

がって、ステロイドの効果から見ても多変量7因子モデルによる診断は有用であることが示唆される。

D. 考 察

急性発症型 AIH の一部は重症化したり、劇症化する可能性があり、早期に診断してステロイド剤の投与を開始する必要がある。急性発症型 AIH は IAIHG のスコアリングシステムでは診断されない例が多く、特に簡易版では半数以上が診断されない。それに対して、多変量3因子モデルでは90%、7因子モデルでは100%が AIH と診断されることが示された。

多変量モデルはウイルス肝炎、薬物性肝障害、アルコール性肝障害、胆石などを除外した後に適用されるが、薬物性肝障害以外は問診、ウイルスマーカー検査で除外診断は容易である。今回は AIH 以外の急性肝炎における陽性率を検討していないので、特異度について言及することはできないが、急性肝炎で AIH が疑われる場合には、多変量3因子モデルを検討することが有用と考えられる。

AIH-PBC overlap 症例は2つの疾患が同じ患者で発症したものと考えられるが、実際には AIH および PBC の診断の正診率は肝組織所見を含めても100%ではないため、実際には PBC であるにもかかわらず肝細胞障害が強い例、逆に AIH であるにもかかわらず胆管障害が強い例がオーバーラップととらえられている可能性を否定できない。今回の検討では、肝生検所見を含めた臨床診断で AIH-PBC overlap と診断された症例が、多変量7因子モデルを適用すると、AIH あ

るいは PBC のいずれかに分類されることが示された。多変量7因子モデルで AIH と診断された症例がその後の経過観察で、PBC の特徴が失われ AIH であることが確認されるか、また同様に、PBC と診断された症例が AIH の特徴が失われ PBC であることが確認されるかどうかは今後の課題である。もしそれが確認されれば AIH-PBC overlap 症例は極めてまれな例としてしか認められないということになる可能性がある。

E. 結 論

急性発症型 AIH は多変量3因子モデルまたは7因子モデルによりほぼ100%診断が可能であった。AIH-PBC overlap 症例は多変量7因子モデルでは AIH または PBC のいずれかに分類された。

F. 健康危険情報

特になし

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

表2. AIH-PBC overlap 症例

Case No	PSL 治療	AMA	IAIHG スコアによる治療前判定	IAIHG スコアによる治療後判定	IAIHG 簡易版スコアによる判定	多変量7因子モデルによるAIH 確率	多変量7因子モデルによるPBC 確率
1	なし	+	Undetermined	Undetermined	Undermined	<0.0001	1
2	著効	+	Probable	Probable	Definite	0.02	0.97
3	著効	+	Undetermined	Undetermined	Definite	0.92	0.45
4	著効	+	Probable	Definite	Definite	1	0
5	なし	+	Definite	Probable	Definite	0.01	0.87
6	著効	-	Definite	Definite	Undermined	1	0
7	著効	+	Probable	Definite	Probable	1	0
8	なし	+	Undetermined	Undetermined	Undermined	0	0.98
9	効果小	+	Probable	Probable	Definite	<0.0001	1
10	なし	+	Undetermined	Undetermined	Undermined	1	0.08
11	著効	+	Probable	Definite	Undermined	0.93	0.1
12	著効	+	Undetermined	Undetermined	Undermined	0.01	0.99

自己免疫性肝炎の病態と予後の解明

研究協力者 日比 紀文 慶應義塾大学医学部 消化器内科 教授

研究要旨：自己免疫性肝炎（AIH）の原因や病態を解明するために、今まで臨床面と基礎研究面からアプローチしてきた。予後不良と考えられている急性発症型 AIH では、亜急性に経過することから、診断時に線維化マーカーが既に高値になっている可能性があり、さらに脳症発症例では予後不良であることが示唆された。CCR9 knockout mice を用いた研究では、CCR9陽性マクロファージが ConA 投与モデルに限らず、CCI4投与の急性肝障害・慢性肝障害モデルでも重要な役割を担っていることから、これらのマクロファージの活性化を抑制することが肝炎のコントロールに重要と考えられた。

共同研究者

海老沼浩利	中本 伸宏
褚 柏松	山岸 由幸
碓井 真吾	石橋 由佳
若山 遊子	谷木 信仁
金井 隆典	斎藤 英胤

A. 研究目的

本年も自己免疫性肝炎（autoimmune hepatitis; AIH）の病態を解明すべく、臨床面から AIH 患者の診断と治療成績について、及び基礎研究面からマウスを用いた自然免疫・獲得免疫の研究について行ってきた。

とりわけ本年は、急性発症型 AIH ではその早期診断が困難で、そのことが治療成績の悪化に繋がっていることから ①ウイルス性急性肝炎と簡単に鑑別できるマーカーはないか ②これらの急性発症型 AIH の治療反応性すなわち予後を決める因子は何か という2点に着目して解析を進めた。

また、基礎研究面では、以前から進めてきた自己免疫応答性急性肝障害モデルにおける CCR9陽性マクロファージによる炎症惹起が、他の肝障害モデルでも同様の所見で起こるのかについて検討を進めた。

最終的に、これらの基礎研究での裏付けが臨床面に応用できればと考えている。

B. 研究方法

(a)急性発症型 AIH 患者の臨床経過の解析

当院は生体・脳死肝移植登録施設であることから急性肝不全に至った、もしくはそのリスクがある急性発症型 AIH 症例が多い。そこで、2000年から2011年に経験した急性発症型 AIH（慢性型の急性増悪を除く）23例を急性ウイルス性肝炎80例とその患者背景・臨床経過に付き比較検討した（対象は昨年度と同様）。この中から、急性発症型 AIH を診断するのに有用な因子を統計学的手法により解析した。また、同様に転帰（内科学的治療により生存していたか、肝移植もしくは死亡となったか）を予測できる因子につき解析した。

(b)CCI4投与マウスにおける CCR9 陽性マクロファージの役割

6-8 週齢の雄性 C57BL/6マウスを用い、CCI4の腹腔内投与により急性肝障害を惹起し、olive oil 投与群（コントロール群）と比較検討した。単核球を肝臓及び脾臓分離後 CD11b+CD11c-macrophage, CD11b-CD11c+plasmacytoid DC (pDC), CD11b+CD11c+classical DC (cDC) の形態、頻度、表現型、サイトカイン産生能を検討した。さらに、CCI4の腹腔内投与を週3回6週間投与する慢性肝障害モデルにおいても同様の検討を行い、肝線維化の進展を検討した。

これらの急性肝障害モデル及び慢性肝障害モデルはそれぞれ CCR9 knock out mice を用いて同様の実験を行い、CCR9陽性マクロファージの関与を検討した。

C. 研究結果

(a)急性発症型 AIH 患者の臨床経過の解析

①急性発症型 AIH とウイルス性急性肝炎の鑑別

前年も報告したとおり、急性発症型 AIH では、自覚症状出現から入院までの期間が長く（亜急性）、入院時の AST/ALT 値はウイルス性と比較して低値にも関わらず、TB 値は高値で、ALB 値は低値であった。また、肝萎縮・地図上パターンがウイルス性より高頻度にみられた。これらの、入院までの期間、画像所見に代わる血液学的検査所見を検討したところ、有意差はないものの IV 型コラーゲン7S 値が急性発症型 AIH では高く (p=0.1640)、また PT-INR 値 /AST 値が有意に高かった (p=0.0058)。(図1)

②急性発症型 AIH の予後規定因子

急性発症型 AIH ではウイルス性と比較して、亜急性症例が多いことから予後が悪いことが一般的に言われているが、診断時の脳症あり (p=0.0001)、血清 ALB 値 (p=0.0379)、PT-INR 値 (p=0.0051)、画像上肝萎縮あり (p=0.0499) が予後不良の（移植もしくは死亡）予測因子であった。多変量解析では脳症ありが有意な予後規定因子となった。（現在論文投稿準備中）。

(b) CCl4投与マウスにおける CCR9 陽性マクロファージの役割

今までの ConA 投与モデルでの解析から、CCR9+ plasmacytoid DC は定常状態において肝臓内に豊富に存在し免疫寛容に関与している一方で、CCR9+ macrophage は Con A 投与後に CCL25の発現上昇に伴い肝内に遊走し、免疫応答を惹起することが判明した。さらに、CCR9 knockout mouse では、Con A 投与後の肝障害の軽減が観察された(文献1)。

そこで、今回は他の肝障害惹起性モデルにおいても同様の所見が得られるかどうかを CCL4投与モデルにおいて検討した。

CCl4単回投与の急性肝障害モデルでは、ConA 投与の際と同様、CCL4投与後 CCR9+macrophage の増加とともに ALT 値が増加し、これらの現象は CCR9 knockout mouse では有意に軽減された。引き続き、CCL4を週3回計6週間投与する慢性肝障害モデルを行い、肝線維化の進展に関与するかどうかを検討した。急性肝障害の場合と同様に、CCR9+macrophage の増加がみられ、CCR9 knockout mouse では有意に線維化が抑制された。このことから、CCR9+ macrophage は肝線維化にも関与することが示唆された。(Chu P-S, et al. Hepatology, in press)

D. 考 察

AIH はまだその疾患概念が明確にされていない慢性の肝疾患である。その理由として、原因から発症までの機序が全く解明されていないことにある。そこで、我々は臨床面と基礎研究面の両者からアプローチし、その病態を解明することを目標にしてきた。臨床面では特に急性発症型 AIH に着目している。急性発症型 AIH は抗核抗体陽性や血清 IgG 値高値といった通常の AIH に特徴的な所見を認めないが故に、早期に診断が困難で重症化ないしはステロイド抵抗性になると考えられる。実際、PT-INR 値1.5以上の急性肝不全もしくは劇症肝炎に移行した症例では、肝移植が必要になる等予後不良の転帰をとるケースが多いとされている。

