

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

マウス自己免疫性膵炎における膵外病変の検討

研究報告者 岡崎和一 関西医科大学内科学第三講座消化器内科学 教授

共同研究者

山科雅央, 西尾彰功, 内田一茂 (関西医科大学内科学第三講座)

【研究要旨】

- 1) 膵炎を発症した IL-10KO マウスと MRL マウスの膵外病変を比較することにより自己免疫性膵炎と腸炎の関係を検討する。
- 2) MRL 及び IL-10KO マウスにおいて poly I: C 投与により膵炎が起こり IL-10KO マウスでは腸炎が増悪した。唾液腺炎は MRL マウスにおいてのみみとめた。(表1) CD4 や CD8 の T 細胞に次いで多数の B 細胞や形質細胞が膵や門脈域に浸潤していた。
- 3) Foxp3 陽性 CD4 T 細胞が膵・肝・胆管に浸潤していた。細胞移入では CD4 陽性 T 細胞移入では膵炎や胆管炎が起こったが CD8 陽性 T 細胞ではおこらなかった。

A. 研究目的

自己免疫性膵炎は自己免疫機序により発症すると考えられる膵臓の慢性炎症である。病理組織学的に、IgG4 陽性形質細胞を含む膵管周囲の著明なリンパ球/形質細胞浸潤、花筵状線維化、閉塞性静脈炎、血清 IgG4 上昇、自己抗体出現を特徴とする I 型と、膵管周囲の好中球浸潤、膵管を中心とした線維化、炎症性腸疾患の合併を特徴とする II 型に分類される。さらに、硬化性胆管炎、硬化性唾液腺炎、後腹膜線維化など様々な膵外病変を伴うことが報告されている。現在我が国を中心に病態解明が精力的に進められており、IgG4 関連全身性疾患の概念が構築されつつある^{1,2)}。

臨床的には、黄疸、上腹部痛、体重減少などの症状で発症するが、膵炎発症患者に対するステロイド初期治療のレジメンがほぼ確立されており、治療開始により膵炎および臨床症状の改善がみられる。しかし、ステロイド投与中止によりしばしば膵炎が再燃することより、ステロ

イド中止時期やの維持療法が検討課題となっており、ステロイド抵抗性症例の治療法も確立されていない。膵炎を発症した IL-10KO マウスと MRL マウスの膵外病変を比較することにより自己免疫性膵炎と腸炎の関係を検討する。

B. 研究方法

- 1) 生後 6 週の IL-10KO C57BL/6 マウス及び MRL マウスに poly I: C を週 2 回 8 週間腹腔内投与し膵炎モデルを作製する。膵炎発症マウスの血清中膵酵素、肝胆道系酵素、サイトカインを測定する。膵炎、胆管炎病変の重症度をスコアリングシステムで組織学的に評価する。肝臓および総胆管の病変部浸潤炎症細胞について免疫組織学的に検討する。
- 2) 膵炎マウスの脾臓細胞よりリンパ球を抽出しそのサブセットを磁気ビーズシステムを用いて分離し、同系統の免疫不全マウス(SCID マウス, RAG2 欠損マウス)に

Table. 1 Incidence and severity of extrapancreatic lesions in MRL/Mp and IL-10KO mice with autoimmune pancreatitis.

Mouse	Pancreatitis		Intrahepatic cholangitis		Extrahepatic cholangitis		Sialadenitis	
	Incidence (%)	Severity (0-4)	Incidence (%)	Severity (0-3)	Incidence (%)	Severity (0-3)	Incidence (%)	Severity (0-1)
MRL	15/15(100)	3.4±0.6	13/15(87)	1.4±0.7	11/15(73)	1.2±0.9	15/15(100)	1.0±0
IL-10KO	15/15(100)	3.2±0.6	11/15(73)	1.0±0.8	10/15(67)	1.0±0.8	0/15(0)	0

養子移入し、胆管炎や膵炎の発症について検討する。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、動物実験倫理委員会の承認を得て(動物実験承認番号 10-028)、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境下で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を行っている。実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。

C. 研究結果

1) MRL 及び IL-10KO マウスにおいて poly I: C 投与により膵炎が起こり IL-10KO マウスでは腸炎が増悪した。唾液腺炎は MRL マウスにおいてのみみとめた。(table. 1) CD4 や CD8 の T 細胞に次いで多数の B 細胞や形質細胞が膵や門脈域に浸潤していた。

2) Foxp3 陽性 CD4 T 細胞が膵・肝・胆管に浸潤していた。細胞移入では CD4 陽性 T 細胞移入では膵炎や胆管炎が起こったが CD8 陽性 T 細胞ではおこらなかった。

D. 考察

自己免疫性膵炎は臨床経過により Type 1 AIP と Type 2 AIP に分類される。Type 1 AIP は硬化性胆管炎や唾液腺炎・後腹膜線維症といった膵外病変をみとめるのに対し Type 2 AIP では潰瘍性大腸炎を合併する。Type 1 AIP では高ガンマグロブリン血症・血清 IgG や IgG4 の上昇をみとめるのに対し type 2 AIP では血清マーカーの上昇をみとめない。故にこれらの膵炎モデルマウスは Type 1 AIP のモデルであることが示唆される。

E. 結論

IL-10KO マウスや MRL マウスに poly I: C を投与すると自己免疫性膵炎を発症すると考えられた。

またそれらは Type 1 AIP のモデルと考えられた。

F. 参考文献

1. Yoshida K, et al. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1561-8.
2. 日本膵臓学会. 自己免疫性膵炎診断基準2002年膵臓 2002; 17: 585-7.
3. 厚生労働省難治性膵疾患調査研究班・日本膵臓学会. 自己免疫性膵炎臨床診断基準 2006 膵臓 2006; 21: 395-7.
4. 厚生労働省難治性膵疾患調査研究班・日本膵臓学会. 自己免疫性膵炎診療ガイドライン 2009. 膵臓 2009; 24(Supl): 1-54.
5. Okazaki K, Kawa S, Kamisawa T, et al. Japanese clinical guideline for autoimmune pancreatitis. *Pancreas*. 2009; 38(8): 849-66.
6. Fitch K, Bernstein SJ, et al. The RAND/UCLA Appropriateness Method User's Manual. Santa Monica CA: RAND; 2001.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kalaitzakis E, Levy M, Kamisawa T, Johnson GJ, Baron TH, Topazian MD, Takahashi N, Kanno A, Okazaki K, Egawa N, Uchida K, Sheikh K, Amin Z, Shimosegawa T, Sandanayake NS, Church NI, Chapman MH, Pereira SP, Chari S, Webster GJ. Endoscopic Retrograde Cholangiography Does Not Reliably Distinguish IgG4-Associated Cholangitis From Primary Sclerosing Cholangitis or Cholangiocarcinoma. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 2011; 9(9): 800-803, e2
- 2) Okazaki K, Uchida K, Miyoshi H, Ikeura T, Takaoka M, Nishio A. Recent Concepts of Autoimmune Pancreatitis and IgG4-Related Disease. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2011; 41(2): 126-138.
- 3) Okazaki K, Uchida K. Immunological aspects of IgG4-related disease. *Current immunology reviews*. 2011; 7(2): 204-211.
- 4) Tomiyama T, Uchida K, Matsushita M,

