D. 考 察

ANA の判定結果は AIH の診断に大きな影響を及ぼすため、その測定は非常に重要である。従来から行われてきた HEp-2細胞を用いた免疫蛍光染色法に加え、最近では ELISA 法による測定が日常臨床の場で行われるようになってきたが、AIH の診断において ELISA による ANA 測定の有用性は明らかでなかった。

今回の検討により、IF 法で陽性となる症例の多くが ELISA 法では陰性となり、特に ANA のリコンビナント対応抗原のみを固相化した ELISA キットではその傾向が顕著であることが明らかとなった。そのような IF 法では陽性、ELISA 法では陰性となる症例は、IF 法の抗体価が80倍以下の低力価例が多いが、本研究班で新たに行われた全国調査では ANA 低力価例が増加傾向にあることが報告されている。そうした状況も考慮すると、AIH の診断における ELISA 法による ANA 測定は慎重に行われるべきと考えられた。

また、アメリカ肝臓学会が2010年に発表した診療ガイドラインでは、ラット肝組織を用いた免疫蛍光染色法を用いた ANA 測定が推奨されているが、実際の臨床の場ではヒト HEp-2細胞を用いた免疫蛍光染色法により ANA の測定がなされているのが実情である。今回の検討によりラット肝組織を用いた IF とヒト HEp-2細胞を用いた IF の結果はほとんど変わらないことが判明し、ヒト HEp-2細胞を用いた IF 法がスタンダードな ANA 測定法として用い得ることが明らかとなった。

E. 結 論

- 1) 自己免疫性肝炎における ANA 測定では、IF 法の方が ELISA 法より感度が高く、特にリコンビナント抗原のみを固相化した ELISA では疑陰性となる症例が多いため、注意を要すると考えられた。
- 2) HEp-2を用いた IF 法の結果はラット肝組織を用いた IF 法の結果とほぼ同様で、両測定法間で大きな差異はみられず、ヒト HEp-2細胞を用いた IF 法がスタンダードな ANA 測定法として用い得ると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第18回日本消化器関連学会週間 シンポジウム5：
自己免疫性肝胆道疾患：最近のトピックスにて発表
自己免疫性肝炎の診断におけるスコアリング，抗核抗体測定に関する検討：高橋宏樹，小池和彦，銭谷幹男
(2010年10月)

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）

自己免疫性肝炎分科会

分担研究報告書

治療 WG

研究協力者 山本 和秀 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・肝臓内科学 教授

研究要旨：自己免疫性肝炎における治療ガイドラインの作成を目的に検討を行った。対象は、2009年度に施行した全国調査により集積された自己免疫性肝炎症例のうち「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班の班員が所属する施設で経験した症例とした。また、劇症肝炎分科会において2004年から2007年に集積された劇症肝炎症例と LOHF 症例のうち成因が自己免疫性肝炎（疑い含）と診断された症例、及び岡山大学と福島県立医科大学、虎の門病院において診断・治療された自己免疫性肝炎症例についての検討も行った。UDCA 単剤治療が行われた症例は全体の13.8%であり、主にトランスアミナーゼが低値の軽症例であった。また、UDCA 併用 PSL 治療群では PSL 単剤治療群に比べて PSL 維持量が少なく、より高い確率で PSL を中止できる可能性が示唆された。AZP の使用頻度は全体の9.2%と低く、再燃例を中心に使用されていた。再燃例に対して AZP を併用することで、以後の再燃を抑制できる可能性が示唆された。重症化例では、診断時プロトロンビン活性が予後予測因子として有用な可能性が示唆された。内科的治療による救命率は、診断時のプロトロンビン活性が60%を超える症例で99%、60%以下かつ40%を超える症例で85%、40%以下で40%であった。診断時のプロトロンビン活性が40%以下の症例では、肝移植を視野に入れた対応が必要と思われる。また、ステロイドパルス療法については、施行群と非施行群との間で予後に差を認めず、施行群38例中10%が感染症により死亡していた。ステロイドパルス療法施行時には感染症（特に、真菌感染）に十分な注意が必要である。劇症化例における内科的治療による救命率は23%であり、多変量ロジスティック回帰分析では診断時の肝萎縮、血小板数、プロトロンビン活性が予後因子として抽出された。新しい肝移植適応ガイドラインによる予後予測は、感度92%、特異度57%、正診率84%と良好であった。

治療ワーキンググループ

山本 和秀 岡山大学消化器内科
大平 弘正 福島県立医科大学内科学第二講座
鈴木 義之 虎の門病院肝臓内科

A. 研究目的

自己免疫性肝炎の治療における第一選択薬はコルチコステロイド（CS）であり、治療反応性は概ね良好である。一方、CS 治療に抵抗する難治例や再燃例では、アザチオプリン（AZP）やウルソデオキシコール酸（UDCA）の併用が行われているが、AZP や UDCA による治療適応については十分な検討がなされていない。更に、近年では、急性肝炎様に発症する症例や劇症肝炎例など非典型例の報告が増加しているが、これらの症例に対する治療指針は未だ確立されていない。そこで、現在のわが国における自己免疫性肝炎治療の現状を把握し、新しい治療ガイドラインを作成することを目的に検討を行った。

B. 研究方法

2009年度に施行した全国調査により集積された自己免疫性肝炎症例のうち「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班の班員が所属する施設で経験した症例を対象に調査票による症例登録を各施設に依頼した。また、劇症肝炎分科会において2004年から2007年に集積された劇症肝炎症例と LOHF 症例のうち成因が自己免疫性肝炎（疑い含）と診断された症例、及び岡山大学と福島県立医科大学、虎の門病院の3施設におい

て自己免疫性肝炎と診断され治療された症例についての検討も行った。

検討項目は、i) UDCA の適応、ii) AZP の適応、iii) 重症化・劇症化例に対する治療法の確立、の3項目とした。なお、重症例の定義は、診断時に血清中トランスアミナーゼが正常値上限の10倍以上への上昇または血清中ビリルビンが5.0mg/dl を超える上昇を示した症例とした。