そこで、前年と同様当院で経験した急性発症型 AIH 症例をウイルス性急性肝炎症例と比較した。今回は急性発症型 AIH 症例を早期に診断するマーカーを検索することを目的としたが、やはり亜急性の経過、肝萎縮や地図状パターンと言った画像所見が鑑別可能な因子として上がってきた。血液検査所見では有意差は認めないものの急性発症型 AIH 症例で血清 IV 型コラーゲン7S 値が高値で、AST/ALT 値があまり高値でないにもかかわらず肝線維化の進行がみられていることが重要な所見であると考えている。さらに、ウイルス性の肝不全進行例では血清 IL-10値が増加するにも関わらず、急性発症型 AIH 症例では血清 IL-10 値の増加がみられないことから、免疫寛容の破綻がおきている可能性が示唆された。

次に、これらの急性発症型 AIH 症例の予後不良に関わる因子を検討したところ、脳症の存在が有意な予

後不良因子としてあげられた。すなわち、脳症が出現するまで診断ができないで放置した症例で予後不良の転帰をとることが示唆され、早期診断の重要性をあらためて感じさせられた。

一方で、CCl4投与肝障害モデルでは、ConA 投与モデルと同様、急性肝障害の病態形成に CCR9 陽性マクロファージが関与していることが示唆されたが、慢性肝障害に至っても CCR9 陽性マクロファージが重要な役割を担っていた。CCR9 knockout mouse では CCl4投与による肝線維化が抑制され、この肝線維化に直接的ならびに間接的に CCR9 陽性マクロファージが関わっていることは注目すべき所見と考えられる(Chu P-S, et al. Hepatology, in press)。

さらに、現在 ConA 連続投与モデルにおいて、免疫寛容が誘導されるモデルの研究を行っているが、この場合 CCR9 陽性マクロファージではなく、IL-10産生 CCR2陽性マクロファージの関与が示唆された。

E. 結 論

我々は、AIH は、その病態を免疫寛容の破綻と考えている。急性発症型 AIH では、免疫寛容が誘導されないが故に、亜急性の経過や予後不良の転帰をとると考えると、早急に過剰な免疫応答を抑制する必要があると考えている。この免疫応答を惹起するものとしては、マウスでは CCR9陽性マクロファージが担っていると考えているが、免疫寛容については IL-10産生マクロファージや制御性 T 細胞が関与していると考え、引き続き研究を進めていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakamoto N, Ebinuma H, Kanai T, Chu PS, Ono Y, Mikami Y, Ojiro K, Lipp M, Love PE, Saito H, Hibi T. CCR9+ Macrophages are Required for Acute Liver Inflammation in Mouse Models of Hepatitis. Gastroenterology 2012; 142: 366-376

2. 学会発表

- 1) 非ウイルス性急性肝不全の早期診断と治療介入-原因究明より早期治療. 海老沼浩利, 山岸由幸, 中本伸宏, 谷木信仁, 若山遊子, 石橋由佳, 碓井真吾, 楮柏松, 金井隆典, 齋藤英胤, 日比紀文. 第38回日本急性肝不全研究会 2012年6月, 金沢
- 2) 慶応大学関連施設における自己免疫性肝炎データ集積. 高橋正彦, 海老沼浩利, 塚田信廣, 岡村幸重, 西田次郎, 永田博司, 吉田英雄, 金子文彦, 稲垣恭孝, 金子光太郎, 日比紀文. 第48回日本肝臓学会総会 2012年6月, 金沢
- 3) Concanavalin A 複数回投与により誘導された肝臓免疫寛容状態における IL-10産生性マクロファージの関与. 中本伸宏, 海老沼浩利, 金井隆

典, 楮柏松, 碓井真吾, 三上洋平, 山岸由幸, 齋藤英胤, 日比紀文. 第49回日本消化器免疫学会総会 2012年7月, 鹿児島

4) 287. 急性発症型自己免疫性肝炎の早期診断と治療介入. 海老沼浩利, 齋藤英胤, 日比紀文. パネルディスカッション3「自己免疫性肝炎-重症・難治例の現状と対処法」第16回日本肝臓学会大会 (JDDW 2012) 2012年10月, 神戸 (肝臓 2012; 53 Suppl2: A80)

5) 294. Concanavalin A 複数回投与による肝臓免疫寛容誘導の検討. 中本伸弘, 海老沼浩利, 金井隆典, 楮柏松, 碓井真吾, 三上洋平, 山岸由幸, 齋藤英胤, 日比紀文. 第16回日本肝臓学会大会 (JDDW 2012) 2012年10月, 神戸 (肝臓 2012; 53 Suppl2: A761)

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

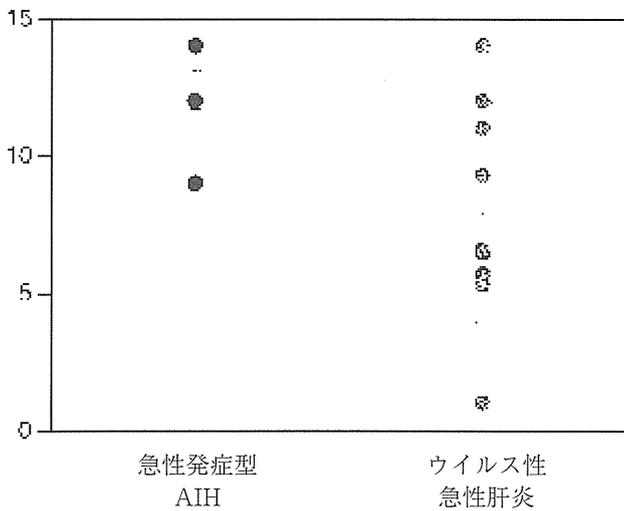


図1 診断時 IV 型コラーゲン7S 値 (p=0.1640)

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

自己免疫性肝炎の肝細胞傷害における MHC クラス II 分子の関与

研究協力者 青柳 豊 新潟大学大学院医歯学総合研究科 消化器内科 教授

研究要旨: 自己免疫性肝炎 (AIH) における抗 HLA 抗体に着目したこれまでの研究により, AIH 発症時の血清中には原発性胆汁性肝硬変や健常人よりも抗 HLA 抗体が有意に高率に検出されることを明らかにした。今年度の研究では, Luminex 法 (Single Antigen) により抗 HLA class II 抗体の allele 特異性を検討するとともに, 末梢血を用いた DNA typing により自己の HLA class II allele を確認することにより, DNA typing を施行した 9 例中 4 例で自己の HLA class II allele に対する抗 HLA class II 抗体の存在が確認された。自己の HLA class II に対する抗体が陽性の AIH 症例は, 抗体陰性例と比較して有意に transaminase が高値であった。また, AIH 肝組織においては interface hepatitis 周囲を中心に肝細胞に HLA class II 分子の発現を認め, 不活化肝細胞を用いた *in vitro* の検討により IFN- γ によって肝細胞表面に HLA class II 分子が誘導されることを確認した。以上より, 自己の HLA class II 分子に対する抗体の出現が, AIH における肝細胞傷害の進展・増悪に関与している可能性があると考えられた。

共同研究者

山際 訓 新潟大学大学院 消化器内科学 助教

A. 研究目的

原疾患が自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis; AIH) 以外で肝移植に至った症例に AIH 類似の病態が生じることがあり, 組織学的, 血清学的に AIH に類似するため *de novo* AIH と呼称されるものの, 非自己であるグラフト肝に起こる現象であるため, 自己免疫機序ではなく拒絶反応であるとする考え方が主流になりつつある。また, 骨髄移植後の移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) でも肝に AIH 類似の病態を生じることが報告されている。そのような臓器移植後の拒絶反応には HLA に対する抗体の関与が示唆されているものの, AIH における自己 HLA に対する免疫応答に関する検討は行われておらず, これまでに AIH における抗 HLA 抗体に着目して研究を継続している。今年度は, AIH 発症時に高率に検出される抗 HLA 抗体の AIH 病態への関与を明らかにすることを研究目的とした。

B. 研究方法

2003年1月から2012年12月までに新潟大学医歯学総合病院, 当科関連病院および順天堂大学静岡病院にて診断および治療され, かつインフォームドコンセントが得られて発症時に保存されている血清が使用可能であった, いずれも女性の AIH 35例, 原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis; PBC) 30例, 肝疾患および自己免疫性疾患の無い Control 30例を対象とし, 保存血清 (-20°C) を用いて Luminex 法 (LABScreen Mixed) により抗 HLA class I および class II 抗体の有無を測定した。抗 HLA class II 抗体陽性例について, Luminex 法 (LABScreen Single Antigen) により allele 特異性を確認するとともに, 末梢血を用いた HLA DNA typing により自己の allele を確認した。HLA DNA typing 施行に際しては, 新

潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会で承認された研究計画 (承認番号500) にしたがって, 被験者各人に遺伝子研究に関する説明文を用いて書面と口頭で説明し, 文書による同意を得た後に採取され連結可能匿名化された検体を使用した。

また, 肝組織を用いて HLA class II 発現を免疫組織染色により検討し, 不活化肝細胞 (HPT-1, 千葉大学・消化器内科 神田達郎博士よりご供与) を用いて肝細胞における HLA class II 発現誘導についても *in vitro* で検討した。