- Ikeura T, Fukui T, Takaoka M, Nishio A, Okazaki K. Comparison of steroid pulse therapy and conventional oral steroid therapy as initial treatment for autoimmune pancreatitis. *Journal of Gastroenterology*. 2011; 46(5): 696–704.
- 5) Okazaki K, Uchida K, Koyabu M, Miyoshi H, Takaoka M. Recent advances in the concept and diagnosis of autoimmune pancreatitis and IgG4-related disease. *Journal of gastroenterology*. 2011; 46(3): 277–288.
 - 6) Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Sumida T, Mimori T, Tanaka Y, Tsubota K, Yoshino T, Kawa S, Suzuki R, Takegami T, Tomosugi N, Kurose N, Ishigaki Y, Azumi A, Kojima M, Nakamura S, Inoue D; The Research Program for Intractable Disease by Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) Japan G4 team. A novel clinical entity, IgG4-related disease (IgG4RD): general concept and details. *Modern Rheumatology*. 2011; Sep 1. [Epub ahead of print]
 - 7) Sugumar A, Levy MJ, Kamisawa T, J M Webster G, Kim MH, Enders F, Amin Z, Baron TH, Chapman MH, Church NI, Clain JE, Egawa N, Johnson GJ, Okazaki K, Pearson RK, Pereira SP, Petersen BT, Read S, Sah RP, Sandanayake NS, Takahashi N, Topazian MD, Uchida K, Vege SS, Chari ST. Endoscopic retrograde pancreatography criteria to diagnose autoimmune pancreatitis: An international multicentre study. *Gut*. 2011; 60(5): 666–670.
 - 8) Kusuda T, Uchida K, Miyoshi H, Koyabu M, Satoi S, Takaoka M, Shikata N, Uemura Y, Okazaki K. Involvement of Inducible Costimulator- and Interleukin 10-Positive Regulatory T Cells in the Development of IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. *Pancreas*. 2011; 40(7): 1120–1130.
 - 9) Kamisawa T, Chari ST, Giday SA, Kim MH, Chung JB, Lee KT, Werner J, Bergmann F, Lerch MM, Mayerle J, Pickartz T, Lohr M, Schneider A, Frulloni L, Webster GJ, Reddy DN, Liao WC, Wang HP, Okazaki K, Shimosegawa T, Kloepfel G, Go VL. Clinical Profile of Autoimmune Pancreatitis and Its Histological Subtypes: An International Multicenter Survey. *Pancreas* 2011; 40(6): 809–814.
 - 10) Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L, Kamisawa T, Kawa S, Mino-Kenudson M, Kim MH, Klöppel G, Lerch MM, Löhr M, Notohara K, Okazaki K, Schneider A, Zhang L. International Consensus Diagnostic Criteria for Autoimmune Pancreatitis: Guidelines of the International Association of Pancreatology. *Pancreas* 2011; 40(3): 352–358.
 - 11) Kamisawa T, Kim M-H, Liao W-C, Liu Q, Balakrishnan V, Okazaki K, Shimosegawa T, Chung JB, Lee KT, Wang H-P, Lee T-C, Choudhuri G. Clinical characteristics of 327 Asian patients with autoimmune pancreatitis based on asian diagnostic criteria. *Pancreas*. 2011; 40(2): 200–205.
 - 12) Nishio A, Asada M, Uchida K, Fukui T, Chiba T, Okazaki K. The Role of Innate Immunity in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Pancreatitis in Mice. *Pancreas*. 2011; 40(1): 95–102.
 - 13) 岡崎和一. IgG4 関連疾患. *BIO Clinica*. 2011; 26(11): 1049–1055.
 - 14) 岡崎和一, 内田一茂, 福井由里, 池浦司. IgG4 測定方法と正常値, 診断的意義 *Modern Media*. 2011; 57(5): 146–149.
 - 15) 岡崎和一. 自己免疫性膵炎治療の進歩. *クリニシアン* 2011; 58(601): 994–1000.
 - 16) 岡崎和一. 膵臓疾患の診療ガイドライン 自己免疫性膵炎診療ガイドライン 2009 日本臨床. (別冊 膵臓症候群): 469–480.
 - 17) 岡崎和一, 中島 淳, 岸本真房, 栗島亜希子, 内田一茂. 各論 自己免疫性膵炎

臨床検査 2011; 55(8): 753-761.

- 18) 岡崎和一. IgG4 関連疾患 日本内科学会雑誌 2011; 100(9): 2667-2675.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Kazushige Uchida, Takeo Kusuda, Yutaku Sakaguchi, Katsunori Yoshida, Toshiro Fukui, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki. Possible role of ICOS and IL-10 Positive Regulatory T Cells in the Development of IgG4-related Autoimmune Pancreatitis. American Pancreatic Association Meeting. 2011/11. Chicago, USA.
- 2) Kazushige Uchida, Takeo Kusuda, Yutaku Sakaguchi, Katsunori Yoshida, Toshiro Fukui, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki. Possible role of ICOS and IL-10 Positive Regulatory T Cells in the Development of IgG4-related Autoimmune Pancreatitis. American Pancreatic Association Meeting. 2011/11. Chicago, USA.
- 3) Kazuichi Okazaki, Kimi Sumimoto, Tsukasa Ikeura, Kazushige Uchida, Makoto Takaoka. HOW to recognize the mimickers of pancreas cancer in AIP? Japanese experience. Joint Meeting of the 4th Asian-Oceanic Pancreas Association and 2011 Annual Congress of the Korean Pancreatobiliary Association 2011/09. Jeju, Korea.
- 4) Shinji Nakayama, Akiyoshi Nishio, Yutaku Sakaguchi, Katsunori Yoshida, Toshiro Fukui, Kazushige Uchida, Kazuichi Okazaki. The Participation of innate and Acquired Immunity of Alcoholic Chronic Pancreatitis DDW2011 2011/05 Chicago, USA.
- 5) Takeo Kusuda, Kazushige Uchida, Yutaku Sakaguchi, Katsunori Yoshida, Toshiro Fukui, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki. Involvement of ICOS and IL-10 Positive Regulatory T Cells in the Development of

IgG4-related Autoimmune Pancreatitis. DDW2011 2011/05 Chicago, USA.

- 6) K Uchida, T Kusuda, H Miyoshi, T Ikeura, Y Sakaguchi, K Yoshida, T Fukui, M Shimatani, M Matsushita, M Takaoka, A Nishio, K Okazaki. Possible role of ICOS positive and IL-10 producing regulatory T cells in patients with autoimmune pancreatitis. Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and Indian Pancreas Club Kochi, Kerala, India 2011/02.

国内学会

- 1) 楠田武生, 内田一茂, 三好秀明, 福井由理, 小藪雅紀, 深田憲将, 坂口雄沢, 吉田勝紀, 福井寿朗, 池浦 司, 島谷昌明, 高岡 亮, 西尾彰功, 岡崎和一. 自己免疫性膵炎(AIP)におけるIL-10とICOS陽性制御性T細胞に関する検討. 第21回日本サイトメトリー学会. 2011/06. 京都
- 2) Kazuichi Okazaki, Hisanori Umehara. Concept of IgG4-related Disease and Proposal of Comprehensive Diagnostic Criteria in Japan. 第20回日本シェーグレン症候群学会 2011/09 金沢市
- 3) 内田一茂, 小藪雅紀, 岡崎和一. IgG4関連疾患としての肝胆膵病変における制御性T細胞とIgG4陽性形質細胞の検討第97回日本消化器病学会総会 2011/05 東京
- 4) 内田一茂, 岡崎和一. パネルディスカッション自験例よりみた自己免疫性膵炎の診断に関する検討 第42回日本膵臓学会大会 2011/07 弘前市
- 5) 岡崎和一, 内田一茂. IgG4関連疾患としての肝胆膵病変における制御性T細胞とIgG4陽性形質細胞の検討 JDDW2011 2011/10 福岡市
- 6) 内田一茂, 西尾彰功, 岡崎和一. IgG4関連疾患におけるIgG4陽性細胞と制御性T細胞に関する検討 第48回日本消化器免疫学会総会 2011/07 金沢市

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

1 型自己免疫性膵炎にみられる マクロファージについての解析

研究報告者 能登原憲司 倉敷中央病院病理検査科 主任部長

共同研究者

内野かおり（姫路赤十字病院病理診断科・岡山大学大学院医歯薬総合研究科）

和仁洋治（倉敷中央病院病理検査科），藤澤真義（姫路赤十字病院病理診断科）

【研究要旨】

1 型自己免疫性膵炎 (type 1 autoimmune pancreatitis; type 1 AIP) の炎症巣には、紡錘形～樹状形態を示す CD163 陽性マクロファージの増生がみられる。この細胞が M2 型マクロファージといえるのかを明らかにする目的で、type 1 AIP 13 例、type 2 AIP 2 例、急性膵炎 6 例、慢性膵炎 4 例のホルマリン固定切除検体を用い、CD163、他の M2 型 (CD204, CD205)、および一般的な (CD14, CD16) 単球・マクロファージマーカーの免疫染色を施行した。Type 1 AIP では多数の樹状マクロファージに CD163, CD204, CD205, CD16 が陽性となり、膵周囲脂肪組織の花筵状線維化巣、小葉内、膵管上皮周囲に束状に増殖していた。特に CD204 は CD163 と同様の陽性細胞数、染色強度を示した。CD14 陽性細胞はきわめて少数であった。他の疾患では、M2 型マーカー陽性細胞の集簇はみられるものの、少数であった。特に紡錘形～樹状形態を示す細胞は乏しく、円形の細胞や貪食細胞が混在していた。Type 1 AIP の病変内の CD163 陽性マクロファージは M2 型と考えられ、CD163 や CD204 を用いて同定することは、type 1 AIP と他の膵疾患との鑑別に有用である。

A. 研究目的

我々は以前の検討で、1 型自己免疫性膵炎 (type 1 autoimmune pancreatitis; type 1 AIP) の炎症巣には紡錘形～樹状形態を示す CD163 陽性マクロファージが増生していることを明らかにした¹⁾。CD163 は M2 型マクロファージのマーカーの 1 つとして知られるため、これらの細胞は M2 型マクロファージである可能性があり、さらにこれが原因で type 1 AIP では Th2 優位の免疫応答が引き起こされている可能性もあり興味深い。そこで、CD163 以外の M2 型、および一般的な単球・マクロファージのマーカーを用いて、免疫染色による検討を行った。