C. 研究結果

i) UDCA の適応

班内調査対象のうち、UDCA 単剤治療は13.8%、プレドニゾロン（PSL）単剤治療は32.2%、PSL と UDCA 併用療法は49.7%で行われていた。UDCA 単剤投与群では、PSL 投与を行われた症例に比べてトランスアミナーゼが低値であったが、両群間で年齢や性別、IgG 値、抗核抗体価、診断時における肝硬変の頻度に差を認めなかった。また、併用療法群では PSL 単剤投与群に比べて、PSL 維持量が20mg/日を超える症例の割合が低く（2.1% vs 5.6%）、PSL 投与を中止された症例の割合が多かった（5.7% vs 1.4%）。

一方、新規の AIH 症例を3年間追跡調査した結果では、PSL 単剤投与群と併用療法群の間で治療期間中の PSL 総投与量に差を認めなかったが、治療開始から PSL 1日投与量10mg になるまでの期間は併用療法群で明らかに長期間であった。

ii) AZP の適応

班内調査対象のうち、9.2%で AZP の投与が行われ

ていた。AZPを投与された症例では、非投与例に比べ診断時の血清中ビリルビン、トランスアミナーゼ、IgG値が有意に高値であった。また、AZP投与例のうち38.7%が再燃例であり、AZPは再燃例を中心に使用されていた。また、3施設で再燃例におけるAZPの有効性を検討したところ、AZP投与例では非投与例に比較し以後の寛解維持率が高頻度であった(61% vs. 46%)。

iii) 重症化・劇症化例に対する治療法の確立

重症化例107例と劇症化例31例について検討した。

重症化例では、多変量ロジスティック回帰分析により診断時におけるプロトロンビン活性 {per 1% : odds ratio 1.11 (1.02-1.21)} が予後因子として抽出された。診断時プロトロンビン活性による予後予測の有効性をROC曲線により解析したところ、AUC=0.917と良好な結果であった。内科的治療による救命率は、診断時のプロトロンビン活性が60%を超える症例で99%、60%以下かつ40%を超える症例で85%、40%以下で40%であった。ステロイドパルス療法については、施行群と非施行群の間で予後に差を認めず、施行群38例中10%が感染症(特に、真菌感染)により死亡していた。また、初期治療としてのPSL開始量については、診断時のプロトロンビン活性が40%以下の症例のうちPSL開始量が0.8 mg/kg/day未満の5例中4例(80%)が死亡していた。

劇症化例における内科的治療による救命率は23%であり、多変量ロジスティック回帰分析では診断時の肝萎縮、血小板数、プロトロンビン活性が予後因子として抽出された。新しい肝移植適応ガイドラインによる予後予測では、感度92%、特異度57%、正診率84%であった。また、ステロイドパルス療法や血漿交換、血液濾過透析による予後改善効果は認められなかった。

D. 考 察

UDCAの適応

UDCA単剤治療は、トランスアミナーゼが比較的 low 値の軽症例で主に行われていた。また、PSL治療にUDCAを併用することにより、PSL維持量を減量できる可能性が推測された。今後は、UDCA単剤治療が長期予後に及ぼす影響やPSL治療にUDCAを併用することでPSLの減量や中止がどの程度可能になるのかを明らかにするために調査対象を増加させることが必要と思われた。

AZPの適応

本邦では、AIHにおけるAZP使用頻度が9.2%と低く、主に再燃例で使用されていることが明らかになった。また、再燃例においてAZPを使用することで、その後の再燃を抑制できる可能性も示唆された。しかし、本邦では、自己免疫性肝炎に対してAZPの使用が保険適用外である。再燃を繰り返すことにより自己免疫性肝炎例の予後が悪化するとの報告もあることから、今後は保険適応に向けての検討が必要と思われる。

重症化・劇症化例に対する治療法の確立

重症化例においては、診断時のプロトロンビン活性単独でも予後因子として有用な可能性が示唆された。診断時のプロトロンビン活性が60%を超える症例ではCS治療により予後良好と考えられる。診断時のプロトロンビン活性が40~60%の症例ではCS治療による救命率85%であり、CS治療への反応性が乏しい場合には肝移植の考慮が必要と思われる。診断時のプロトロンビン活性が40%以下の症例では内科的治療による救命率40%であり、内科的治療と並行して治療開始時より肝移植の考慮が必要と思われる。また、ステロイドパルス療法を施行する際には感染症(特に真菌感染)の合併に十分な注意が必要である。劇症化例については、内科的治療による救命率が23%と予後不良であり、肝移植の適応判断が重要と思われる。今回の検討では、新しい肝移植適応ガイドラインによる正診率が84%と良好であり、このガイドラインに基づく予後予測の有用性が示された。今後は、ステロイドパルス療法の有効性と問題点を明らかにするために、より多くの症例での検討が必要と思われた。

E. 結 論

本研究結果も踏まえて、本邦における自己免疫性肝炎の治療指針の作成を行う予定である。

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

- 1) 三宅康広, 山本和秀: 重症型及び劇症型自己免疫性肝炎に対する治療戦略. 第14回 日本肝臓学会大会, 横浜, 2010
- 2) 横川順子, 菅野有紀子, 物江恭子, 斉藤広信, 阿部和道, 高橋敦史, 大平弘正: 自己免疫性肝炎再燃を予測するリスクファクターの解明. 第14回 日本肝臓学会大会, 横浜, 2010
- 3) 鈴木義之, 小林万利子, 熊田博光: 自己免疫性肝炎非定型例の診断と治療. 第14回 日本肝臓学会大会, 横浜, 2010

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 BAFF とインスリン抵抗性

研究分担者 恩地 森一 愛媛大学大学院先端病態制御内科・教授

研究要旨：1) 自己免疫性肝炎（AIH）患者では血中 B 細胞活性化因子（BAFF）濃度が高値であった。2) AIH では約 4 割の症例にインスリン抵抗性を有していた。3) マウスに BAFF を投与するとインスリン抵抗性が誘導された。以上の結果から、AIH で血中に増加する BAFF は自己免疫現象以外に代謝異常（インスリン抵抗性の誘導）にも関与していることが示唆された。