C. 研究結果

(1) 症例の背景

平均年齢は AIH 58.3 ± 15.2 歳, PBC 55.8 ± 12.6 歳, Control 57.5 ± 19.2 歳であった。AIH の ALT 値 (Mean \pm SD) は 369.7 ± 406.0 IU/l (range, 39-1852), 総ビリルビン値は 6.7 ± 7.9 mg/dl (0.8-27.3), プロトロンビン時間 (PT) INR は 1.33 ± 0.51 (0.90-2.72), IgG 値は 2719.7 ± 1322.2 mg/dl (794-1852) であった。

(2) 抗 HLA 抗体検査と DNA typing

1つの蛍光ビーズに1種類の精製 HLA 抗原がコートされている Single Antigen kit を用いた Luminex 法による allele 特異性の検討により, AIH における抗 HLA class II 抗体陽性例には多数の allele に対する抗 HLA class II 抗体が検出される症例が認められ, HLA DNA typing を施行出来た AIH 9 例中 4 例に自己の HLA class II allele に対する抗体が存在していることが確認された (表1)。

抗 HLA class II 抗体陽性の AIH 症例の中で, DNA typing により自己の HLA class II allele に対する抗体が陽性であることが確認された 4 例は, 自己の HLA に対する抗体が陰性であった 5 例や抗 HLA 抗体が陰性の症例と比較して, 有意に発症時の transaminase が高値であり, 総ビリルビン値も高値の傾向を認めるなど, 重症例が多いと考えられた (表2)。

表1. DNA typing と Luminex 法による HLA class II 分子の allele 特異性

Age	Sex	DNA typing						Luminex
		DRB1		DQB1		DPB1		Allele Specificity
31	F	04:03	15:01	03:03:02	06:02:01			DRB1 04:03
54	F	04:05	06:03:02	03:02:01	06:01:01	02:02	05:01	DRB1 09:01, DRB1 04:03, DPB1 02:02, DRB1 04:05
66	F	08:03:02	15:02:01	06:01:01		02:01:02	05:01	DRB1 01:01, DRB1 04:03, DRB1 15:02, DPB1 02:01
82	F	04:05	05:03	04:01	05:01	02:01	04:02	DRB1 05:03, DPB1 02:01, DPB1 04:02, DRB1 04:05
53	F	04:05	05:02	04:01:01	04:02	05:01		DRB1 10:01, DQB1 06:01, DPB1 03:01
59	F	04:05	08:02	04:01:01	04:02	04:02	05:01	DRB1 01:03, DRB1 01:01, DRB1 10:01
67	F	12:02:01	12:10	03:01:01		05:01		DRB1 09:02
67	F	04:05	08:03	04:01	06:01	02:01	09:01	DRB1 04:03
72	F	04:06	12:02:01	03:01:01	03:02:01			DPB1 01:01, DPB1 20:01

表2. 自己の HLA class II allele に対する抗体陽性例と陰性例との比較

	Anti-self HLA 抗体陽性	Anti-self HLA 抗体陰性	HLA抗体陰性
n	4	5	8
Age (years)	58.3 ± 21.5 (31-82)	63.6 ± 7.5 (53-72)	52.4 ± 17.3 (24-72)
Alb (g/dl)	3.2 ± 0.9 (2.4-4.2)	3.5 ± 0.9 (2.1-4.6)	3.7 ± 0.4 (2.8-4.1)
IgG (mg/dl)	2271.8 ± 787.2 (1571-3381)	2381.4 ± 584.3 (1873-3343)	2809.4 ± 2078.9 (794-6578)
AST (IU/l)	829.5 ± 635.2*, ** (231-1728)	215.8 ± 218.7 (36-587)	157.3 ± 84.0 (37-272)
ALT (IU/l)	1054.8 ± 671.8*, ** (208-1852)	271.4 ± 408.5 (46-998)	211.3 ± 149.5 (50-439)
T Bil (mg/dl)	11.1 ± 6.3 (3.8-18.8)	4.3 ± 6.7 (0.8-16.3)	6.1 ± 7.9 (0.5-21.5)
PT INR	1.65 ± 0.75 (1.00-2.72)	1.13 ± 0.19 (0.99-1.41)	1.39 ± 0.55 (0.95-2.40)
ANA positivity	75.0% (3/4cases)	80.0% (4/5cases)	100% (8/8cases)

*p < 0.05 (compared to HLA negative), **p < 0.05 (compared to self-HLA negative)

(3)肝細胞における HLA class II 発現

また, AIH 肝組織の免疫組織染色では interface hepatitis 周囲の肝細胞に HLA class II 発現が認められるとともに, *in vitro* における不死化肝細胞を用いた FACS による検討により, IFN- γ (R&D systems) により48時間後から HLA-DR 発現が誘導されることを確認した(図1)同時に HLA class II 分子の発現に関与する class II, major histocompatibility complex, transactivator (CIITA) の mRNA 発現も IFN- γ 添加により誘導されることを real-time RCR 法により確認した。

D. 考 察

抗 HLA 抗体の肝移植に対する影響に関しては, 依然として不明瞭な部分があるものの, 特にドナー特異的な抗 HLA 抗体の出現が肝移植後の急性拒絶や慢性拒絶, また graft survival の低下と関連することが報告されている。一方, ごく最近の報告 (Waki K, *et al.* Transplantation. 95: 177-83, 2013) では, ドナー非特異的な抗 HLA 抗体であっても, 抗 HLA 抗体が肝移植後に出現した症例では, 計画的に免疫抑制剤を減量

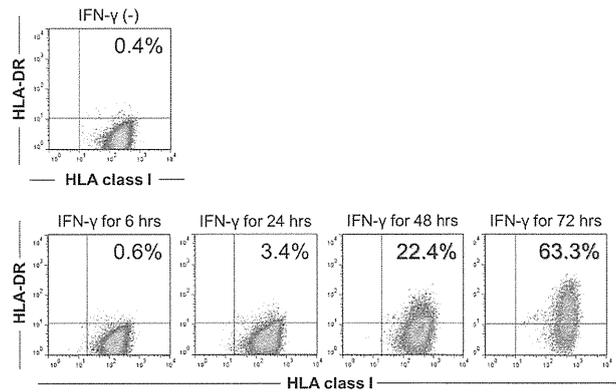


図1. IFN- γ (10ng/ml) による不死化肝細胞における HLA-DR 発現誘導

し移植肝に対する免疫寛容を誘導する operational tolerance が失敗する症例が有意に多いことが指摘されるなど, 肝臓に対する免疫応答における抗 HLA 抗体出現の意義については, 肝移植後の免疫応答も含めて更に検討が必要と考えられる。

本研究で着目した HLA class II 分子は DR, DQ, DP に分類され, マクロファージや樹状細胞, 活性化 T 細胞, B 細胞などの抗原提示細胞を含む限られた細胞にのみ発現しているが, 各種サイトカインなどによりその発現が誘導されることが知られており, 本研究では肝細胞においても IFN- γ により HLA class II 分子の発現が誘導されることを確認した。また, 本研究により AIH 患者血清中に自己 HLA class II 分子に対する抗体が認められ, 自己 HLA class II 分子に対する抗体が陽性である症例は重症例が多く, かつ AIH 肝組織の interface hepatitis 周囲の肝細胞に HLA class II 分子発現を認めたことから, 抗 HLA class II 抗体の出現は HLA class II 分子を発現した肝細胞に対する抗体補体反応や抗体依存性細胞傷害を惹起し, AIH の肝細胞傷害の進展・増悪に関与しうる可能性があると考えられた。

E. 結 論

AIH 発症時には血清中に抗 HLA 抗体が高率に検出され, HLA DNA typing と allele 特異性の検討により自己 HLA class II allele に対する抗体が陽性である症例の存在が確認された。自己の HLA class II allele に対する抗体陽性例は重症例であると考えられたことや, AIH 肝組織や不死化肝細胞における HLA class II 分子の発現から, 抗 HLA 抗体の出現が AIH の肝細胞傷害の進展・増悪に関与している可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato M, Matsuda Y, Wakai T, Kubota M,