B. 研究方法

Type 1 AIP 13 例、type 2 AIP 2 例、急性膵炎 (acute pancreatitis; AP) 6 例、慢性膵炎 (chronic pancreatitis; CP) 4 例それぞれの切除検体のホルマリン固定、パラフィン包埋組織を

用いた。CD163 に加えて、他の M2 マクロファージマーカーである CD204, CD205、一般的な単球・マクロファージマーカーである CD14, CD16 の免疫染色を施行した。
(倫理面への配慮)

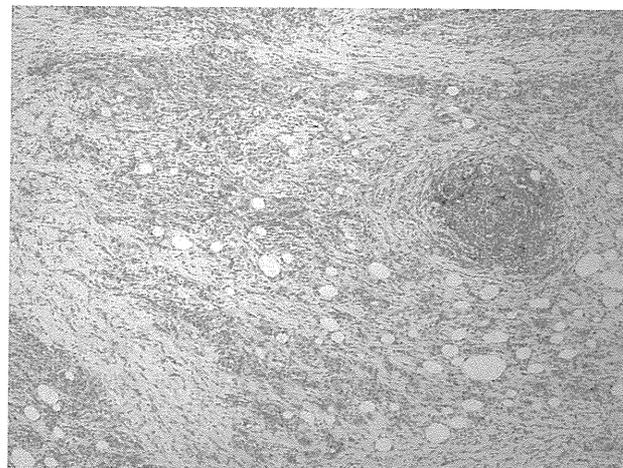
この研究は倉敷中央病院病理検査科内で、個人情報保護に配慮を払いながら行われた。この研究は診断目的で過去に得られた組織検体を用いる後向き研究で、研究対象者に与える不利益、危険性は最小限であり、また被験者の権利を脅かす危険性も低い。倫理面の問題はないと考える。この研究は、倉敷中央病院臨床研究審査委員会にて承認された (臨床研究申込番号第 461 号)。

C. 研究結果

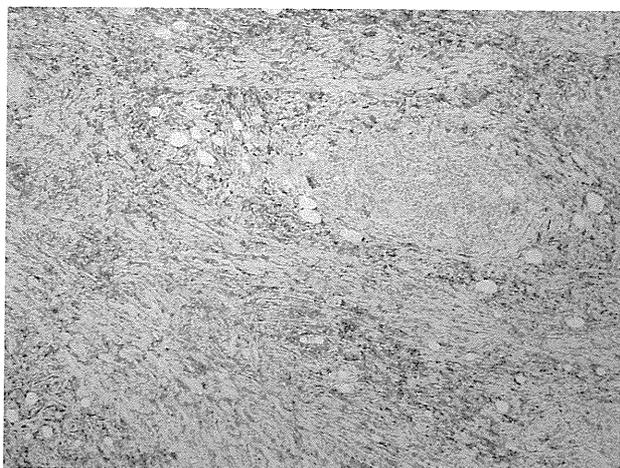
Type 1 AIP では多数の CD163 陽性細胞が認められ、その大部分が紡錘形～樹状形態を示し、束状に増殖していた (図 1)。特に膵周囲脂肪組織にみられる花筵状線維化や小葉内、膵管



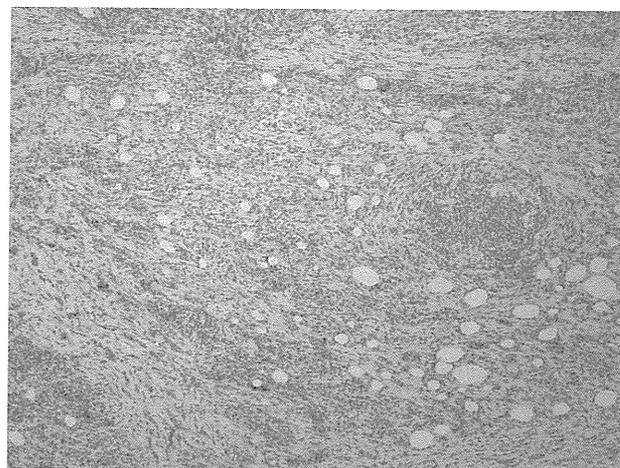
(a)



(d)



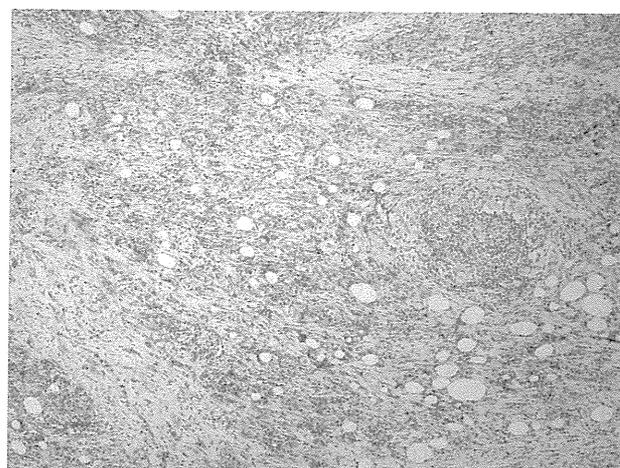
(b)



(e)



(c)



(f)

図 1 Type 1 AIP の免疫染色所見. H & E 染色標本(a)にて臍周囲脂肪組織に花筵状線維化がみられる. CD163 の免疫染色 (b)では多数の紡錘形～樹状マクロファージが陽性を示し, 束状に増殖し, 花筵状線維化が強調される. CD204(c), CD205(d), CD16(e)では同様の細胞に陽性所見がみられ, 特に CD204 は CD163 と同等の結果を示す. CD14 陽性細胞 (f)はごく少数である.

上皮周囲の炎症巣では、多くの陽性細胞が集簇していた。さらに、CD204, CD205, CD16も同様の細胞に陽性となった。特にCD204はCD163と同様の陽性細胞数、染色強度を示し、かつ特異性が高かった。CD205はCD163やCD204では標識されない、リンパ濾胞内の樹状細胞にも陽性であった。CD14陽性細胞はきわめて少数であった。一方type 2 AIP, AP, CPにおいては、M2マーカー陽性細胞の集簇は散見されるものの、少数であった。特に紡錘形～樹状形態のマクロファージは乏しく、円形の細胞や貪食細胞が混在していた。

D. 考察

Type 1 AIPの病理診断では、花筵状線維化、閉塞性静脈炎などの組織所見が重視される²⁻⁴⁾。花筵状線維化は線維化病変でありながら、リンパ球、形質細胞、そして束状から渦巻き状に増殖する紡錘形～樹状形態を示す細胞といった細胞成分に富む病変である^{5,6)}。以前の我々の検討で、この紡錘形～樹状細胞の本体は間質由来の線維芽細胞だけではなく、CD163陽性のマクロファージであることが明らかになっている。このマクロファージの性質を解析することは、type 1 AIPの診断や炎症の病態解明の上で意義深いと期待される。

マクロファージは古くから古典的活性型のM1型、選択的活性型のM2型の2種に分類されてきた。CD163はM2型マーカーに属するが、今回我々はtype 1 AIPにみられるCD163陽性マクロファージが、他のM2型マーカーであるCD204, CD205にも陽性であることを確認した。また一般的なマクロファージ・単球マーカーであるCD16にも陽性となった。このことからtype 1 AIPにおける花筵状線維化に代表される線維化巣はおもにM2型マクロファージの性質を示す紡錘形～樹状マクロファージから構成されていることが示された。

またtype 2 AIP, AP, CPではM2型マーカー陽性の細胞の集簇は一部にみられるものの、紡錘形～樹状形態を示すものは少数で、束状の増殖はみられなかった。このことから、type 1 AIPの組織所見を特徴づけるのは束状

になった紡錘形～樹状マクロファージの増殖であると考えられる。さらに、CD163, CD204の免疫染色はtype 1 AIPと他の膵炎との組織学的鑑別に有用であると思われる。さらなる特異性の確認のため、膵外を含めた幅広い炎症性疾患でのM2型マーカー陽性マクロファージの検討や、type 1 AIPの炎症の進行・消退といった病態との関係の解析は今後の課題である。

E. 結論

Type 1 AIPにみられる紡錘形～樹状マクロファージは、M2型マクロファージの性質を示す。免疫染色ではM2型マクロファージマーカーのうちCD163およびCD204が、その検出に有用である。これらM2型樹状マクロファージが束状に増殖する像は、type 1 AIP以外の膵炎ではきわめて少なく、鑑別診断の一助になる。

F. 参考文献

1. 能登原憲司, 和仁洋治, 内野かおり, 藤澤真義, 島津弥生, 島津 裕, 新井 修, 上田恭典. 自己免疫性膵炎の臨床病理学的検討: 病理組織学的解析とリンパ節病変の意義に関する検討. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究平成20年度～22年度総合研究報告書 2011; 396-403.
2. Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L, Kamisawa T, Kawa S, Mino-Kenudson M, Kim MH, Klöppel G, Lerch MM, Löhr M, Notohara K, Okazaki K, Schneider A, Zhang L. International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatology. *Pancreas* 2011, 40: 352-358.
3. Kawaguchi K, Koike M, Tsuruta K, Okamoto A, Tabata I, Fujita N. Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis with cholangitis: a variant of primary sclerosing cholangitis extensively involving pancreas. *Hum Pathol* 1991; 22: 387-395.
4. Notohara K, Burgart LJ, Yadav D, Chari S,

Smyrk TC. Idiopathic chronic pancreatitis with periductal lymphoplasmacytic infiltration. Clinicopathologic features of 35 cases. Am J Surg Pathol 2003; 27: 1119-1127.