共同研究者

阿部 雅則 愛媛大学大学院地域医療学・准教授

A. 研究目的

B 細胞活性化因子（BAFF）は、樹状細胞・マクロファージなどの抗原提示細胞から分泌されるサイトカインであり、B 細胞の分化・生存などに関与している。全身エリトマトーデス、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患では血清 BAFF 濃度が増加し、治療のターゲットともなっている。我々は、自己免疫性肝炎（AIH）における BAFF の役割を解析している中で、インスリン抵抗性への関与を示唆する所見が得られたので、今回 BAFF の糖代謝に対する役割を解析した。

B. 研究方法

- 1) 当科の AIH 患者の血清 BAFF 濃度を測定した。また、AIH 患者での空腹時インスリン値、HOMA-IR 値を解析した。
- 2) C57BL/6 マウスにリコンビナント BAFF を 5 日間投与し、その後糖負荷試験（intraperitoneal glucose tolerance test: IPGTT）を行った。

C. 研究結果

- 1) AIH 患者では健常者に比べて、血清 BAFF 濃度が有意に高かった（ $P < 0.01$ ）。
- 2) AIH 患者の約 4 割でインスリン抵抗性（空腹時インスリン 10mU/ml 以上、HOMA-IR 2.5 以上）がみられた。
- 3) マウスに BAFF を投与すると、HOMA-IR が増加し、糖負荷試験による血糖とインスリンの AUC が増加した。

D. 考察

自己免疫疾患において増加する BAFF は、自己反応性 B 細胞の生存・増殖などにより自己免疫現象の誘導と疾患の発症・進展に役割を果たしていると考えられている。我々も AIH の免疫病態の形成に BAFF が重要な役割を果たしているのではないかと研究をすすめている。

一方で、当科症例での解析と海外からの報告から AIH ではインスリン抵抗性を高率に合併していることが分かった。実際にインスリン抵抗性を高率に合併

する肥満患者の血清 BAFF 濃度を測定してみたところ、非肥満者と比べて高値であった。また、当科で 2008 年に行った肝硬変の成因別実態の全国調査において NASH では抗核抗体の陽性率が高く、肥満・インスリン抵抗性と B 細胞活性化の関連が示唆された。

以上から、BAFF が代謝異常、とくにインスリン抵抗性の誘導にも関与しているのではないかと考え、マウスでの基礎実験を行った。BAFF の投与によりインスリン抵抗性が誘導されることが明らかとなった。今後はステロイド治療に伴う糖代謝異常などとの関連も解析していきたい。

E. 結論

AIH で血中に増加する BAFF は、自己免疫現象の誘導に代謝異常（インスリン抵抗性の誘導）にも関与している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
阿部雅則，恩地森一：原発性胆汁性肝硬変－自己免疫性肝炎オーバーラップ症候群 日本臨床別冊 肝・胆道系症候群 肝臓編（上）244-247, 2010.
2. 学会発表
阿部雅則，真柴寿枝，恩地森一：本邦の自己免疫性肝炎の実態と病像 第14回日本肝臓学会大会 シンポジウム 横浜，2010.

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

自己免疫性肝炎患者における末梢リンパ球抑制性マーカーの検討

研究分担者 広石 和正 昭和大学医学部消化器内科 准教授

研究要旨：自己免疫性肝炎患者において、末梢血リンパ球の抑制性マーカーである CTLA-4, DR-5, Fas, PD-1分子の発現と患者の臨床経過との関連を検討した。自己免疫性肝炎患者、原発性胆汁性肝硬変患者、健常者の末梢血より CD4陽性、CD8陽性細胞を auto MACS でそれぞれ分離し、細胞表面の CTLA-4, DR-5, Fas, PD-1分子の発現を観察した。健常者と比較し自己免疫性肝炎患者で CTLA-4, DR-5, PD-1分子の発現が増強しており、中でも特に著明に増強している症例が認められた。臨床経過の検討を行うと、これらの増強症例は比較的経過の安定している症例であった。以上より抑制性マーカーが自己免疫性肝炎の炎症軽減に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

自己免疫性肝疾患において患者リンパ球の活性が増強していることが多く報告されている。一方で患者リンパ球の抑制性マーカーの増減についての報告は少ない。本研究は、末梢血リンパ球の抑制性マーカーである CTLA-4, DR-5, Fas, PD-1分子の発現と患者の臨床経過との関連を検討し、自己免疫性肝炎の病態との関連を検討することを目的に行った。

B. 研究方法

末梢血（自己免疫性肝炎（AIH）7例、原発性胆汁性肝硬変（PBC）3例、健常コントロール（Control）10例）より CD4陽性、CD8陽性細胞を auto MACS でそれぞれ分離し、フローサイトメトリーを用い細胞表面の CTLA-4, DR-5, Fas, PD-1分子の発現を観察した。そして、発現と臨床経過との関連を検討した。（倫理面への配慮）

昭和大学倫理委員会に研究実施申請書を提出し、倫理規定と照合された結果、研究実施の承認を得た。肝癌患者に研究内容を説明し、研究への参加同意書を書面で取得した。

C. 研究結果

- ・ AIH では Control や PBC 患者と比較し CTLA-4, DR-5, PD-1分子の発現が増強していた。
- ・ 特に AIH 7例中3例で著明な発現の増強が認められた。
- ・ 特に発現が増強していた3症例の臨床データ、経過、治療内容等につき検討したところ、3例とも比較的安定した症例であった。

D. 考察

研究開始前には AIH における抑制性マーカーの発現低下を推察したが、実際には増強しているという結果が得られた。特に増強していた症例の臨床経過は比較的安定しており、症例数が少ないため今後追加検討を要するが、抑制性マーカーが AIH の炎症軽減に関与している可能性もあると考えられた。

E. 結論

- ・ AIH では抑制性マーカーの発現が増強していた。
- ・ 特に増強していた症例の臨床経過は比較的安定しており、抑制性マーカーが AIH の炎症軽減に関与している可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, Shimazaki T, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Uozumi S, Omori R, Matsumura T, Yanagawa T, Ito T, Imawari M. Strong CD8+ T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*, 2010; 45 (4): 451-458.
- 2) Hiroishi K, Eguchi J, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Omori R, Imawari M. Immune response of cytotoxic T lymphocytes and possibility of vaccine development for hepatitis C virus infection. *J Biomed Biotech*. 2010;263810.
- 3) Shimozuma Y, Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M, Miyashita M, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K, Imawari M. Reactivation of Epstein-Barr virus in B cells of patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*, 2010; 82 (12): 2064-2072.
- 4) Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, Doi H, Omori R, Imawari M. Cyclooxygenase-2 gene promoter haplotypes affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression. *Hepatol Res*, 2010;40(12):1219-26.