- Osawa M, Fujimaki S, Sanpei A, Takamura M, Yamagiwa S, Aoyagi Y. P21-activated kinase-2 is a critical mediator of transforming growth factor- β -induced hepatoma cell migration. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2013 (in press)
- 2) Kobayashi M, Hashimoto S, Nishikura K, Mizuno KI, Takeuchi M, Sato Y, Ajioka Y, Aoyagi Y. Magnifying narrow-band imaging of surface maturation in early differentiated-type gastric cancers after *Helicobacter pylori* eradication. *J. Gastroenterol.* 2013 (in press)
 - 3) Yokoo T, Kamimura K, Suda T, Kanefuji T, Oda M, Zhang G, Liu D, Aoyagi Y. Novel electric power-driven hydrodynamic injection system for gene delivery: safety and efficacy of human factor IX delivery in rats. *Gene Therapy.* 2013 (in press)
 - 4) Suzuki Y, Ohtake T, Nishiguchi S, Hashimoto E, Aoyagi Y, Onji M, Kohgo Y. The Japan Non-B, Non-C Liver Cirrhosis Study Group. Survey of non-B, non-C liver cirrhosis in Japan. *Hepatol. Res.* 2013 (in press)
 - 5) Takamura M, Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, Aoyagi Y. Involvement of liver-intestine cadherin in cancer progression. *Med. Mol. Morphol.* 2013 (in press)
 - 6) Sakamaki A, Kamimura K, Shioji K, Sakurada J, Nakatsue T, Wada Y, Imai M, Mizuno K, Yamamoto T, Takeuchi M, Sato Y, Kobayashi M, Naito M, Narita I, Aoyagi Y. Immunoglobulin g4-related disease with several inflammatory foci. *Intern. Med.* 2013; 52(4): 457-62.
 - 7) Imai M, Higuchi M, Kawamura H, Yoshita M, Takahashi M, Oie M, Matsuki H, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M. Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4(+) T cells. *Virus Genes.* 2013 Feb; 46(1): 39-46.
 - 8) Hara Y, Sato Y, Yamamoto S, Oya H, Igarashi M, Abe S, Kokai H, Miura K, Suda T, Nomoto M, Aoyagi Y, Hatakeyama K. Successful laparoscopic division of a patent ductus venosus: report of a case. *Surg. Today.* 2012 (in press)
 - 9) Ikarashi S, Nishikura K, Ajioka Y, Aoyagi Y. Re-evaluation of phenotypic expression in undifferentiated-type early gastric adenocarcinomas using mucin core protein and CDX2. *Gastric Cancer.* 2012 (in press)
 - 10) Kamimura K, Nomoto M, Aoyagi Y. Hepatic angiomyolipoma: diagnostic findings and management. *Int. J. Hepatol.* 2012; 2012: 410781.
 - 11) Kamimura K, Suda T, Tamura Y, Takamura M, Yokoo T, Igarashi M, Kawai H, Yamagiwa S, Nomoto M, Aoyagi Y. Phase I study of miriplatin combined with transarterial chemotherapy using CDDP powder in patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol.* 2012; 12: 127.
 - 12) Oya H, Sato Y, Yamanouchi E, Yamamoto S, Hara Y, Kokai H, Sakamoto T, Miura K, Shioji K, Aoyagi Y, Hatakeyama K. Magnetic compression anastomosis for bile duct stenosis after donor left hepatectomy: a case report. *Transplant. Proc.* 2012; 44(3): 806-9.
 - 13) Fukuhara Y, Suda T, Kobayashi M, Tamura Y, Igarashi M, Waguri N, Kawai H, Aoyagi Y. Identification of cellular genes showing differential expression associated with hepatitis B virus infection. *World J. Hepatol.* 2012; 4(4): 139-48.
 - 14) Hayashi K, Takamura M, Sato Y, Takahashi K, Sato H, Youkou K, Yokoyama H, Nomoto M, Inoue C, Hasegawa G, Aoyagi Y. Primary malignant mesothelioma of the appendix. *Intern. Med.* 2012; 51(9): 1027-30.
 - 15) Osaki A, Suda T, Waguri N, Ishikawa T, Yokoo T, Kamimura K, Tamura Y, Takamura M, Igarashi M, Kawai H, Yamagiwa S, Aoyagi Y. Formula to Predict Platelet Count after Partial Splenic Arterial Embolization in Patients with Hypersplenism. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 2012; 23(7): 900-7.
 - 16) Go R, Takizawa K, Hirose S, Katsuragi Y, Aoyagi Y, Mishima Y, Kominami R. Impairment in differentiation and cell cycle of thymocytes by loss of a Bcl11b tumor suppressor allele that contributes to leukemogenesis. *Leuk. Res.* 2012; 36(8): 1035-40.
 - 17) Tsuchiya A, Imai M, Kamimura H, Takamura M, Yamagiwa S, Sugiyama T, Nomoto M, Heike T, Nagasawa T, Nakahata T, Aoyagi Y. Increased Susceptibility to Severe Chronic Liver Damage in CXCR4 Conditional Knock-Out Mice. *Dig. Dis. Sci.* 2012; 57(11): 2892-900.
 - 18) Fujimaki S, Matsuda Y, Wakai T, Sanpei A, Kubota M, Takamura M, Yamagiwa S, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y. Blockade of ataxia telangiectasia mutated sensitizes hepatoma cell lines to sorafenib by interfering with Akt signaling. *Cancer Lett.* 2012; 319(1): 98-108.
 - 19) Nozawa Y, Nishikura K, Ajioka Y, Aoyagi Y. Relationship between alpha-methylacyl-coenzyme A racemase expression and mucin phenotype in gastric cancer. *Hum. Pathol.* 2012; 43(6): 878-87.
 - 20) Kamimura H, Yamagiwa S, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Ohkoshi S, Inoue M, Wakai T, Shirai Y, Nomoto M, Aoyagi Y. Reduced NKG2D ligand expression in

hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. *J. Hepatol.* 2012; 56(2): 381-8.

21) Iwasaki T, Kawai H, Oseki K, Togashi T, Shioji K, Yamamoto S, Sato Y, Suzuki K, Toba K, Nomoto M, Hatakeyama K, Aoyagi Y. Japanese case of Budd-Chiari syndrome due to hepatic vein thrombosis successfully treated with liver transplantation. *Hepatol. Res.* 2012; 42(2): 213-8.

22) Kobayashi M, Takeuchi M, Hashimoto S, Mizuno KI, Sato Y, Narisawa R, Aoyagi Y. Contributing Factors to Gastric Ulcer Healing After Endoscopic Submucosal Dissection Including the Promoting Effect of Rebamipide. *Dig. Dis. Sci.* 2012; 57(1): 119-26.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・発行年も記入)

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 難治性疾患等克服研究事業 (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における抗 PD-1抗体の有用性

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:我々は、自己免疫性肝炎 (AIH type 1) I 型患者の血清中に抑制性補助刺激分子 programmed cell death-1 (PD-1) に対する自己抗体が存在することや、血清中抗 PD-1抗体の測定が AIH type 1と薬物性肝障害の鑑別に有用であること、AIH type 1では血清中抗 PD-1抗体の有無と肝炎の重症度やステロイド治療反応性の間に関連のあることを報告してきた。そこで、本研究班において、血清中抗 PD-1抗体の有用性について検証を行うこととした。現在、AIH 50例、薬物性肝障害25例の血清が得られる予定である。今後、更に症例数を増やす必要がある。

A. 研究目的

自己免疫性肝炎 (AIH) 患者における血清中抗 PD-1抗体測定が、AIH と薬物性肝障害 (DILI) との鑑別や AIH の臨床経過予測において有用であるかを検討する。

B. 研究方法

対象は、本研究班の参加施設において2000年1月から2012年3月までに AIH または DILI と診断された症例のうち、患者本人または代諾者からの同意が得られた後にステロイドまたは免疫抑制剤の治療開始前の血清が保存されている症例。

なお、AIH は、①肝生検が施行されている、②1999年国際自己免疫性肝炎診断基準で10点以上、③HBV・HCV・EBV の持続感染がない、の3項目を満たす症例。DILI は、①薬剤性肝障害診断基準 DDW-Japan 2004で5点以上、②臨床経過が DILI に矛盾しない、の2項目を満たす症例。

各症例から得られた血清において、抑制性補助刺激分子である PD-1 や Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4)、B and T lymphocyte attenuator (BTLA) のリコンビナントタンパクを用いた間接 ELISA 法により各抗体価を測定する。

C. 研究結果

2012年8月28日に岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会で本研究の承認を得た。その後、各参加施設の倫理委員会で承認を得た後に血清を収集する予定である。現在までに、AIH 50例、DILI 25例の血清が収集される予定である。

D. 考察

AIH と DILI には疾患特異的なバイオマーカーが存在していないために、日常臨床において AIH と DILI の鑑別に苦慮する症例を経験する。AIH と DILI では診断後の治療方針が異なるために、これら2疾患の鑑別は重要である。血清中抗 PD-1抗体が AIH と DILI の鑑別に有用であることが検証されれば、日常臨床の場においても有用なバイオマーカーに成り得ると考えられる。

AIH には、ステロイド治療を行っても経過中に再燃を繰り返す症例が存在する。本邦においても、再燃の繰り返しは予後不良因子であることが既に示されている。よって、ステロイド治療反応性の予測は、AIH 治療において重要な課題である。我々は、血清中抗 PD-1抗体陽性例では陰性例に比べて経過中の再燃率が高いことを報告してきた。この点についても、本研究での検証が必要である。

E. 結論

AIH のバイオマーカーとしての血清中抗 PD-1抗体の検証試験が進行中である。今後、更なる症例の集積が必要と思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyake Y, Yamamoto K. Role of gut microbiota in liver diseases. *Hepatol Res* 2013; 43(2): 139-46.
- 2) Miyake Y, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, Nouse K, Yamamoto K. SIRS score reflects clinical features of non-acetaminophen-related acute liver failure with hepatic coma. *Intern Med* 2012; 51(8): 823-8.
- 3) Ohnishi A, Miyake Y, Matsushita H, Matsumoto K, Takaki A, Yasunaka T, Koike K, Ikeda F, Shiraha H, Nouse K, Yamamoto K. Serum levels of soluble adhesion molecules as prognostic factors for acute liver failure. *Digestion* 2012; 86(2): 122-8.

2. 学会発表

- 1) 三宅康広, 松本和幸, 山本和秀. 血清中抗 PD-1抗体を用いた自己免疫性肝炎と薬物性肝障害の鑑別診断. JDDW2012, 神戸, 2012, 肝臓, 53巻 Suppl.2.
- 2) 三宅康広, 松本和幸, 高木章乃夫, 山本和秀. 自己免疫性肝炎の新規診断補助マーカーとしての

抗PD-1抗体及び抗BTLA抗体. 第48回日本肝臓
学会総会, 2012, 金沢, 肝臓, 53巻 Suppl.1.