5. Notohara K, Arimoto M, Wani Y, Fujisawa M. Autoimmune pancreatitis: pancreatic manifestation of IgG4-related disease. Pathol Case Rev 2010, 15: 219-224.
6. Notohara K, Wani Y, Fujisawa M. Pathologic findings of autoimmune pancreatitis and IgG4-related disease. Curr Immunol Rev 2011, 7: 212-220.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Notohara K, Wani Y, Fujisawa M. Pathologic findings of autoimmune pancreatitis and IgG4-related disease. Curr Immunol Rev 2011, 7: 212-220.
- 2) Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L, Kamisawa T, Kawa S, Mino-Kenudson M, Kim MH, Klöppel G, Lerch MM, Löhner M, Notohara K, Okazaki K, Schneider A, Zhang L; International Association of Pancreatology. International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatology. Pancreas 2011, 40: 352-358.
- 3) Zhang L, Chari S, Smyrk TC, Deshpande V, Klöppel G, Kojima M, Liu X, Longnecker DS, Mino-Kenudson M, Notohara K, Rodriguez-Justo M, Srivastava A, Zamboni G, Zen Y. Autoimmune pancreatitis (AIP) type 1 and type 2: an international consensus study on histopathologic diagnostic criteria. Pancreas 2011; 40: 1172-1179.
- 4) 能登原憲司. 胆膵 自己免疫性膵炎 LPSP (1型) と IDCP (2型). 林 紀夫, 日比紀文, 上西紀夫, 下瀬川徹, 編. Annual Review 消化器2011. 東京. 中外医学社. 2011; 266-272.
- 1) Notohara K. Autoimmune pancreatitis: role of pathologists for making the diagnosis. 7th Asia Pacific International Academy of Pathology Congress. Taipei, Taiwan, 2011年5月.
- 2) 能登原憲司. 自己免疫性膵炎の病理診断: 花筵状線維化の再検討. 第42回日本膵臓学会大会. 青森, 2011年7月.
- 3) 能登原憲司. [レビュー] IgG4 関連疾患の病理. 第12回東京びまん性肺疾患研究会. 東京, 2011年10月.
- 4) Notohara K, Wani Y, Fujisawa M. Storiform fibrosis in various organs involved by IgG4-related disease. International Symposium on IG4-Related Disease. Boston, MA, USA. 2011年10月.
- 5) 能登原憲司. [基調講演] IgG4 関連疾患の病理学的特徴. 第53回日本消化器病学会大会(JDDW2011). 福岡. 2011年10月.
- 6) Notohara K, Hotta M, Wani Y, Matsuda T. Recurrent type 1 autoimmune pancreatitis. 第57回日本病理学会秋期特別総会サテライトシンポジウム. 東京, 2011年11月.
- 7) Notohara K. Pathological findings of type 1 and type 2 AIP. The International Pancreatic Research Forum 2011. 大阪, 2011年11月.
- 8) Uchino K, Notohara K, Fujisawa M, Wani Y, Matsukawa A. Expression of other M2-macrophage markers in CD163+ dendritic macrophages in lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis. 101th Annual Meeting of United States and Canadian Academy of Pathology. Vancouver, Canada. 2012年3月.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

2. 学会発表

自己免疫性腭炎と皮膚毛巣洞炎における CD4 + CD25 + 制御性 T 細胞量の検討

研究報告者 須田耕一 東京西徳洲会病院病理科 顧問

共同研究者

福村由紀, 高瀬 優, 阿部 寛, 柿沼千早, 八尾隆史
(順天堂大学医学部人体病理病態学講座)

【研究要旨】

近年 IgG4 関連疾患における CD4 + CD25 + FoxP3 + 制御性 T 細胞(以下, Treg)の関与が報告されてきたが, その役割や特異性は未だ明らかではない. 今回, しばしば多くの IgG4 陽性形質細胞の浸潤を認める皮膚毛巣洞炎(非 IgG4 関連疾患)を対照症例とし, 自己免疫性腭炎(type 1 AIP)における Treg の関与, 特異性を検討した. type 1 AIP 4 例, 皮膚毛巣洞炎10例について, IgG4, FoxP3 に対する免疫染色, CD4/CD25 に対する二重免疫染色, CD4/CD25 に対する蛍光二重免疫染色を施行した. その結果, AIP 全例でびまん性に多数(30-99/HPF)の IgG4 陽性形質細胞を見, 皮膚毛巣洞炎では30%(3 例)において膿瘍部と肉芽部に限局性に多数の IgG4 陽性形質細胞を見た. FoxP3 染色および二重免疫染色では, AIP および皮膚毛巣洞炎膿瘍部で多数(5/HPF 以上)の Treg を認めたが, 後者の肉芽部では少数(0-4/HPF)であった. 本結果は蛍光二重免疫染色で確認された. 結論として, 多くの Treg の浸潤を type 1 AIP および皮膚毛巣洞炎膿瘍部で認めるも, 後者の肉芽部では認めなかったことから, (1) type 1 AIP で Treg が多く浸潤するが, 特異的な現象ではない. (2)両疾患において組織切片上での Treg 浸潤と IgG4 陽性形質細胞浸潤は関連している. (3) Treg は炎症反応の活動性の高い時期に多く出現するが, 消退治癒期になると減少する可能性がある.

A. 研究目的

IgG4 関連疾患は高 IgG4 血症と組織局所における IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とするが, 未だ本疾患群の原因は明らかではない. 近年, 制御性 T 細胞の一種であり, FoxP3 をそのマスター遺伝子とする CD4 + CD25 + 制御性 T 細胞(以下, Treg)が, 自己免疫性腭炎(以下, AIP)を含め IgG4 関連疾患において多く出現すること, ならびに本疾患群の病態に深く関わることなどが報告されてきた¹⁻³⁾. Treg は免疫抑制系のサイトカインである IL-10 や TGF- β などの分泌を介し, B 細胞の IgG4 陽性形質細胞への分化を誘導するとされる⁴⁾. しかしながら, Treg の IgG4 関連疾患における検討は未だ少なく, 本疾患群における Treg の役割や特異性は明らかではない.

仙尾部皮膚毛巣洞炎は, 毛幹組織が逆行性に同部皮膚に陥入する後天性の難治性皮膚潰瘍病変で⁵⁾, 20-30歳代を好発年齢とする非 IgG4

関連疾患である. 本症は, 再発率が高くしばしば手術の適応となる. 我々は, 皮膚毛巣洞炎など全身の慢性炎症性疾患の組織切片に IgG4 陽性形質細胞が高頻度に浸潤することを, 平成19年度の厚生労働科学研究費補助金, 難治性疾患克服研究事業本調査研究として報告してきた⁶⁾.

今回, AIP および皮膚毛巣洞炎の症例を用いて, Treg の組織学的出現量とその出現部位を比較することにより, Treg 浸潤と IgG4 陽性形質細胞との関連, AIP における特異性の有無, Treg の IgG4 関連疾患における役割を検討した.

B. 研究方法

自己免疫性腭炎(type 1 AIP)手術例 4 例を対象とし, 皮膚毛巣洞炎手術例10例を対照とした. 全例に, Hematoxylin-Eosin 染色, Elastica van Gieson(以下, EVG)染色, IgG4

に対する免疫染色(抗 IgG4 抗体: Binding Site 社, polyclonal, 希釈倍率, 500倍), FoxP3 に対する免疫染色(抗 FoxP3 抗体: Spring Bioscience 社, polyclonal, 希釈倍率, 5倍), CD4/CD25 に対する二重免疫染色(抗 CD4 抗体: Novo Castra 社, クローン, 1F6, 希釈倍率, 40倍, 発色色素, TACS-Blue, R&D systems 社, 抗 CD25 抗体: Novo Castra 社, クローン, 4C9, 希釈倍率, 200倍, 発色色素, Fast Red, Falma 社), および, CD4/CD25 に対する蛍光二重免疫染色(蛍光色素, Alexa Fluor 594, Invitrogen 社, Alexa Fluor 488, In-

vitrogen 社)を施行した. IgG4 陽性形質細胞の評価は, Kamisawa らの基準⁷⁾にほぼ準じ, High power field (HPF)で一視野あたりの陽性細胞数で評価し, 0-9 個/HPF を(-), 10-29/HPF を(1+), 30-99/HPF を(2+), 100以上/HPF を(3+)とした. FoxP3 陽性細胞, および, CD4/CD25 二重免疫染色陽性細胞の評価は, 表 1, 2 欄外に示す通りとした.