2. 学会発表

- 1) 大森里紗, 江口潤一, 石井成明, 平出綾子, 坂本理, 土肥弘義, 広石和正, 井廻道夫. 肝癌における HLA 拘束性 Glypican-3 エピトープの同定. 第96回日本消化器病学会総会. 新潟. 2010.
- 2) 打越学, 伊藤敬義, 井口桃子, 下間祐, 宮下みゆき, 広石和正, 井廻道夫. C型慢性肝炎患者に

における B 細胞異常関連マーカーと抗ウイルス療法反応性との関連. 第46回日本肝臓学会総会. 山形. 2010.

- 3) 下間祐, 伊藤敬義, 井口桃子, 打越学, 宮下みゆき, 広石和正, 井廻道夫. HCV 感染が惹起する B 細胞における EBV 再活性化. 第46回日本肝臓学会総会. 山形. 2010.
- 4) 坂木理, 牧野鈴子, 広石和正, 江口潤一, 石井成明, 平出綾子, 大森里紗, 上田久美子, 井廻道夫. 自己免疫性肝疾患における病態と COX-2 及び osteopontin 遺伝子プロモーター領域多型との関連性の解析. 第46回日本肝臓学会総会. 山形. 2010.
- 5) 江口潤一, 広石和正, 土肥弘義, 石井成明, 平出綾子, 坂木理, 大森里紗, 馬場俊之, 松村卓哉, 魚住祥二郎, 井廻道夫. 消化器癌における IL-4 と CpG 併用による抗腫瘍効果と作用機序の検討. 第52回日本消化器病学会大会. 横浜. 2010.
- 6) 広石和正, 江口潤一, 井廻道夫. 肝細胞癌患者における癌抗原特異的細胞性免疫応答. 第14回日本肝臓学会大会. 横浜. 2010.
- 7) Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M, Shimosuma Y, Miyashita M, Hiroishi K, Imawari M. B cell-infected or -associated hepatitis C virus has interferon-resistant phenotype. The Liver Meeting 2010, The 61st Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases. Boston. 2010.
- 8) 石井成明, 広石和正, 井廻道夫. HCV 感染における特異的 T 細胞免疫応答の検討. 第38回日本肝臓学会東部会. 東京. 2010.

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

自己免疫性肝炎の病態とサイトカインネットワークの解析

研究協力者 吉澤 要 信州大学医学部附属病院消化器内科特任教授
国立病院機構長野病院地域医療教育センター準備部長

研究要旨：自己免疫性肝炎（AIH）の病態には免疫異常が深く関与し、多くのサイトカインが動員され相互に影響を及ぼしながら作用している（サイトカインネットワーク）。AIH 治療前および治療後寛解期におけるサイトカインを包括的に解析し、病態との相関について検討した。AIHにおける肝障害では、Th17細胞の活性化、炎症性ケモカインの増加、制御性 T 細胞の抑制を中心とした、サイトカイン・ケモカインのネットワークが重要な役割を演じていることが示唆された。

共同研究者

梅村 武司 信州大学医学部 消化器内科講師
城下 智 信州大学医学部 消化器内科医員
上條 敦 信州大学医学部 消化器内科大学院

A. 研究目的

自己免疫性肝炎（AIH）の発症・病態にサイトカインの関与が示唆されているが、今までは特定の数種類のサイトカイン測定による検討に限られていた。本研究では、AIH 治療前および治療後寛解期におけるサイトカインを包括的に測定し、サイトカイン・ケモカインの動向（サイトカインネットワーク）と AIH の病態との関係を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ステロイド単独治療で完全寛解に至った AIH40例を対象とし、正常人血清をコントロールとした。AIH 治療前および寛解期の保存血清を用いて Luminex サイトカインアッセイシステムにより29種類のサイトカイン・ケモカインを同時に測定し解析した。さらに、臨床データを用いた AIH の病態（AST, ALT, T-Bil, IgG）との関連を検討した。

C. 研究結果

AIH 治療前と比較して寛解期に有意に低下したサイトカイン・ケモカインは IL-12 p40, IL-17F, IL-18, IL-23, IP-10, MIP-1a, MIP-1b の 7 種類であった。残り21種類のサイトカインは測定感度以下あるいは治療前と寛解期に有意差を認めなかった。また、IP-10 は AST, ALT と、MIP-1a は AST との相関が認められた。

D. 考察

AIH の肝障害において IL-17F, IL-23 など Th17 系のサイトカイン、IL-12 p40 による制御性 T 細胞の抑制および IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β の炎症性ケモカインが重要な役割を演じている可能性が示唆された。炎症性ケモカインは肝細胞障害と関連している可能性がある。TNF- α , IFN- γ など主要な Th1 サイトカインは測定感度以下のものが多かったが、発症早期には

上昇している可能性は否定できない。また、感度以下でも生体系においては機能している可能性は考えられる。

E. 結論

AIH における肝障害では、Th17細胞の活性化、炎症性ケモカインの増加、制御性 T 細胞の抑制を中心とした、サイトカイン・ケモカインのネットワークが重要な役割を演じていることが示唆された。それぞれのサイトカインには多様な作用があり、また、相互作用（ネットワーク）も複雑であるが、包括的なサイトカインの啓示的な変化を、治療による変動も含めて検討することにより、AIH の病態が明らかになると思われる。

すでに、自己免疫疾患に対する抗 IL-17抗体や抗 IL-12/23抗体の臨床試験が行われており、重症・劇症型 AIH 治療への応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshizawa K, Umemura T, Ota M. Genetic background of autoimmune hepatitis in Japan. *J Gastroenterol.* 2011;46 Suppl 1:42-7.
- 2) Umemura T, Zen Y, Hamano H, Joshita S, Ichijo T, Yoshizawa K, et al. Clinical significance of immunoglobulin G4-associated autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol.* 2011;46 Suppl 1:48-55.
- 3) Joshita S, Umemura T, Yoshizawa K, et al. Association analysis of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms with primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *J Hepatol.* 2010;53:537-41.
- 4) Joshita S, Umemura T, Yoshizawa K et al. A2BP1 as a novel susceptible gene for primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *Human Immunol* 2010; 71: 520 -524.
- 5) Kamijo A, Yoshizawa K, Joshita S, et al.