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 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

自己免疫性肝疾患における転写抑制因子に関する研究

研究協力者 中本 安成 福井大学医学部第二内科 教授

研究要旨：転写抑制因子 Id2はNK細胞およびNKT細胞の分化や維持に重要な分子であり、これらの細胞が関与する自然免疫は自己免疫性肝炎の発症と進展に重要な役割を演じている。本研究では、自己免疫性肝炎の病態を解析するためId2に着目し遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いて検討した。Id2 KO マウスにConcanavalin A (Con A) を投与すると血清ALT値は上昇せず、肝組織HE染色では肝単核球浸潤は野生型マウスに比べ軽微であった。また、野生型マウスにCon Aを投与した肝浸潤単核球でのId2 mRNAの発現は経時的に変化しなかった。Id2 KO マウスではCon A誘導肝炎が抑制されており、Id2の機能喪失が肝炎発症に関与することが示唆された。その原因としてはNK細胞・NKT細胞の分化・増殖に依存する可能性や免疫環境の差異による可能性が考えられた。Id2の機能解析は自己免疫性肝炎の発症機序を解明する上で重要と考えられ、新規治療法の開発につながるものと期待される。

A. 研究目的

肝臓における自然免疫は自己免疫性肝炎の発症と進展に重要な役割を演じていることが認識されつつある。抗原非特異的なエフェクター機構を介するNKT細胞やNK細胞活性化によって抗原特異的リンパ球の活性化が引き起こされることより、NKT細胞およびNK細胞は自己免疫性肝炎の発症や進展に必要と考えられている。分化および増殖に働くinhibitor of DNA binding 2 (Id2) はNKT細胞およびNK細胞の分化や維持に重要な転写抑制因子であることが示されていることより、自己免疫性肝炎の病態を解析するためId2に着目し遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

Id2 KO マウスでConcanavalin A (Con A) 誘導肝炎モデルを用いて解析した。Con A 15 μ g/gを尾静脈より投与し、12時間後、24時間後に屠殺し、血清ALT値および肝組織HE染色を行った。また、野生型マウスにCon A 20 μ g/gを投与し、経時的に肝単核球および脾単核球を分離し、Id2, TNF α , IL-6 mRNA量を定量的PCR法で解析した。加えて、全肝組織での各mRNAの発現量も検討した。
(倫理面での配慮)

動物実験については、動物愛護と動物福祉の観点から各法令に基づき当該研究を実施した。また、実施機関の実験動物委員会の審査と承認を得て行った。

C. 研究結果

Con A 誘導肝炎モデルを用いた検討：

Con A 投与12時間後の血清ALT値は、野生型マウスが 627 ± 464 IU/lであるのに対し、Id2 KO マウスは 35 ± 5.7 IU/lと有意に低下していた ($p < 0.05$)。Con A 投与12時間後の肝組織HE染色では肝単核球浸潤は野生型マウスに比べ軽微であった。

また、野生型マウスにCon Aを投与した肝浸潤単核球でのId2 mRNA量は経時的に変化はなかった。

一方、TNF- α mRNAは3時間、12時間で増加した。脾単核球でのId2 mRNAの発現量は投与後3時間で変化なく、全肝組織でもId2 mRNAの発現量に変化はなかった。

D. 考察

自己免疫性肝炎の発症および進展において、肝臓での自然免疫の重要性が明らかとなってきている。NKT細胞およびNK細胞は抗原非特異的なエフェクター機構により抗原特異的リンパ球の活性化を引き起こすとともに直接的な細胞障害活性を有するとされる。Id2 KO マウスでは肝におけるNK細胞数が低下していることを報告し、NKT細胞数も低下していることが知られている。このId2 KO マウスではCon A誘導肝炎が抑制されており、Id2の機能喪失が肝炎発症に関与することが示唆された。Con A誘導肝炎モデルでは、肝単核球および脾単核球においてId2の発現に経時的な変化がみられなかったことより、NKT細胞・NK細胞の分化・増殖に依存する可能性や免疫環境の差異による可能性が示唆された。

E. 結論

転写抑制因子Id2は肝臓におけるNKT細胞およびNK細胞の発生や維持に関与しており、自己免疫性肝炎の発症機序を解明する上で重要な分子と考えられ、新規治療法の開発につながるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuda H, Ito Y, Suto H, Yamakawa A, Satomi S, Ohtani M, Yamazaki Y, Kusaka Y, Shimabukuro Y, Kikuchi K, Keida Y, Azuma T, Nakamoto Y: Clinical relevance and sequence analysis of the Helicobacter pylori dupA region

from two areas in Japan with different gastric cancer risks. *Immuno-Gastroenterology* 2012; 1: 127-135.

- 2) Marukawa Y, Nakamoto Y, Kakinoki K, Tsuchiyama T, Iida N, Kagaya T, Sakai Y, Naito M, Mukaida N, Kaneko S: Membrane-bound form of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy in a model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2012; 19: 312-319.
- 3) Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamase A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, Hirao A: Nucleostemin in Injury-Induced Liver Regeneration. *Stem Cells Dev.* 2012; 21: 3044-3054.
- 4) Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y: Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. *Hepatology Res.* 2012; 42: 523-542.
- 5) Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, Takata M, Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Kimura H, Igarashi K, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H: TNF- α and Tumor Lysate Promote the Maturation of Dendritic Cells for Immunotherapy for Advanced Malignant Bone and Soft Tissue Tumors. *PLoS One.* 2012; 7: e52926.
- 6) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Kondo TH, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S: Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012 (in press).

2. 学会発表

- 1) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: MicroRNA Dynamics in Precancerous Lesions in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. 第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): *Hepatology* 56 (4, Suppl.) 315A; 一般; oral: Nov. 13, 2012.
- 2) Naito T, Nemoto T, Matsuda H, Ohtani M, Suto H Nakamoto Y: High Incidence of HBV Reactivation after R-CHOP and CHOP Regimens among Patients Treated with Six Immunosuppressive Chemotherapies. 第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston,

Massachusetts): *Hepatology* 56 (4, Suppl.) 643A; 一般; poster: Nov. 11, 2012.

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 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

新たに確立した動物モデルを用いた自己免疫性肝炎の病態解明と新規治療法の開発

研究協力者 渡部 則彦 京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座 非常勤講師

研究要旨：自己免疫性肝炎（autoimmune hepatitis: AIH）の発症機序の解析が可能な疾患モデルである新生仔期胸腺摘除を施行したPD-1遺伝子欠損マウスを用いて、慢性肝炎から劇症肝炎まで多彩な病態を呈するAIHの発症機序の解明と、ステロイド治療の有効性とその限界が生じる原因の究明、それを克服する新規治療の開発を目指して解析を行った。

その結果、抑制性共刺激分子PD-1の欠損と制御性T細胞の減少で、マウスの系統に依存して慢性肝炎から劇症肝炎まで病態の異なるAIHが生じること、自己反応性T細胞の活性化が脾臓で生じ、その活性化T細胞が特定のケモカイン依存性に肝臓に移行することでAIHの発症が誘導されること、また、ステロイドがAIH治療に有効であるが、その限界が生じるのは、誘導臓器である脾臓において、自己反応性T細胞の活性化が完全には抑制できないことにあること、そして、誘導臓器である脾臓を脾摘術で除去することで肝炎発症を予防できるだけでなく、肝炎発症後の治療も可能であることが明らかとなった。

A. 研究背景・研究目的

自己免疫性肝炎（autoimmune hepatitis: AIH）は、自己反応性T細胞により肝障害が発症すると考えられるにも関わらず、B細胞活性化に基づく高ガンマグロブリン血症と抗核抗体などの血中自己抗体の出現を伴う特異な病態を呈する。一方、AIHは、慢性肝炎から劇症肝炎まで多彩な経過をとり、治療にはステロイドが有効であることが多いが、中止によりしばしば再燃し、ステロイド離脱が困難であることが多く、根治療法の新規開発が望まれている。AIHに対する新規療法の開発には、その発症機序の解明が不可欠であるが、AIHの特異な発症機序の解析が可能となる自然発症型疾患モデル動物が開発されていなかった。

最近の研究で、私たちは、抑制性共刺激分子PD-1を欠損したBALB/c系統のマウス（BALB/c-PD-1^{-/-}マウス）に、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞の除去目的に新生仔期胸腺摘除（neonatal thymectomy: NTx）を施行することで、ヒトAIHと同様に高ガンマグロブリン血症と抗核抗体産生を伴う重度のAIHが発症することを見いだした。このBALB/c-NTx-PD-1^{-/-}マウスでは、ほぼ全例約2週齢でAIHを発症し、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞を中心とする炎症細胞浸潤から重症化し、約4週齢までに、高度の肝細胞壊死から死に至ることが明らかとなっている（GASTROENTEROLOGY 2008; 135: 1333-1343）。

研究目的：

今回私たちは、NTx-PD-1^{-/-}マウスを用いて、慢性肝炎から劇症肝炎まで多彩な病態を呈するAIHの発症機序の解明と、ステロイド治療の有効性とその限界が生じる原因の究明、それを克服する新規治療の開発を目的として解析を行った。

B. 研究方法

劇症肝炎型のAIHを呈するBALB/c-NTx-PD-1^{-/-}マウスにおいて、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞をおおの除去可能な抗CD4抗体とCD8抗体をNTx後継続的