(倫理面への配慮)

本研究における病理組織学的手法の全ては順天堂大学医学部人体病理病態学講座およびその保有する実験施設にて行った. 全ての症例は症例番号管理とし, 個人情報取り扱いには十分な配慮を保った. 今回は, 遺伝子を用いた検討は施行しておらず, 倫理面の問題はないと考える.

表 1 自己免疫性膵炎における IgG4, Foxp3 および CD4+/CD25+スコア

症例	年齢/性別	IgG4*	Foxp3 ^φ	CD4+/CD25+細胞 ^ξ (二重免疫染色)
1	74才/男性	2+	+	+
2	62才/男性	2+	+	+
3	61才/男性	2+	+	+
4	59才/男性	2+	+	+

(平均) (50.2才)

* IgG4 スコア, -, 0-9/HPF; 1+, 10-29/HPF; 2+, 30-99/HPF.

^φ Foxp3 スコア, -, 0-4/HPF; +, 5-19/HPF; ++, ≥20 positive cells

^ξ CD4+/CD25+スコア, -, 0-4/HPF; +, 5-10/HPF; ++, ≥11 positive cells

表 2 皮膚毛巣洞炎における IgG4, Foxp3 および CD4+/CD25+スコア

症例	年齢/性別	IgG4*	Foxp3 ^φ	CD4+/CD25+細胞 ^ξ (二重免疫染色)
1	31才/女性	2+	-	-
2 [ⓐ]	26才/男性	2+(2+)	+(++)	+(++)
3	35才/男性	2+	+	-
4 [ⓐ]	19才/男性	1+(1+)	-(+)	-(+)
5 [ⓐ]	38才/男性	1+(1+)	+(++)	-(++)
6	35才/男性	1+	-	-
7 [ⓐ]	23才/男性	-(1+)	-(+)	-(+)
8 [ⓐ]	20才/男性	-(1+)	+(++)	-(++)
9	31才/男性	-	+	-
10	27才/男性	-	-	-

(平均) (28.5才)

[ⓐ] 症例 2, 4, 5, 7 および 8 には膿瘍部と肉芽部の両者が見られた. 一方, 他の症例には肉芽部のみを認めた. () 内は膿瘍部の IgG4, Foxp3 および CD4+CD25+スコアを示す.

* IgG4 スコア, -, 0-9/HPF; 1+, 10-29/HPF; 2+, 30-99/HPF.

^φ Foxp3 スコア, -, 0-4/HPF; +, 5-19/HPF; ++, ≥20.

^ξ CD4+/CD25+スコア, -, 0-4/HPF; +, 5-10 dual/HPF; ++, ≥11 positive cells.

C. 研究結果

1. AIP 症例

AIP 症例は全例とも, やや境界不明瞭な腫瘤を形成し, リンパ球・形質細胞の密な浸潤と錯綜配列する線維化からなっていた(図 1A). 全例に EVG 染色で閉塞性静脈炎像が認められた. 免疫染色では, 膵管周囲性, 小葉周囲性, および小葉内にびまん性に IgG4 陽性細胞の浸潤を認めた(表 1). FoxP3 陽性細胞(図 1B), CD4+CD25+二重免疫染色陽性細胞(図 1C)共に, びまん性に多数認められた. 蛍光二重免疫染色で, 多数の CD4+CD25+二重陽性細胞の存在が確認された(図, 省略).

2. 皮膚毛巣洞炎症例

皮膚毛巣洞炎症例は全例, 瘻孔が存在し, その 4 例(40%)は重層扁平上皮の被覆を見たが, 残りの症例では上皮が完全に脱落していた. いずれも瘻孔内部に数個の毛幹が認められた. 皮膚毛巣洞炎症例の内, 5 例(50%)は瘻孔周囲に膿瘍部を(図 3A), さらにその周囲に好中球浸潤を欠く肉芽部を認めた(図 3C). 残りの 5 例(50%)では, 瘻孔周囲に膿瘍部はなく, 肉芽部が散在していた.

免疫染色では, 皮膚毛巣洞炎の 30%がその肉芽組織に, また膿瘍の存在する症例では膿瘍部に IgG4 スコア: 2+を示し, 30%が肉芽部

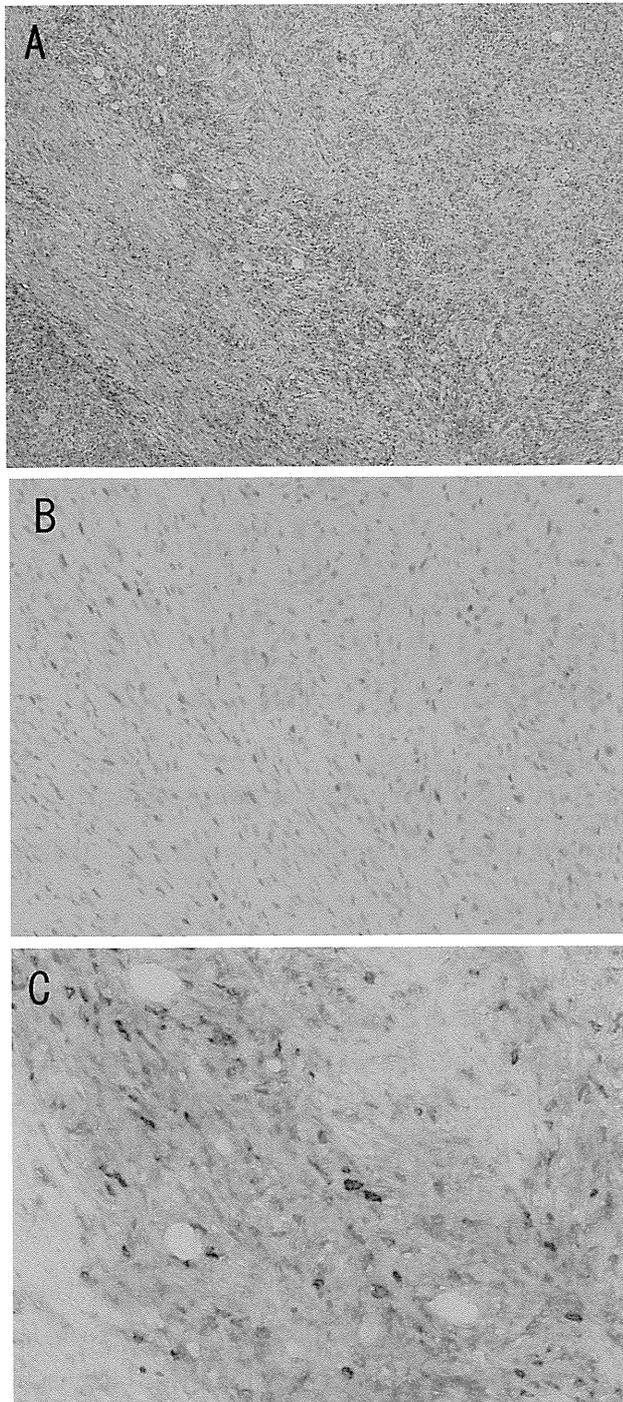


図1 自己免疫性膵炎(症例2)

- A. 小葉構造は破壊され、錯綜増生する線維組織および密なリンパ球・形質細胞浸潤で置換されている。[H&E染色, ×5]
 B. 障害部位にはびまん性に多数の FoxP3 陽性細胞の浸潤を認める。[FoxP3 に対する免疫染色, ×20]
 C. CD4, CD25 の両者に陽性を示す細胞が多数浸潤する。[CD4, CD25 に対する二重免疫染色, ×40]

に1+, 40%が膿瘍部に1+を示した(表2)。FoxP3染色とCD4/CD25二重染色は同様の染色態度を示し、30%の症例で、膿瘍部に多数のTreg(FoxP3スコア: ++, 図3B, CD4+/CD25+スコア: ++, inset)を認めた。肉芽