Cytokine profiles affecting the pathogenesis of autoimmune hepatitis in Japanese patients. Hepatol Res 2011 in press

2. 学会発表

- 1) Joshita S, Umemura T, Yoshizawa K et al. Association analysis of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms with primary biliary cirrhosis in Japanese patients. EASL 2010 ウイーン
- 2) 城下 智, 梅村武司, 吉澤 要 他 ataxin2-binding protein 1遺伝子多型は原発性胆汁性肝硬変の疾患感受性と相関する ワークショップ「自己免疫性肝疾患研究の進歩」第46回肝臓学会総会 山形
- 3) 吉澤 要, 松本晶博, 一條哲也 他 自己免疫性肝炎の長期予後に及ぼす因子 第46回肝臓学会総会 山形
- 4) 城下 智, 梅村武司, 吉澤 要 Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4遺伝子多型と日本人の原発性胆汁性肝硬変発症に関する検討 ワークショップ「肝疾患における免疫病態解析と新たな治療戦略」第14回肝臓学会大会 横浜
- 5) 上條 敦, 吉澤 要, 城下 智 他 自己免疫性肝炎におけるサイトカインの動向と病態との関連 第38回肝臓学会東部会 東京
- 6) 梅村武司, 一條哲也, 吉澤 要 自己免疫性肝炎からの肝発癌の実態 パネルディスカッション「非ウイルス性肝細胞癌の実態」第38回肝臓学会東部会 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

自己免疫性肝炎モデルにおける肝内 NKT 細胞の動態解析

研究分担者 銭谷 幹男 東京慈恵会医科大学大学院 消化器内科 教授

研究要旨：樹状細胞と高分化型肝癌細胞の融合細胞と IL-12投与により作製した自己免疫性肝炎（AIH）モデルの肝内 NKT 細胞動態を解析した。本モデルでは炎症期に肝内 NKT 細胞の増加を認め、増加した NKT 細胞は活性化しており、IFN γ 産生を認めた。NKT 細胞が存在しない CD1dKO マウスを用いて本モデルを作製すると、肝炎の誘導は軽微で肝内炎症性細胞浸潤もわずかであった。また、誘導細胞投与後に α GarCer を投与して NKT 細胞を活性化させると肝炎は増悪したが、その際に肝内ではエフェクターメモリー型 CD8細胞が増加し、肝内 CD8細胞は自己肝細胞に対する傷害性を有していた。以上より NKT 細胞は本モデルにおける肝細胞傷害性 CD8細胞の活性化に関わり、そうした機序により病態形成に関与すると考えられた。

共同研究者

高橋 宏樹 東京慈恵会医科大学 内科学講座
消化器・肝臓内科 講師
中野 真範 東京慈恵会医科大学 内科学講座
消化器・肝臓内科 大学院生
佐伯 千里 東京慈恵会医科大学 内科学講座
消化器・肝臓内科 助教

A. 研究目的

自己免疫性肝炎（AIH）の発症進展機序は明らかにされていない。本研究では、AIH の発症進展に関わる発症初期における免疫動態、特に NKT 細胞の関与を明らかにする目的で、新たに作製した動物モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

すでに報告したように、C57BL/6マウスに樹状細胞と高分化型肝癌細胞（Hepal-6）の融合細胞（FC）を投与し、その後 IL-12を投与すると、肝細胞特異的 T 細胞活性化をとまなう肝炎が誘導される。このモデルでは、肝細胞特異的 CTL による肝細胞障害がおこるが、FC 投与のみでは肝細胞障害はおこらず、IL-12投与により各種接着分子の発現、ケモカイン・ケモカイン受容体などの発現増強による肝内免疫環境変化が肝炎発症に必須である。また、このモデルでは肝炎は day 21に極期となるが（肝炎期）、自然経過で day 23には改善する（改善期）（Clinical Immunology 117:280–293, 2005）。

昨年度から同モデルにおける NKT 細胞の動態と病態形成への関与について研究を行い、肝炎期には肝内 NKT 細胞数が増加するが、脾臓の NKT 細胞数は減少すること、増加した肝内 NKT 細胞は活性化マーカーの CD69を高発現し、IFN γ を産生すること、肝内のクッパー細胞、樹状細胞における CD1d 発現は、肝炎期に増加していること、FC 投与後に IL-12の代わりに α GarCer を単回投与すると、IL-12投与時と同様の肝細胞障害の増悪、肝内リンパ球浸潤の増加を認めることを報告した。

今年度は、まず炎症期に脾臓内 NKT 細胞が減少し

肝内 NKT 細胞が増加する機序に関して、NKT 細胞のリクルートに関与するケモカインである CXCL16遺伝子の肝内発現動態と、そのレセプターである CXCR6の肝内 NKT 細胞における発現を検討した。

ついで同モデルの病態形成への NKT 細胞関与の有無を明らかにする目的で、NKT 細胞が存在しない CD1dKO マウスを用いた検討を行った。

さらに、NKT 細胞の病態形成への関与の詳細を明らかにする目的で、FC 投与後に α GarCer を投与し NKT 細胞を活性化させた際の肝内 CD8細胞の動態について検討した。

C. 研究結果

(i) 肝内における CXCL16遺伝子発現は、コントロール、改善期に比し肝炎期に有意に増加していた。また、肝内 NKT 細胞の CXCR6発現を FACS で検討すると、発現頻度、発現密度ともにコントロールに比し肝炎期で有意に増加していた。