に *in vivo* に投与し、4週齢で、肝炎発症の抑制効果を免疫・組織学的に解析した。次に、発症誘導性T細胞の誘導臓器を同定するために新生仔期脾摘実験を行った。さらに、AIH発症前後の肝臓・脾臓のT細胞を精製し、発現分子のmRNAレベルでの定量的RT-PCR解析、フローサイトメトリー、免疫染色での蛋白レベルでの解析、さらに、細胞移入による免疫学的解析を行った。そして、このモデルでの活性化T細胞の分化、または、肝臓への移行に関与する各分子に対する阻害抗体の *in vivo* 投与実験を行い、肝炎発症の抑制効果を検証した。また、ステロイド治療の有効性をみる解析では dexamethasone を NTx 後予防的または発症後治療的に継続的に *in vivo* に投与し、免疫学的、組織学的解析を行なった。さらに慢性肝炎を呈するAIHモデルの構築のためにC57BL/6系統に戻し交配したPD-1^{-/-}マウスにNTxを施行して、BALB/c-NTx-PD-1^{-/-}マウスと同様に解析を行なった。（倫理面への配慮）

本研究は、京都大学動物実験委員会で承認済みである。

C. 研究結果

BALB/c-NTx-PD-1^{-/-}マウスの解析から以下のことが明らかとなった。1) CD8⁺T細胞が致死的な肝細胞障害の誘導に必要であるが、CD4⁺T細胞は、そのCD8⁺T細胞の肝浸潤誘導をも含むAIHの発症惹起に必須であること、2) AIHの発症時期から脾臓が存在し、脾臓がAIHの発症惹起に関与するCD4⁺T細胞の活性化誘導の場であり、新生仔期に脾摘術を行うとAIHが発症しないこと、3) 脾臓では、感染などが無い環境にも関わらず、B細胞による胚中心形成2次濾胞が形成され、CD4⁺T細胞はこの2次濾胞内に局在し、濾胞ヘルパーT細胞（T follicular helper cell; T_{FH}細胞）としての形質をもつこと、4) T_{FH}細胞の機能と分化に必須であるICOSおよびIL-21に対する中和抗体投与で、血清IgG高値と高度の抗核

抗体産生を含む AIH の発症が抑制されること、5) AIH 発症に関与する活性化 T 細胞の脾臓から肝臓への移行には、CCR6 とその単一のリガンドである CCL20 のケモカイン系が関与し、CCL20 に対する中和抗体投与で、活性化 T 細胞移行が阻害され、AIH の発症が抑制されること。以上より、自己反応性 T 細胞の活性化が脾臓で生じ、その T 細胞が特定のケモカイン依存性に肝臓に移行することで AIH の発症が誘導されることが明らかとなった (図 1)。

また、ステロイド治療の有効性をみる BALB/c-NTx-PD-1^{-/-} マウスを用いた解析では、以下のことが明らかとなった。1) AIH マウスモデルにおいて、ステロイドが発症予防に有効であるだけでなく、ヒト AIH と同様、治療的にも肝炎の抑制に有効であること、2) ステロイドを治療的に投与した場合、致死性の肝炎は抑制されるが、脾臓では AIH の発症に関わる胚中心形成した濾胞と T_{FH} 細胞が遺残し、ステロイド治療中止にて肝炎が再燃すること、3) ステロイド治療を行なったマウスの脾臓 CD4⁺T 細胞を免疫不全マウスに移入すると肝炎が誘導できること、4) ステロイド治療後に AIH の発症の誘導臓器である脾臓を摘出する脾摘術を行うと、ステロイドを中止しても肝炎の再燃が抑制できること、5) 脾摘術によって単独でも治療的に肝炎抑制が可能であること。以上から、AIH のステロイド治療は肝炎抑制には有効であるが、AIH の発症誘導臓器である脾臓 T_{FH} 細胞の活性化抑制には十分ではなく、脾摘術が根治療法として有効であることが示唆された。

さらに、慢性肝炎を呈する AIH モデルの構築のために行なった C57BL6-NTx-PD-1^{-/-} マウスを用いた解析では、1) このマウスにおいて、ヒト慢性肝炎型 AIH と同様に、高ガンマグロブリン血症と抗核抗体産生を伴い肝線維化を呈する慢性肝炎が発症すること、2) ヒト慢性肝炎型 AIH と同様に頻度は少ないが、唾液腺炎など他の自己免疫性臓器炎を伴うこと、3) 脾臓では、BALB/c 系統の AIH モデルと同様に、B 細胞による胚中心形成 2 次濾胞が形成され、T_{FH} 細胞が増加していること、4) この脾臓 CD4⁺T 細胞を免疫不全マウスに移入すると肝炎が誘導できること、5) ヒト AIH と同様、治療的にステロイドが肝炎の抑制に有効であること、5) 脾摘術によって、単独で治療的に肝炎抑制が可能であることが明らかとなった。

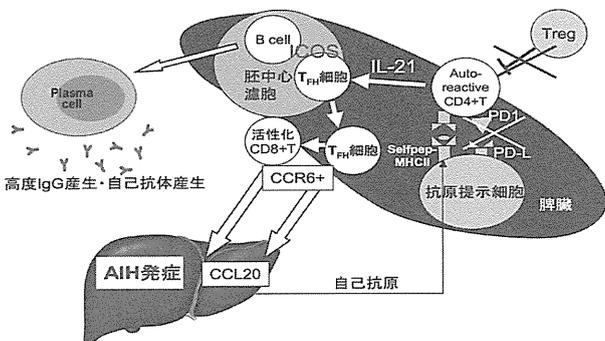


図 1 AIH 疾患モデルでの AIH 発症機構

D. 考 察

今回の研究で、AIH の発症機序の解析が可能となる自然発症型疾患モデル動物を用いて、多彩な病態を呈する AIH が、抑制性共刺激分子 PD-1 の欠損と制御性 T 細胞の除去でマウスの系統に依存して生じることが明らかとなり、MHC クラス II などの遺伝的背景に依存して多彩な病態が誘導されることが示唆された。また、ステロイドは、AIH 治療に有効であるが、その治療に限界が生じるのは、誘導臓器である脾臓において、自己反応性 T 細胞の活性化が完全には抑制できないことにあり、そして、脾摘術を行うことで肝炎発症を予防できるだけでなく、肝炎発症後の治療も可能であることが示唆された。

E. 結 論

ヒト AIH と同様の病態を呈しうる AIH 動物モデルの解析から、発症誘導臓器である脾臓をターゲットとした治療が根治療法として有望であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishiura H, Iwamoto S, Kido M, Aoki N, Maruoka R, Ikeda A, Chiba T, Watanabe N. Interleukin-21 and TNF- α are critical for the development of autoimmune gastritis in mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Feb 21. doi: 10.1111/jgh.12144.
- 2) Iwamoto S, Kido M, Aoki N, Nishiura H, Maruoka R, Ikeda A, Okazaki T, Chiba T, Watanabe N. TNF- α is essential in the induction of fatal autoimmune hepatitis in mice through upregulation of hepatic CCL20 expression. *Clin Immunol.* 146:15-25, 2013.
- 3) Iwamoto S, Kido M, Aoki N, Nishiura H, Maruoka R, Ikeda A, Okazaki T, Chiba T, Watanabe N. IFN- γ is reciprocally involved in the concurrent development of organ-specific autoimmunity in the liver and stomach. *Autoimmunity.* 45:186-198, 2012.

2. 学会発表

- 1) 渡部則彦, 丸岡隆太郎, 青木信裕 自然発症型自己免疫性肝炎モデルを用いたステロイド治療にかかわる新規治療法の探索 第49回日本消化器免疫学会総会 2012. 7. 5. 城山観光ホテル 鹿児島.
- 2) 青木信裕, 丸岡隆太郎, 渡部則彦 自己免疫性肝炎 (AIH) 新規モデルマウスの病態から重症・難治性 AIH の治療をさぐる 第48回日本肝臓学会総会 2012. 6. 7. ANA クラウンプラザホテル 金沢 金沢.
- 3) Maruoka R, Aoki N, Watanabe N. Splenectomy overcomes therapeutic insufficiency of corticosteroids and induces prolonged remission. *DDW2012* 2012. 5. 21. San Diego, USA.

- 4) 青木信裕, 木戸政博, 渡部則彦. 新規致死性自己免疫性肝炎 (AIH) モデルにおける AIH 劇症化機序の解明 第98回日本消化器病学会総会
2012. 4. 20 京王プラザホテル 東京.