部は膿瘍部に比べ陽性細胞は少数であった(図3D)。尚, AIP, 皮膚毛巣洞炎共に, Tregの浸潤部位には多数のIgG4陽性細胞を認めた。

D. 考察

制御性T細胞には、いくつかのサブタイプが知られているが、内、CD4+CD25+Foxp3+制御性T細胞が最もよく研究されている⁴⁾。本サブタイプ(以下、Treg)は、IL-10やTGF-β1などのサイトカイン分泌を介しTh1系、Th2系、さらにはTh17系のいずれの免疫反応をも抑制的に作用するとされる⁸⁾。また、Tregの作用の一つとしてB細胞をIgG4産生形質細胞に分化させるという。本研究では、AIP全例および皮膚毛巣洞炎の膿瘍部で多数のTreg浸潤を認め、同部にIgG4陽性細胞が多数認められたことから、Tregの出現はIgG4関連疾患に特異的なものではなく、他のIgG4陽性細胞浸潤を伴う炎症性病変においても出現することが示唆された。詳細な検討には至っていないが、Tregの出現部位にはIgG4陽性細胞浸潤を認めたことから、TregとIgG4の組織出現に関連があると考えられた。

Miyoshiら²⁾はAIPにおいて末梢血でnaive regulatory T cellが減少し、その一方でmemory regulatory T cellが増加していることを報告した。Zenら³⁾はIgG4関連硬化性胆管炎において、Tregが多数浸潤し、Tregより分泌されるサイトカインにより線維化が起こる可能性を指摘した。これらの研究からもAIPでは過剰な免疫応答に対する抑制機構としてTregやひいてはIgG4陽性形質細胞が出現している可能性がある。我々の研究結果は、AIPでは多数のTregが出現することを確認し、また、皮膚毛巣洞炎膿瘍部のような非IgG4関連疾患でも炎症の活動性の高い部位ではTregが多数認められること、一方、炎症が比較的落ち着いた時期といえる肉芽部ではIgG4陽性細胞が多いもののTregが減少していることから、Tregは炎症の活動性の高い時期に非特異的に出現する可能性が示唆された。

IgG4関連疾患では、組織学的にIgG4陽性形質細胞が多数出現することを特徴とするた

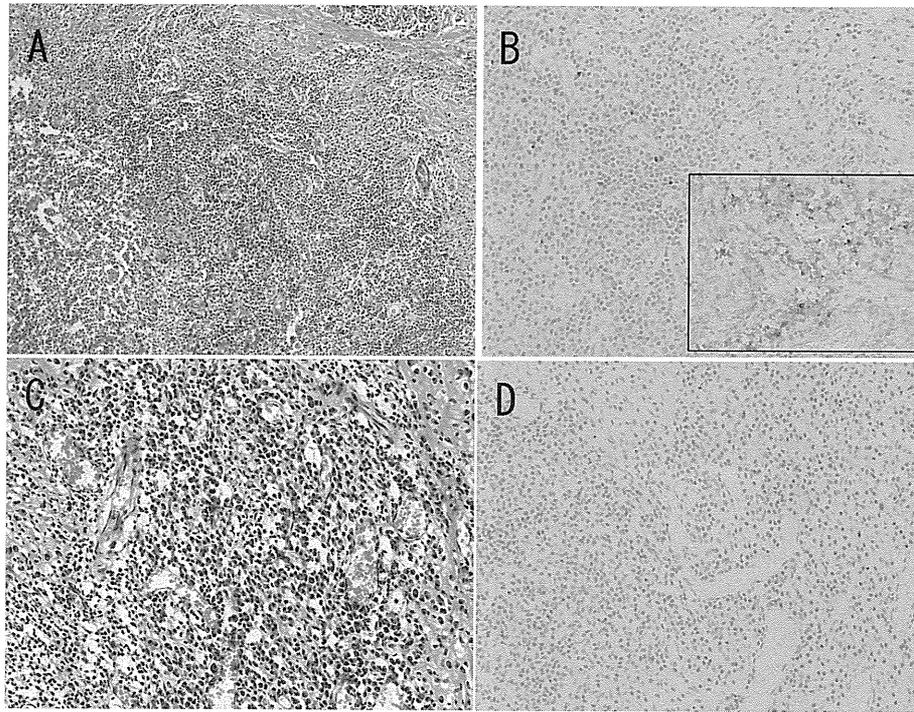


図2 皮膚毛巣洞炎(症例2)

- A. 膿瘍が図の左方にあり，多数の好中球浸潤を認める．形質細胞も同様である．[H&E 染色，×10]
- B. 膿瘍内およびその周囲に多数の FoxP3 陽性細胞を認める．また，CD4，CD25 の両者に陽性を示す細胞も多数見られる(挿入図)．[FoxP3 に対する免疫染色，×20，挿入図；CD4，CD25 に対する二重免疫染色，×40]
- C. 血管の増生，線維芽細胞の軽度の増生を伴う肉芽組織ない線維肉芽組織が見られ，形質細胞が多数浸潤する．[H&E 染色，×10]
- D. 肉芽部には FoxP3 陽性細胞は殆ど認められない．[FoxP3 に対する免疫染色，×20]

め，生検材料での IgG4 陽性形質細胞の出現量はその診断において重視される^{9,10}．実際，大部分の IgG4 関連疾患においては，多数の IgG4 陽性細胞が病理診断に有用であると共に，AIP の活動性の指標になる可能性もある^{11,12}．

しかし，上記結果からも，IgG4 陽性細胞の出現は IgG4 関連疾患に特異的とは言えず，日常の病理診断業務上，より特異的な組織学的マーカーの検出が望まれる．Treg は皮膚毛巣洞炎の膿瘍部では多く認められたが，線維化の加わる肉芽部では少量であったことから，従来の IgG4 染色に加え，線維化という組織所見と Treg 量を併用することが AIP の組織学的検出に有用である可能性が示唆された．

E. 結論

(1)自己免疫性膵炎(type 1 AIP)で組織学的に Treg が多く浸潤することが確認されたが，その出現は，AIP に特異的な現象ではない．(2) AIP と皮膚毛巣洞炎の両疾患において組織切片上での Treg 浸潤と IgG4 陽性形質細胞浸潤

は関連していると考えられた．(3) Treg は炎症反応の活動性の高い時期に組織に多く出現するが，消退期に減少傾向があり，Treg を AIP の診断基準に応用できる可能性が示唆された．

F. 参考文献

1. Kubota K, Kato S, Fujita K, Yoneda M, Takahashi H, Inamori M, Shimamura T, Kirikoshi H, Kobayashi N, Saito S, Hisatomi K, Matsushita N, Nakajima A. Usefulness of endoscopic biopsy using FOXP3 Treg up-regulation in the duodenal papilla in the differential diagnosis between autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; 18: 414-421.
2. Miyoshi H, Uchida K, Taniguchi T, Yazumi S, Matsushita M, Takaoka M, Okazaki K. Circulating naïve and CD4+CD25 high regulatory T cells in patients with autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2008; 36: 133-140.
3. Zen Y, Fujii T, Harada K, Kawano M, Yamada

- K, Tajahira M, Nakanuma Y. Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis. *Hepatology* 2007; 45: 1538-1546.
4. Verhagen J, Blaser K, Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific γ C immunotherapy: T-regulatory cells and more. *Immunol Allergy Clin N Am* 2006; 26: 207-231.
 5. Davage ON. The origin of sacrococcygeal pilonidal sinuss based on an analysis of four hundred sixty-three cases. *Am J Pathol.* 1954; 30: 1191-1204.
 6. 須田耕一, 福村由紀, 高瀬 優, 阿部 寛, 柿沼千早. IgG4陽性形質細胞の出現する病態の検討. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究平成19年度総括・分担研究報告書 2008; 251-256.
 7. Kamisawa T, Funata N, Hayashi Y, et al. Close relationship between autoimmune pancreatitis and multifocal fibrosclerosis. *Gut* 2003; 52: 683-687.
 8. Yang J. Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T cells as a treatment for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2011; 50: 1366-72.
 9. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Yoshino T, Nakamura S, Kawa S, Hamano H, Kamisawa T, Shimosegawa T, Shimatsu A, Nakamura S, Ito T, Notohara K, Sumida T, Tanaka Y, Mimori T, Chiba T, Mishima M, Hibi T, Tsubouchi H, Inui K, Ohara H. Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), *Mod Rheumatol* 2011 [Epub ahead of Print]
 10. Suda K, Takase M, Fukumura Y, Ogura K, Ueda A, Matsuda T, Suzuki F. Histopathologic characteristics of autoimmune pancreatitis based on comparison with chronic pancreatitis. *Pancreas* 2005; 30: 355-358.
 11. Notohara K, Hotta M, Wani Y, Matsuda T. Recurrent type 1 autoimmune pancreatitis. Satellite symposium 1「Pancreatic and hepatobiliary disease 2011」The 57th Fall Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology. 2011 at Tokyo, Japan.
 12. Suda K, Nishimori I, Takase M, Oi I, Ogawa M. Autoimmune pancreatitis can be classified into early and advanced stages. *Pancreas* 2006; 22: 345-350.
- G. 研究発表**
1. 論文発表
 - 1) Amount of CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune pancreatitis and pilonidal sinus. *Pancreas* 2012 [In Press]
 2. 学会発表
 - 1) Abundant infiltration of IgG4-positive plasma cells: autoimmune pancreatitis vs pilonidal sinus. USA and Canadian academy of pathology, 2009 at Boston MA, USA
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)**
1. 特許取得 該当なし
 2. 実用新案登録 該当なし
 3. その他 該当なし