(ii) CD1dKO マウスに FC と IL-12を投与すると、血中 ALT 値はコントロールに比し有意に増加したものの、ワイルドタイプマウスに FC と IL-12を投与した際と比較すると有意に減少していた。また組織学的検討では、KO マウスの肝炎の程度はワイルドタイプマウスに比し軽度で、肝内浸潤炎症性細胞数、肝内のリンパ球クラスター形成数は、ワイルドタイプマウスに比し KO マウスで有意に減少していた。

(iii) FC 投与後に α GarCer を投与すると、コントロール、 α GarCer 単独投与に比し、肝内に浸潤している CD62L 陰性 CD8細胞（エフェクターメモリー型）が増加していた。また、肝内 CD8細胞の肝細胞に対する細胞傷害性を AST 遊離アッセイで検討したところ、FC 投与後に α GarCer を投与した群の肝内 CD8細胞の細胞傷害性は、コントロール、 α GarCer 単独投与群に比し高かった。

D. 考察

AIH の発症進展には、多くの種類の免疫担当細胞が複合的に関与すると考えられる。

これまでに、本モデルでは自己肝細胞障害性 CD8 の活性化により肝細胞障害が惹起されるが、自己免疫応答の誘導にともない肝内で制御性 T 細胞が増加して肝炎が沈静化することを明らかにし報告してきた。

今回、マウス肝内に豊富に存在する NKT 細胞に着目し、その動態解析を行ったところ、活性化し IFN γ を産生する NKT 細胞が肝炎期に肝内で増加していることが明らかにされた。また、NKT 細胞活性化に関わるとされる CD1d 分子の肝内抗原提示細胞上の発現が炎症期に増強していたことから肝炎期では肝内 NKT 細胞がなんらかの機序で増量・活性化され、肝炎病態形成に関わる可能性が示された。さらに、肝炎期には脾臓内の NKT 細胞数は減少しているが、今年度の研究により肝内には NKT 細胞のリクルートに関わるケモカインの CXCL16 遺伝子発現量が増加し、肝内 NKT 細胞はその受容体である CXCR6 発現が増加していることが明らかになり、肝内で増加する NKT 細胞は炎症にともない肝臓に集積してくる可能性も示された。

これらの検討から、本モデルにおける肝炎の誘導に NKT 細胞が関与する可能性が考えられたが、肝内に NKT 細胞が存在しない CD1dKO マウスを用いた検討により、KO マウスでは肝炎誘導の程度は減弱していること、肝内炎症性細胞浸潤も軽減していることが明らかにされ、NKT 細胞がなんらかの機序により病態形成に関わっていることが示された。

ついで、この NKT 細胞の関与の詳細について検討したところ、FC 投与後に IL-12 の代わりに NKT 細胞活性化作用を有する α GalCer を投与したところ、肝炎の程度、肝内炎症性細胞浸潤数は α GalCer 単独投与群と比較して有意に増加していることが明らかになり、特にエフェクターメモリー型の CD8 細胞の肝内浸潤が増強していることが示された。またこの際には、肝内 CD8 細胞の自己肝細胞傷害性も有意に増強しており、これらの結果から NKT 細胞は自己反応性エフェクターメモリー型 CD8 細胞の肝内浸潤誘導、活性化を介して、本モデルの肝細胞障害に関わる可能性が示された。

E. 結 論

FC 投与により自己反応性 CD8 細胞が活性化され肝炎が誘導される AIH モデルにおいて、肝内 NKT 細胞が肝炎期に活性化され、自己反応性エフェクターメモリー型 CD8 細胞の肝内浸潤誘導、活性化を介して病態形成に関わるということが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

C Saeki, M Nakano, H Takahashi, S Saito, S Homma, H Tajiri, M Zeniya. Accumulation of functional regulatory T cells in actively inflamed

liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. Clin Immunol 135:156-166.2010

2. 学会発表

第46回日本肝臓学会総会：発表（2010年5月）

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エストロゲンレセプターの解析

研究協力者 大平 弘正 福島県立医科大学消化器・リウマチ膠原病内科 教授

研究要旨：自己免疫性肝炎（AIH）は男性と比べ女性に7倍前後の頻度で多く発症する。全身性エリテマトーデスや原発性胆汁性肝硬変症では、エストロゲンレセプター（ER）の発現と病態への関与が示唆されているがAIH病態との関連は不明である。今回、AIHと健常人でERの発現量を評価したところ、AIH患者で健常人に比しER α の発現量が低下していた。ER発現量とAIH患者の年齢や各種検査成績と発症形式に相関は認めなかった。さらに、エストロゲンは末梢血単核球のTNF α の産生を抑制することも確認した。以上の結果から、ERやエストロゲンなどがAIH病態に関与している可能性が示唆された。

共同研究者

高橋 敦史 福島県立医科大学
消化器・リウマチ膠原病内科

A. 研究目的

自己免疫性肝炎（AIH）は他の自己免疫疾患と同様に女性に多く認められる疾患である。全身性エリテマトーデスなどでは末梢血単核球でエストロゲンレセプター（ER） α の発現量が増加しており、病態への関与が示唆されている。今回AIH患者におけるER発現を解析し、AIHの病態における性ホルモンの影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

AIH患者21名（男性2名、女性19名、平均年齢53.9歳）の末梢血単核球細胞（PBMC）からRNAを抽出し、ER α と β の発現量をreal time PCR法により測定した。ER α と β の発現量を健常人10名（男性3名、女性7名、平均年齢37.1歳）と比較し、さらにAIH患者での発現量と年齢、血液検査成績（ALT、ALP、IgG、ANA）、発症様式および治療内容との関連につき検討した。またPBMCのLPSで刺激によるTNF α 産生におけるエストロゲンの影響を検討した。

C. 研究結果

AIH患者でのER α と β の相対発現度（ER/GAPDH）はそれぞれ $5.5 \pm 5.6 \times 10^{-3}$ 、 $6.1 \pm 6.7 \times 10^{-3}$ でありER α と β の発現量に有意差は認めなかった。健常人ではER α と β の相対発現度はそれぞれ $10.8 \pm 5.6 \times 10^{-3}$ 、 $4.9 \pm 4.0 \times 10^{-3}$ であり同様に両者に有意差はなかった。しかし、AIHでは健常人に比較しER α の発現量に有意に低下していた（ $P=0.02$ ）。AIH患者でのER α と β の発現量と年齢、血液検査成績（ALT、ALP、IgG、ANA）、発症様式およびステロイド治療量についても関連を検討したが有意な相関を認めなかった。また、PBMCをLPSによるTNF α 産生はエストラジオールを事前に投与した場合に有意に抑制された（ $P=0.0162$ ）。