G. 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 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

小児期の AIH と PSC オーバーラップ例の検討

研究協力者 藤澤 知雄 済生会横浜市東部病院こどもセンター肝臓消化器部門 顧問

研究要旨: AIH と PSC オーバーラップ例の臨床的特徴は明らかでない。我々は、本邦小児における AIH と PSC オーバーラップ例を検討した。2005年から2012年に当科において IAIHG の revised scoring system で probable 以上に該当し、かつ、逆行性胆道造影にて胆管病変を認めた11例を対象とした。Revised score では3例が definite に、8例が probable に該当した。IgG 高値は81%に、抗核抗体陽性は81%で認められた。全例に UDCA と5-ASA 製剤を投与し、8例では免疫抑制剤を使用した。治療により ALT 値が正常化した症例は3例のみであり、免疫抑制剤の効果は限定的であった。今後、診断基準および治療法の確立が必要である。

共同研究者

角田 知之 済生会横浜市東部病院こどもセンター
十河 剛 済生会横浜市東部病院こどもセンター
乾 あやの 済生会横浜市東部病院こどもセンター

A. 研究目的

自己免疫性肝疾患である AIH, PBC および PSC では、AIH/PBC または AIH/PSC の両者の特徴を有する症例があることが報告されている。しかし、その診断基準や治療法は確立されていないのが現状である。小児でも AIH/PSC の報告はあるものの、その臨床的特徴は明らかではない。

そこで我々は、小児における AIH/PSC オーバーラップ例の臨床的特徴を検討した。

B. 研究方法

調査対象期間：2005年1月～2012年12月末。当科で診療し、International Autoimmune Hepatitis Group の revised scoring system で probable 以上 (10点以上) を満たし、内視鏡的逆行性胆道造影 (ERC) で PSC と診断した11例を、前方視的に検討した。全例に対して診断時に、肝生検、ERC、下部消化管内視鏡検査 (CS) を施行した。

C. 研究結果

11例の内訳は男児6例、女児5例。肝機能異常を初めて指摘された年齢の中央値は6歳 (2～14歳)。追跡期間の中央値は3年 (3か月～8年)。ALT 215 IU/l, γ GTP 338 IU/l (いずれも中央値), IgG 高値 (年齢基準比) 9例 (82%), 自己抗体陽性9例 (ANA 6例, SMA 6例, AMA 0例), HLA-DR4陽性1例 (11%), DR3陽性0例。

診断時における肝生検組織では、interface hepatitis は mild なものも含めると全例で認めた (mild 7例, severe 4例)。形質細胞浸潤は6例で認められ、ロゼット形成は4例、Onion skin lesion は6例で認めた。Ludwig らの PSC 組織分類では stage 1 が2例、2 が6例、3 が3例であった。

CS では11例中10例で異常所見を認め、所見異常を認めなかった1例でも組織学的に強い炎症細胞浸潤が

認められたため、全例で下部消化管病変を合併していた。粘膜生検では、陰窩炎が11例、陰窩膿瘍が6例、腺管の捻じれが10例に認められた。炎症細胞浸潤および腺管の捻じれ、陰窩炎、陰窩膿瘍全て伴った6例を潰瘍性大腸炎 (UC) と診断した。その他の5例は Non specific colitis と判断した。腸炎所見は全結腸にわたるものが5例、右側結腸有意な症例は4例で認め、2例では直腸に病変を認めなかった。11例中4例では、これまで無症状で経過している。

IAIHG の revised scoring system では11例中3例が definite, 8例が probable に該当した。2008年に発表された simplified scoring system では、同様に3例が definite, 4例が probable に該当した。

治療は、全例に UDCA と5-ASA 製剤を投与した。11例中8例では、強い肝組織の炎症細胞浸潤に対し、あるいは UC に対して、プレドニゾロンかつ/またはアザチオプリンを使用した。トランスアミナーゼの正常化が得られた症例は11例中3例であり、うち2例ではプレドニゾロンやアザチオプリンは使用していなかった。

これまでに5例に対して追跡肝生検をおこなった。このうち ALT が正常化した症例は1例のみであり、この症例では組織学的進行は認めなかった。残りの4例では、ALT は正常化しておらず、interface hepatitis や形質細胞浸潤の増悪、線維化の進行が認められた。

D. 考 察

AIH/PSC の両方の特徴を併せ持つ病態の存在はこれまでも報告されていたが、診断基準は確立されておらず、各報告者によってその定義が異なっていた。King's college の Gregorio らは自己抗体陽性、IgG 高値、interface hepatitis を伴う PSC を Autoimmune sclerosing cholangitis と定義し AIH の一連のスペクトラムの疾患として報告している。しかし、その他の報告では小児期の PSC はその特徴として AIH 類似の所見を呈しやすいているものもあり、コンセンサスは得られていない。

また、オーバーラップ例では約8割で免疫抑制剤が奏功するとの報告もあるが、我々の検討ではトランスアミナーゼの正常化が得られた症例は11例中3例のみ

であり、免疫抑制剤の効果は極めて限定的であった。この相違は、オーバーラップの定義が違うことで、異なる疾患群を対象としているためという可能性も考えられる。本検討でトランスアミナーゼが正常化した症例の特徴は、診断時の肝生検組織像で炎症細胞浸潤が軽度で形質細胞浸潤がない症例であり、こうした症例ではUDCAおよび5-ASA製剤によりトランスアミナーゼの正常化が期待できる可能性が示唆された。

小児にIAIHG revised scoring systemを適用するにあたっての問題は、小児期には生理的にALPが高値を示すためγGTPで代用する必要があること、また、飲酒に関する項目で基本的に加算されるため、simplified scoreに比べてprobable以上に該当しやすいことが挙げられる。今後小児に対する診断基準を検討することが必要と考えられる。

今回の検討から、本邦小児においてもAIHとPSCの特徴を併せ持つ症例がいることがわかった。このため、AIHを疑った症例ではERCやCSをおこないPSCを鑑別することが必要である。また、ステロイドやアザチオプリンを使用しても肝機能の正常化が得られず、組織学的に進行する症例がいることがわかった。

E. 結 論

小児期AIH/PSCオーバーラップ例の診断基準および治療法の確立が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小児原発性硬化性胆管炎発症早期のERCP所見. 十河剛, 角田知之, 川本愛里, 小松陽樹, 乾あやの, 藤澤知雄. 小児外科 2012; 44(3): 250-253

2. 学会発表

- 1) 近藤健夫, 十河剛, 川本愛里, 角田知之, 小松陽樹, 乾あやの, 藤澤知雄. 自己免疫性肝炎と診断された8年後に原発性硬化性胆管炎と診断された11歳男児例. 第29回日本小児肝臓研究会シンポジウム
- 2) 角田知之, 川本愛里, 伊地知園子, 十河剛, 小松陽樹, 乾あやの, 藤澤知雄. 本邦における小児期の自己免疫性肝炎と原発性硬化性胆管炎overlap例の検討. 日本肝臓学会大会
- 3) 近藤健夫, 十河剛, 川本愛里, 角田知之, 小松陽樹, 乾あやの, 藤澤知. 自己免疫性肝炎診断8年後に原発性硬化性胆管炎と診断された1例. 第45回武蔵野小児肝臓懇話会
- 4) 近藤健夫, 十河剛, 角田知之, 川本愛里, 藤原伸一, 伊地知園子, 小松陽樹, 乾あやの, 藤澤知雄. 当院における小児の炎症性腸疾患30例の長期予後の検討. 第9回日本消化管学会総会・学術集

会

- 5) 角田知之, 十河剛, 近藤健夫, 川本愛里, 藤原伸一, 伊地知園子, 小松陽樹, 乾あやの, 中澤温子, 藤澤知雄. 小児期原発性硬化性胆管炎における腸管合併症の臨床的特徴. 第9回日本消化管学会総会・学術集

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 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

自己免疫性肝炎の長期予後に関わる因子の検討

研究協力者 鈴木 義之 虎の門病院分院臨床検査部 部長

研究要旨：自己免疫性肝炎 (AIH) においても長期予後を規定する因子は他の慢性肝疾患と同様は、肝硬変への移行と発癌である。本邦の AIH は免疫抑制剤治療への反応性が良く、長期予後は良好との報告が多いが近年では高齢化とともに、肝硬変へ移行したりさらには発癌する症例も散見されている。当院ではこれまでに肝硬変へと進展した21例と7例の AIH に伴う肝細胞癌 (HCC) を経験し、各々の症例の病態と治療の反応性を検討した。この中で長期にわたり良好な経過が得られている症例の特徴を解析することでどのような因子が予後に関わり、いかに有効な治療を行うかを検討したので報告する。

A. 研究目的

昨年度までに、我々は難治例を解析しより良い診断法、治療法は如何なるものかについて報告してきた。免疫抑制療法を行うことの目的は AIH 患者の肝臓の炎症を消退させ、組織学的進展 (主に繊維化の進行) を改善し、患者の予後の向上を図ることである。このために我々は、治療困難例において治療効果の上がる方法の中で至適量を設定する検討や、中止基準につきこれまで報告してきた。今年度は自己免疫性肝炎として経過観察中であった症例の長期予後を解析し、それに関わる因子を抽出することを目的として、血液学的所見から病期が進行した症例に焦点を当てこれに関わる宿主要因の検討を行った。その上で、今後の治療指針を検討し、各個人にあった治療法を見出すことを目的とした。

B. 研究方法

1979年より2011年12月までに当院で type-I の AIH と診断された症例は153例存在する。今回の検討では、ウイルスマーカー陽性例、初診時肝硬変、3年未満の経過観察例は除外し112例とした。組織学的検索、血小板10万以下、食道静脈瘤の出現をもって肝硬変へ移行したと判断した。治療反応性については AST 値を50以下にコントロールし、再燃のない群を反応良好例とし、それ以外を不良例とした。組織学的変化については、銀染色と D-PAS 染色を行った標本を HAIScore を用いて評価し、2point 以上の改善を改善例とし、0-1point を不変、点数が増加した症例を悪化とした。また、抗核抗体は間接蛍光抗体法 (Hep-2細胞)、抗平滑筋抗体は間接蛍光抗体法、抗 LKM1抗体は蛍光抗体法、HBs 抗原は CLEIA 法、HCV 抗体は EIA (第3世代)、HCV-RNA は RT-PCR 法、HLA typing は血清学的方法 (判定困難な場合 PCR-MPH 法) を用いて測定した。また、可能な限り HLA のタイピングを行い特に DR 抗原原の検討を行った。