自己免疫性膵炎と膵癌との鑑別における *k-ras* 解析の検討

研究報告者 水野伸匡 愛知県がんセンター中央病院消化器内科部 医長

共同研究者

小倉 健, 原 和生, 脇岡 範, 今岡 大, 山雄健次
(愛知県がんセンター中央病院消化器内科部)

細田和貴, 谷田部恭 (愛知県がんセンター中央病院遺伝子病理診断部)

【研究要旨】

膵癌(PC)と自己免疫性膵炎(AIP)との鑑別に病理診断を目的とした EUS-FNA は有用であるが、膵癌診断における感度は65-95%であり、診断能の向上には補完的手段が必要である。今回、両者の鑑別を目的に PC に高頻度に認められる *k-ras* 変異を EUS-FNA 検体を用いて解析した(PC 307例, AIP 23例)。 *k-ras* の解析は細胞成分の得られなかった1例以外可能であった。 *k-ras* 変異は PC の87%に認め、AIP では1例も認めなかった。 *k-ras* 変異陽性を PC とすると、EUS-FNA の PC に対する感度、特異度、PPV、NPV、正診率は細胞診/組織診併用で87, 100, 100, 37, 88%, *k-ras* 解析単独で87, 100, 100, 19, 89%, 両者併用で93, 100, 100, 51, 93%であり、感度は6%, NPVは14%, 正診率は5%の上乗せが得られた。

A. 研究目的

膵管癌(PC)と他の膵腫瘍、慢性膵炎や自己免疫性膵炎等の炎症性疾患との鑑別が困難なことが少なくない¹⁾。 EUS-FNA は膵癌の病理診断に有用であるが、膵癌診断に対する感度は65-95%であり、診断成績の向上には補完的手段が必要である。 *k-ras* 変異は PC に高頻度で認められる^{2,3)}が、EUS-FNA 検体における有用性については少数例での報告があるのみで十分には検討されていない。本研究では EUS-FNA 検体における *k-ras* 解析の PC 診断における有用性を検討する。

B. 研究方法

2004年3月から2009年9月までに膵腫瘤性病変に対して EUS-FNA が施行されかつ *k-ras* 解析を行った連続する393例のうち、PC 307例、AIP 23例を対象とした。 *k-ras* 変異の有無は direct sequence 法あるいは cycleavePCR 法を用い、PC に対する診断能を retrospective に検討した。

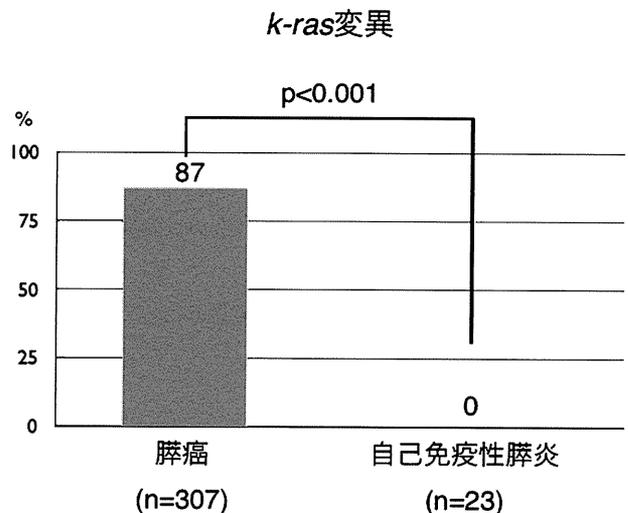
(倫理面への配慮)

k-ras 解析に関しては、愛知県がんセン

ター・ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会にて承認(受付番号:19-10)を得、患者本人から文書にて同意を得た症例に対して行った。その他の患者の資料を使用する場合は、愛知県がんセンター中央病院の検査・治療同意書で研究のために資料などを使用することに既に同意されている患者に限り使用した。

C. 研究結果

k-ras の解析は細胞成分の得られなかった1



膵癌と自己免疫性膵炎における *k-ras* 変異

例を除き解析可能であった。 *k-ras* 変異は PC の87% (266/307) に認め、 AIP では23例中1例も認めなかった。 *k-ras* 変異陽性を PC と仮定すると、 EUS-FNA の PC に対する感度、特異度、 PPV, NPV, 正診率は細胞診/組織診併用で87, 100, 100, 37, 88%, *k-ras* 解析単独で87, 100, 100, 19, 89%, 両者併用で93, 100, 100, 51, 93%であり、感度は6%, NPV は14%, 正診率は5%の上乗せが得られた。

D. 考察

膵癌においては *k-ras* の他、 *p53*, *p16*, *DPC4* などの変異が報告されている⁴⁻⁶⁾が、その中で *k-ras* 変異の陽性率が75-90%と最も高く、 EUS-FNA 検体を用いた *k-ras* 解析が膵癌と他の膵腫瘍性疾患との鑑別に最も有用であると考えられている。これまでの研究では、 EUS-FNA 検体を用いた *k-ras* 変異陽性率は63-83%であり⁷⁻¹³⁾、本研究の87%はいままでどの研究よりも高頻度に認めた。その理由としては、1)我々の検討では過去の検討に比較して膵癌細胞の採取量が多かったこと、2)これまでの報告では *k-ras* 変異検討を direct sequence 法にて行っているが、今回我々はより鋭敏である cyclevePCR 法¹⁴⁾を付加したことの二つの可能性がある。

AIP 症例における *k-ras* 変異を本研究では一例も認めなかったが、過去の EUS-FNA 検体を用いた検討では27例中1例のみに認めている。しかしその症例では pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) 病変を含んでいたと報告されている。一方、Kamisawa ら¹⁵⁾は AIP 8例(膵切除6, 術中生検1, 剖検1)を対象に *k-ras* 変異を検討し全例で変異陽性であったと報告している。しかし全8例に PanIN 病変が含まれており、本研究との相違点と考えられる。

E. 結論

膵腫瘍性病変に対する EUS-FNA 検体を用いた *k-ras* 解析は、膵癌と自己免疫性膵炎との鑑別に有用である。

F. 参考文献

1. Mizuno N, Hara K, Hijioka S, Bhatia V, Shimizu Y, Yatabe Y, Yamao K. Current concept of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for pancreatic cancer. *Pancreatology* 2011; 11 Suppl 2: 40-6.
2. Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, Real FX, Perucho M. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1994; 58: 185-91.
3. Tada M, Omata M, Ohto M. Clinical application of ras gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1991; 100: 233-8.
4. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1731-4.
5. Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 326-31.
6. Koorstra JB, Hustinx SR, Offerhaus GJ, Maitra A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology* 2008; 8: 110-25.
7. Tada M, Komatsu Y, Kawabe T, Sasahira N, Isayama H, Toda N, Shiratori Y, Omata M. Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2263-70.
8. Pellise M, Castells A, Gines A, Sole M, Mora J, Castellvi-Bel S, Rodriguez-Moranta F, Fernandez-Esparrach G, Llach J, Bordas JM, Navarro S, Pique JM. Clinical usefulness of KRAS mutational analysis in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by means of endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1299-307.
9. Zheng M, Liu LX, Zhu AL, Qi SY, Jiang HC,