D. 考察

エストロゲンレセプターノックアウトマウスでは自己免疫現象が進展することやエストロゲンの肝障害抑制作用はER α を介するなどの報告があり、自己免疫現象や肝障害にERが関与している可能性がある。一方で、エストロゲンがTh1/2シフトに影響し、制御性T細胞を増加させることも明らかとなっている。今回の検討でAIH患者では健常人に比しER α の発現量が有意に低下していた。また、エストラジオールはPBMCのTNF α 産生を抑制した。以上よりエストロゲンレセプターまたエストロゲンが自己免疫性肝炎の病態に関与している可能性が示唆された。今後AIH患者における経時的なER α 発現量の変化や血中エストロゲン濃度との関連も含め検討していく必要がある。

E. 結論

AIHの病態形成におけるエストロゲンレセプターの影響が示唆された。

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

Takahashi A, Honma F, Monoe K, Kanno Y, Saito H, Abe K, Yokokawa J, Ohira H. Estrogen receptor expression by peripheral blood mononuclear cells of patients with autoimmune hepatitis. The 61st annual meeting of the American association for the study of liver diseases, Boston, 2010

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

自己免疫性肝炎の診断：3因子スコア加算モデルによる複数の疾患を想定する場合

研究協力者 森實 敏夫 国際医療福祉大学塩谷病院 教授

研究要旨：ロジスティック回帰分析の結果、血清 ALP, ALT, 抗ミトコンドリア抗体 (AMA) の3因子スコア加算モデルで AIH と PBC の診断が可能であることをすでに報告した。3因子スコア加算モデルのスコア3以上を示す割合、すなわち陽性率と、スコア3未満を示す割合、すなわち陰性率を AIH, PBC, C型慢性肝炎症例で解析し、その結果に基づいて、3疾患の鑑別ができることを示した。

共同研究者

海老沼浩利 慶應義塾大学医学部消化器内科
日比 紀文 慶應義塾大学医学部消化器内科

A. 研究目的

診断法の診断能の評価には感度・特異度が用いられてきた。感度の値は、一定の Reference standard によって診断された患者における陽性率であり疾患スペクトルの影響を受けるが、特異度の値はさらにその疾患でないその他の疾患の患者あるいは健常者の構成によっても影響され、値が変動する。また、実際の臨床の場では、自己免疫性肝炎 (AIH)、薬剤性肝障害、原発性胆汁性肝硬変 (PBC)、など複数の疾患の鑑別が必要なことが普通である。そのためには、それぞれの疾患における陽性率を明らかにする必要がある。

全国調査のデータに基づき、ロジスティック回帰分析の結果、血清 ALP, ALT, 抗ミトコンドリア抗体 (AMA) の3因子による多変量モデルで AIH と PBC の診断が可能であることが分かっている。多項式の計算をしないで、単純に該当するスコアを合計するだけでも同じ診断が可能であることを前回までに示した。スコア合計が3以上で AIH、3未満で PBC と診断することができる。

今回は、慶應義塾大学病院と関連施設および国際医療福祉大学塩谷病院の肝疾患症例で、3因子スコア加算モデルのスコア3以上を示す割合、すなわち陽性率と、スコア3未満を示す割合、すなわち陰性率を AIH, PBC, C型慢性肝炎 (CHC) 症例で解析し、その結果に基づいて、さまざまな肝疾患の診断をシミュレートし、診断における有用性を検討した。

B. 研究方法

対象症例は AIH26例、PBC15例、CHC72例である。これらの症例で、診断時の血清 ALT, ALP AMA または抗 M2抗体を解析した。

3因子モデルのスコアは表1に示すように、各項目の該当する値に対して、スコアを付け、それを合計し、合計スコアが3以上を陽性、3未満を陰性とした。

表1. 3因子加算モデル

| 項目 | 値 | スコア |
|--------------|------|-----|
| 1. ALP/基準値上限 | <1.3 | +1 |
| | ≥1.3 | 0 |
| 2. ALT | ≥120 | +2 |
| | <120 | 0 |
| 3. AMA | <20倍 | +2 |
| | ≥20倍 | 0 |

この3因子スコア加算モデルを用いた、AIHとPBC診断アルゴリズムを図1に示す。

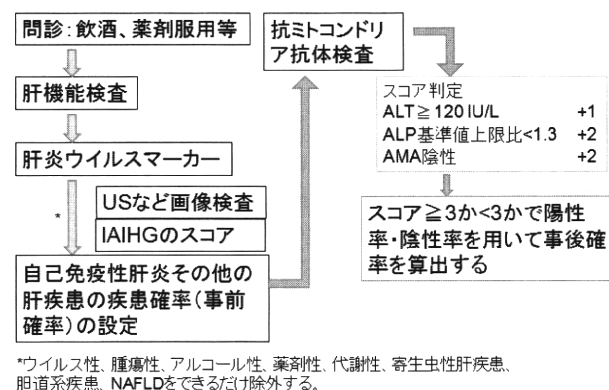


図1. 3因子スコア加算モデルを用いる AIH および PBC 診断アルゴリズム

C. 研究結果

3因子スコア加算モデルの疾患別陽性率および陰性率

今回解析した3種の肝疾患における陽性率および陰性率を表2, 3に示す。

表2. スコア3以上の率 (陽性率)

| 疾患 | 例数 | 陽性率 |
|-----|-------|----------|
| AIH | 24/26 | 0.923077 |
| CHC | 65/72 | 0.902778 |
| PBC | 1/15 | 0.066667 |

表3. スコア3未満の率 (陰性率)

| 疾患 | 例数 | 陰性率 |
|-----|-------|----------|
| AIH | 2/26 | 0.076923 |
| CHC | 7/72 | 0.097222 |
| PBC | 14/15 | 0.933333 |