発癌症例の検討では、初診時肝硬変症例、発癌症例が含まれるため125例の検討となっている。HCC の診断は、腹部超音波、CT、MRI の画像診断を行い、CT もしくは MRI 検査において早期で濃染し、平衡相で低吸収域を呈した結節を HCC と診断した。治療

については、各症例の全身状態を考慮した上で、可能な限り根治療法を目指した方法を選択した。

C. 研究結果

今回の対象症例の背景を表1に示す。年齢の中央値は53歳 (範囲19-78: 以下はすべて中央値とカッコ内は範囲)、女性94例 (84%)、AST 94.5 (15-1936)、ALT 114 (9-1542)、ALP 329 (56-1576)、 γ -GTP 133 (12-1344)、IgG 2177 (280-5251)、 γ -glob. 2.17 (0.5-5.2)、ANA 640 (40-10240)、AIHscore 16 (6-19) であった。

肝硬変への移行を検討した結果では、112例中21例が移行したと判断され、移行率は図1に示すように20年で約38%であった。表2に示すように病期進行例の初診時の特徴は IgG や γ glob. が高値であり、また ANA も高値であり、 γ GTP においても有意差が認められたが、AIHscore や肝胆道系酵素には差が認められなかった。全例での肝硬変移行率は18.8%であり、背景因子と治療反応性から多変量解析を行った結果では治療反応性のみが有意であり (P=0.004)、IgG 値と BMI に傾向差が認められた (表3)。そこで、治療反応別に肝硬変移行率を検討してみると図2に示すように反応の違いで肝硬変への移行率に明らかな差が認められた。

さらに早期の治療反応性に着目して検討を加えた結果が図3である。免疫抑制剤による治療を開始後4週以内に肝酵素の正常化がえられた症例からの肝硬変移行率は11%と低く、8週目でも18%であったのに対し8週までに正常化がえられなかった症例では実に44%もの肝硬変移行率が認められた。これを最初の背景因子とともに多変量解析を行うと早期の治療反応性が肝硬変への移行に関わる因子として抽出された。

D. 考察

免疫抑制療法による肝炎の安定化は肝硬変移行率を引き下げ、特に治療早期の反応性がその後の予後に関与していることが示された。このような肝炎の安定化は昨年度報告したように肝酵素を低値で安定させている群からの発癌率は低くまた、再発を抑制することで生存率の向上に寄与しているものと考えられた。この

ように、免疫抑制療法が奏功している症例においては発癌例においても予後の改善をもたらす可能性がある。これまでの検討で当院の発癌後の生存期間は56カ月(平均値61カ月)と従来の報告よりも良好であった。また、今回の検討では明らかな結果は出なかったがAIH以外の因子や肝炎の安定化が不良な症例からの発癌が多く発癌リスクと考えられ、生活指導を含めた脂質代謝異常や糖尿病のコントロールも重要であると考えられた。

E. 結 論

自己免疫性肝炎からの病期進行に関わる因子は治療反応性であり、またいかに早く肝炎を安定化させるかが重要な因子であることが示された。さらには、免疫抑制療法による肝炎の安定化が発癌抑制も含めた進行抑制もなしえる可能性があると考えられた。発癌後も再発に対する治療を繰り返し、肝炎を安定化させることで長期の生存期間が可能であると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki Y, et al. Association of HLA-DR14 with

Treatment Response in Japanese Patients with Autoimmune Hepatitis. Dig Dis Sci 2010 55 2070-2076

- 2) 自己免疫性肝疾患 Year note 2011 Selected Articles P191-203

2. 学会発表

- 1) JDDW2010日本肝臓学会大会シンポジウム5-6 追2 自己免疫性肝炎非定型例の診断と治療 2010.10.13 横浜

- 2) 第47回日本肝臓学会ワークショップ1-④ 4. 自己免疫性肝炎に伴う肝発癌症例の検討 2011.7.28 静岡

- 3) JDDW2011 第15回日本肝臓学会大会ワークショップ3-10 自己免疫性肝炎病期進行例の病態と予後 2011.10.20 福岡

- 4) JDDW2012 第16回日本肝臓学会大会パネルディスカッション3-11 自己免疫性肝炎における難治要因の解析と予後 2012.10.10 神戸

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

表1 自己免疫性肝炎症例の背景

年齢	53	(19-78)
男女比	18:94	
AST	94.5	(15-1936)
ALT	114	(9-1542)
ALP	329	(5.6-1576)
γ-GTP	133	(12-1344)
IgG	2177	(280-5251)
γ-glob	2.17	(0.5-5.3)
ANA	640	(0-10240)
AIHscore	16	(6-19)

N=112

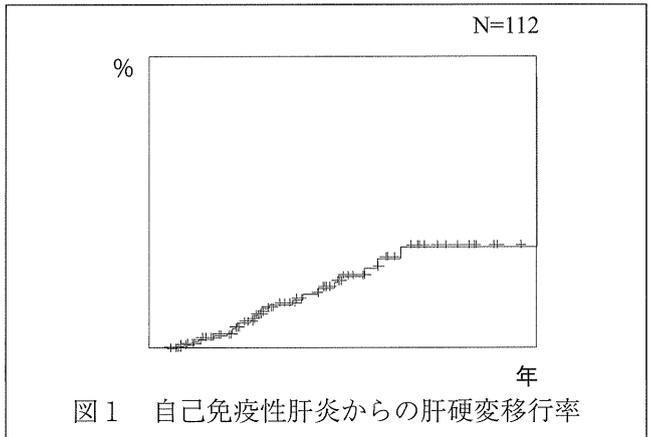


図1 自己免疫性肝炎からの肝硬変移行率

表2 病期進行別の背景因子の相違

	慢性肝炎維持	肝硬変移行	P値
年齢	52(19-75)	54(19-78)	0.205
男女比	14:77	4:17	0.847
AST	81(15-1936)	102(23-793)	0.336
ALT	116(9-1542)	99(17-785)	0.951
ALP	317(5.6-1261)	350(5.6-1576)	0.349
γ-GTP	118.5(12-1344)	182(26-651)	0.047
IgG	1910(280-5251)	2796.5(2177-3669)	0.004
γ-glob	1.97(0.5-5.3)	2.54(1.3-4.6)	0.011
ANA	640(10-10240)	2560(0-10240)	0.033
score	15(6-19)	17(16-18)	0.121
BMI	21(16-30)	21(15-27)	0.166

表3 自己免疫性肝炎の治療経過中に肝硬変移行に寄与する因子

Factor	[Category]	Risk ratio (95% confidence interval)	P
治療反応性	1: 良好	1	0.004
	2: 不良	6.69(1.82-24.55)	
IgG	1: 2000未満	1	0.083
	2: 2000以上	4.25(0.83-21.83)	
BMI	1: 25以上	1	0.075
	2: 25未満	0.20(0.03-1.18)	

肝硬変移行率
18.8%

診断時の背景因子と治療反応性から多変量解析を施行。

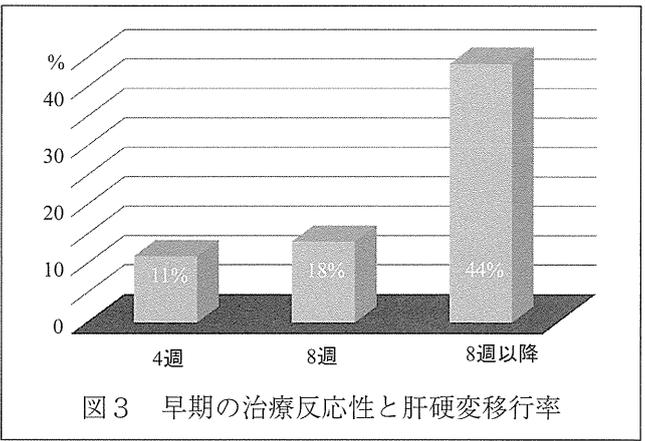
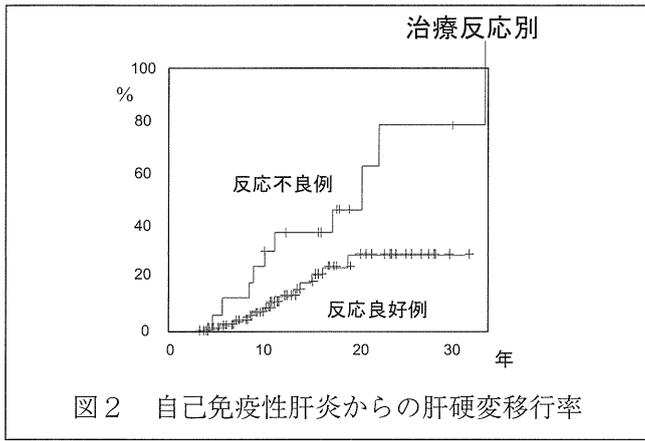


表4 自己免疫性肝炎の肝硬変移行に寄与する要因の解析

Factor	[Category]	Risk ratio (95% confidence interval)	P
8週の反応性	1: 不良	1	0.0006
	2: 良好	21.87(3.75-127.66)	
4週の反応性	1: 不良	1	0.0003
	2: 良好	17.73(3.69-85.17)	
IgG	1: 2000未満	1	0.12
	2: 2000以上	0.25(0.04-1.42)	

診断時の背景因子と治療反応性から多変量解析を施行。