- Xiao ZY. K-ras gene mutation in the diagnosis of ultrasound guided fine-needle biopsy of pancreatic masses. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 188-91.
10. Takahashi K, Yamao K, Okubo K, Sawaki A, Mizuno N, Ashida R, Koshikawa T, Ueyama Y, Kasugai K, Hase S, Kakumu S. Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA. *Gastrointestinal endoscopy* 2005; 61: 76-9.
 11. Khalid A, Nodit L, Zahid M, Bauer K, Brody D, Finkelstein SD, McGrath KM. Endoscopic ultrasound fine needle aspirate DNA analysis to differentiate malignant and benign pancreatic masses. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2493-500.
 12. Maluf-Filho F, Kumar A, Gerhardt R, Kubrusly M, Sakai P, Hondo F, Matuguma SE, Artifon E, Monteiro da Cunha JE, Cesar Machado MC, Ishioka S, Forero E. Kras mutation analysis of fine needle aspirate under EUS guidance facilitates risk stratification of patients with pancreatic mass. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 906-10.
 13. Bournet B, Souque A, Senesse P, Assenat E, Barthet M, Lesavre N, Aubert A, O'Toole D, Hammel P, Levy P, Ruzniewski P, Bouisson M, Escourrou J, Cordelier P, Buscail L. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with KRAS mutation assay to distinguish pancreatic cancer from pseudotumoral chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2009; 41: 552-7.
 14. Yatabe Y, Hida T, Horio Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. A rapid, sensitive assay to detect EGFR mutation in small biopsy specimens from lung cancer. *J Mol Diagn* 2006; 8: 335-41.
 15. Kamisawa T, Tsuruta K, Okamoto A, Horiguchi S, Hayashi Y, Yun X, Yamaguchi T, Sasaki T. Frequent and significant K-ras mutation in the pancreas, the bile duct, and the gallbladder in autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2009; 38: 890-5.
- G. 研究発表**
1. 論文発表 該当なし
 2. 学会発表
 - 1) 小倉 健, 原 和生, 水野伸匡, 澤木明, 肱岡 範, 山雄健次. 腫瘍性病変における EUS-FNA 検体での KRAS 解析の臨床的有用性. パネルディスカッション1 「膵疾患の遺伝的背景を探る」. 第42回日本膵臓学会大会, 弘前, 2011年7月.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)**
1. 特許取得 該当なし
 2. 実用新案登録 該当なし
 3. その他 該当なし

自己免疫性膵炎患者における膵石形成危険因子の検討

研究報告者 川 茂幸 信州大学総合健康安全センター 教授

共同研究者

丸山真弘, 新倉則和, 尾崎弥生, 渡邊貴之, 伊藤哲也, 浜野英明, 村木 崇
(信州大学消化器内科)

【研究要旨】

自己免疫性膵炎はステロイド治療に良好に反応するが、一部再燃を繰り返し、膵石形成にいたる症例が存在する。本研究では自己免疫膵炎で膵石形成の危険因子を検討した。3年以上経過観察された自己免疫性膵炎69例を対象とした。経過中、膵石増悪例と膵石出現例は28例で、これらを膵石形成例とし、膵石の出現がなかった32例を膵石非形成例として、両者について、臨床所見、血液検査所見、CT所見、ERCP所見を比較検討した。単変量解析では膵頭部腫大と膵頭部における Wirsung's duct と Santorini's duct 両者の狭窄が有意に膵石形成例で多く、多変量解析では膵頭部における Wirsung's duct と Santorini's duct 両者の狭窄が膵石形成の有意な独立した危険因子であった。これらの危険因子に対して、十分なステロイド治療施行などにより発生を阻止することが可能になれば、膵石ならびにその後の機能障害の進展を予防可能と考えられる。

A. 研究目的

自己免疫性膵炎は高齢者、男性に好発し、膵腫大、膵管の不整狭細像を呈する特異な膵炎である。血清 IgG4 の上昇が特徴的で、自己免疫学的機序が背景に存在すると考えられる¹⁻⁵⁾。しかし、その病態・長期経過の詳細については充分には解明されていない。

自己免疫性膵炎は一般的にはステロイド治療に良好に反応し、血液所見、膵機能、画像所見が改善する。しかし、一部膵石を形成する症例が存在し、これらは再燃例に多く認められる^{6,7)}。従って、自己免疫性膵炎はステロイド治療により、もしくは自然経過により、全てが機能的、形態的に正常な状態に復して後遺的变化を認めないということはなく、一部、通常の慢性膵炎と同様に再燃を繰り返し、膵石形成、機能障害に至る例も認められる。実際、慢性膵炎の IgG4 値を測定すると、約7%の症例で上昇を認め、これらは進行期の自己免疫性膵炎の可能性が考えられる⁸⁾。

自己免疫性膵炎で、膵石形成の機序もしくは危険因子として、①膵組織の高度の炎症・壊死、②膵管系の狭窄・膵液のうっ滞、などが考えら

れる。本研究ではいずれの機序が関連しているか、検討した。

B. 研究方法

1) 対象：信州大学医学部附属病院にて3年以上経過観察された自己免疫性膵炎69例(男54例, 女15例, 年齢中央値64歳)を対象とした。観察期間中央値は91ヶ月で、範囲は36~230ヶ月である。

2) 検討項目

臨床所見：観察期間、年齢、性、アルコール消費、ステロイド治療歴、再燃の有無を検討した。
血液検査：自己免疫性膵炎の活動性マーカーとして IgG, IgG4, C3, C4, 可溶性 IL2 receptor (sIL2-R), 免疫複合体 (CIC) を、膵炎マーカーとしてアミラーゼを検討した。

3) 膵石の評価

CTにより膵石の部位(頭部, 体部, 尾部)、膵管内か実質か、大きさ、数を評価した。

4) 膵管の評価

ERCPにて狭窄の部位(頭部, 体部, 尾部)、頭部の狭窄については Wirsung's duct と Santorini's duct の狭窄について評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、信州大学医学部倫理委員会の承認を受けた(承認番号 1805)。

C. 研究結果

1) 膵石形成

診断時に69例中17例で膵石を認め、そのうち8例で数が増え、大きさが増大した。残り52例中20例で経過中に新たに膵石が出現した。膵石増悪例8例と新規出現例20例を合わせた28例を膵石形成例とした。32例は経過中膵石の出現を認めず、膵石非形成例とした。

膵石形成例で形成部位に差を認めなかった。膵管内結石が膵実質結石に比較して多い傾向を認めたが、有意差はなかった。

2) 膵石形成と臨床所見、検査所見との関連について

膵石形成群と非形成群で観察期間、年齢、性、アルコール消費、ステロイド治療で差を認めなかった。再燃は形成例が多かったが、有意差は認めなかった($p=0.093$)。

膵石形成群と非形成群で種々の活動性マーカー、IgG、IgG4、C3、C4、sIL2-R、CICの値に有意差を認めなかった。

3) 膵石形成と膵腫大との関連について

膵石形成群と非形成群で、限局性腫大とび慢性腫大の比率に差を認めなかった。しかし膵石形成群で膵頭部腫大を有意に多く認めた($p=0.006$)。

4) 膵石形成と膵管狭窄との関連について

膵石形成群と非形成群で、限局性狭窄とび慢性狭窄の比率に差を認めず、膵管狭窄の部位でも有意差は認めなかった。しかしながら、膵頭部の Wirsung's duct と Santorini's duct 両者の狭窄例は膵石形成群で有意に多く認めた($p=0.010$)。

5) 多変量解析による検討

P値が0.2以下の因子について多変量解析を行ったが性、再燃、sIL2-R、膵頭部腫大、膵頭部の Wirsung's duct と Santorini's duct 両者の狭窄のうち、膵頭部の Wirsung's duct と Santorini's duct 両者の狭窄が膵石形成の独立した危険因子であった(odds ratio 4.4, 95%

confidence interval 1.3-15.5, $P=0.019$)。

6) 膵石形成とステロイド治療後の膵腫大、膵管狭窄との関連について

膵石形成群と非形成群でステロイド治療4週間後の膵腫大について検討すると、膵頭部腫大が膵石形成例で多く認めたが有意差を認めなかった($p=0.069$)。さらに膵石形成群で、膵頭部の Wirsung's duct と Santorini's duct 両者の狭窄を多く認めたが、同様に有意差を認めなかった($p=0.089$)。

D. 考察

今回の検討から自己免疫性膵炎における膵石形成は、各種活動性マーカーやアミラーゼとの相関を認めず、膵実質の炎症・壊死が関与しているとは考えられなかった。実際、本症はステロイドに良好に反応することから膵実質に膵石形成をきたすほどの炎症・壊死が生じているとは考えにくい。

単変量解析では膵頭部腫大と膵頭部の Wirsung's duct と Santorini's duct 両者の狭窄が膵石形成の有意な危険因子であり、これらはお互いに深く関係した病態である。多変量解析では膵頭部の Wirsung's duct と Santorini's duct 両者の狭窄が膵石形成の独立した危険因子であった。さらにステロイド治療4週間の時点でも有意差はなかったが、これらは膵石形成例に多く認められた。従って、膵管狭窄による膵液うっ滞が膵石形成の危険因子と考えられる。膵管の不完全狭窄が膵石形成をきたすことは、フーター乳頭癌⁹⁾、IPMN¹⁰⁾などで報告があり、また犬を用いた実験で証明されている^{11,12)}。

ステロイド治療後の膵管系の遺残狭窄が膵石形成の危険因子と考えられ、これらに対する十分なステロイド治療施行など、有効な処置が自己免疫性膵炎の長期予後を改善すると考えられる。

E. 結論

膵頭部における Wirsung's duct と Santorini's duct 両者の狭窄が自己免疫性膵炎における膵石形成の有意な危険因子であった。これらの危険因子に対して、十分なステロイド治療