これら陽性率、陰性率の値を用いることによって、AIH、CHC、PBCのいずれかが想定される状況において、それぞれの疾患の事前確率に陽性率または陰性率を掛け算した値、これは同時確率と呼ばれるが、を算出し、それらの合計に占めるそれぞれの疾患の同時確率の割合を算出すると、それぞれの疾患の事後確率が得られる。

各疾患の事前確率を $P(\text{AIH})$ 、 $P(\text{CHC})$ 、 $P(\text{PBC})$ とする。もし、その患者の3因子加算スコアが3以上になった場合には、AIH、CHC、PBCの事後確率はベイズの定理により、次の式で求められる：

AIHの事後確率

$$P(\text{AIH} \mid \text{スコア} \geq 3) = P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{AIH}) P(\text{AIH}) / [P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{AIH}) P(\text{AIH}) + P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{CHC}) P(\text{CHC}) + P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{PBC}) P(\text{PBC})]$$

CHCの事後確率

$$P(\text{CHC} \mid \text{スコア} \geq 3) = P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{CHC}) P(\text{CHC}) / [P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{AIH}) P(\text{AIH}) + P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{CHC}) P(\text{CHC}) + P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{PBC}) P(\text{PBC})]$$

PBCの事後確率

$$P(\text{PBC} \mid \text{スコア} \geq 3) = P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{PBC}) P(\text{PBC}) / [P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{AIH}) P(\text{AIH}) + P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{CHC}) P(\text{CHC}) + P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{PBC}) P(\text{PBC})]$$

いずれの式も分母は共通であり、同時確率の合計である。なお、スコアが3未満の場合には、表3の陰性率の値を用いて同様に計算する。

これらの式における、 $P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{AIH})$ はスコア3以上のAIHの陽性率のことで、表2の0.923077に相当する。同様に、 $P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{CHC})$ はスコア3以上のCHCの陽性率のことで、表2の0.902778に相当する。同様に、 $P(\text{スコア} \geq 3 \mid \text{PBC})$ はスコア3以上のPBCの陽性率のことで、表2の0.066667に相当する。

たとえば、抗核抗体陽性、IgG高値などでAIHがもっとも疑われる場合、事前確率を $P(\text{AIH}) = 0.7$ 、 $P(\text{CHC}) = 0.01$ 、 $P(\text{PBC}) = 0.29$ と設定したとする（例1）。3因子スコアが3以上という結果が得られるとすると、それぞれの疾患の事後確率は次のように算出される：

$$P(\text{AIH} \mid \text{スコア} \geq 3) = 0.923077 \times 0.7 / (0.923077 \times 0.7 + 0.902778 \times 0.01 + 0.066667 \times 0.29) \approx 0.958$$

$$P(\text{CHC} \mid \text{スコア} \geq 3) = 0.902778 \times 0.01 / (0.923077 \times 0.7 + 0.902778 \times 0.01 + 0.066667 \times 0.29) \approx 0.0134$$

$$P(\text{PBC} \mid \text{スコア} \geq 3) = 0.066667 \times 0.29 / (0.923077 \times 0.7 + 0.902778 \times 0.01 + 0.066667 \times 0.29) \approx 0.0287$$

したがって、この場合には、AIHの疾患確率が0.7から0.958へと上昇し、AIHと診断することになるであろう。

別の例として、HCV(+)であることが判明した時点で、事前確率を $P(\text{AIH}) = 0.01$ 、 $P(\text{CHC}) = 0.98$ 、 $P(\text{PBC}) = 0.01$ と設定したとする（例2）。3因子スコアが3以上の結果が得られるとすると、それぞれの疾患の事後確率は次のように算出される：

$$P(\text{AIH} \mid \text{スコア} \geq 3) = 0.923077 \times 0.01 / (0.923077 \times 0.01 + 0.902778 \times 0.98 + 0.066667 \times 0.01) \approx 0.0103$$

$$P(\text{CHC} \mid \text{スコア} \geq 3) = 0.902778 \times 0.98 / (0.923077 \times 0.01 + 0.902778 \times 0.98 + 0.066667 \times 0.01) \approx 0.989$$

$$P(\text{PBC} \mid \text{スコア} \geq 3) = 0.066667 \times 0.01 / (0.923077 \times 0.01 + 0.902778 \times 0.98 + 0.066667 \times 0.01) \approx 0.000745$$

この例では、事前確率でもCHCの疾患確率が非常に高いが、3因子の結果を加えると、0.989とさらに上昇する。一方でPBCの疾患確率は極めて低値となる。

それでは、スコアが3未満になる場合の事後確率算出例をあげる。胆道系酵素が高くPBCが疑われる様な場合であるが、事前確率を $P(\text{AIH}) = 0.2$ 、 $P(\text{CHC}) = 0.01$ 、 $P(\text{PBC}) = 0.79$ と設定したとする（例3）。この場合には、表3の陰性率の値を用いて事後確率を計算する：

$$P(\text{AIH} \mid \text{スコア} < 3) = 0.076923 \times 0.2 / (0.076923 \times 0.2 + 0.097222 \times 0.01 + 0.9333337 \times 0.79) \approx 0.0204$$

$$P(\text{CHC} \mid \text{スコア} < 3) = 0.097222 \times 0.01 / (0.076923 \times 0.2 + 0.097222 \times 0.01 + 0.9333337 \times 0.79) \approx 0.00129$$

$$P(\text{PBC} \mid \text{スコア} < 3) = 0.9333337 \times 0.79 / (0.076923 \times 0.2 + 0.097222 \times 0.01 + 0.9333337 \times 0.79) \approx 0.978$$

この例では、PBCの事後確率が0.978まで上昇し、ほぼ診断が確定されるであろう。

いずれの場合も、事前確率の設定は、図1のアルゴリズムにおいて、抗ミトコンドリア抗体の測定前に行うが、臨床経験も踏まえて、医師の主観に基づいて行わざるを得ない。いわゆる、Physician's index of suspicion 医師の診断確信度である。

D. 考 察

従来の疾患あり、なしの二分値による感度・特異度では、研究によって、特異度の値が変動することは避けられない。感度・特異度の2つの指標を用いることで、診断が単純化され、理解しやすいこと、また、陽