□ 症 例 報 告

原発性胆汁性肝硬変が疑われた 83 歳の 1 男性例

—抗ミトコンドリア抗体と鑑別を要する新しい抗 p 95 cytosol 抗体—

宮 地 清 光・鷹 野 佐恵子・松 嶋 広・保 坂 洋 夫^{1*}
 宮 川 浩^{2*}・鈴木 王 洋^{3*}・川 越 光 博^{3*}・権 田 信 之^{4*}
 柴 田 実^{5*}・上 野 幸 久^{5*}

Jpn. J. Clin. Immun., 16 (3) : 236~243, 1993.

**A case study of an 83-year-old male suspicious of having primary biliary cirrhosis :
 The presence of novel cytosol antibody reacting with a 95 kilodalton
 protein, distinct from anti-mitochondrial antibody**

Kiyomitsu Miyachi, Saeko Takano, Hiroshi Matsushima, Hiroo Hosaka^{1*},
 Hiroshi Miyakawa^{2*}, Kimihiro Suzuki^{3*}, Mitsuhiro Kawagoe^{3*}, Nobuyuki Gonda^{4*},
 Minoru Shibata^{5*} and Yukihisa Ueno^{5*}

Health Sciences Research Institute, Autoimmune Disease Center^{1*}*Saiseikai Yokohama Southern Hospital, Department of Internal Medicine*^{2*}*Teikyo University Hospital at Mizonokuchi, The Fourth Department of Internal Medicine*^{3*}*National Defense Medical College, The First Department of Internal Medicine*^{4*}*Tomioka Clinic*^{5*}*Kawasaki Central Hospital, Department of Internal Medicine*

【Summary】

In 1988, we reported on the presence of anti-Is antibody in sera from patients with either primary biliary cirrhosis (PBC) or autoimmune hepatitis. In the present study, we characterize such a patient who has been followed for the past 14 years. Medical examination revealed liver dysfunction at the age of 69. He was sent to the liver outpatient section at hospital B at age 75 because of serum hyperalkaline phosphatase and hyper γ GTP. The result of ERCP showed no evidence of extrahepatic and biliary involvement, and AMA determination was positive, suggesting the presence of PBC. He was hospitalized in order to undergo liver needle biopsy. However the biopsied specimen showed no evidence of PBC, but instead, revealed the presence of chronic persistent hepatitis. Immunoprecipitation using

³⁵S methionine labelled HeLa cell extract found the corresponding antigen of anti-Is antibody to be 95 kDa in size and found mainly in the cytosolic fraction. Thus, we have decided to call this antibody the anti-p 95 C antibody. Further immunological examination of this patient showed the presence of anti-centromere antibody and anti-p 95 C antibody instead of AMA positive. Furthermore the patient continued to show obstructive hepatic dysfunction upon blood chemistry examination. However, the patient has denied general malaise, itching, and jaundice, and is thought to be a case with a good prognosis. Finally, we present 15 further cases with anti-p 95 C antibody, and discuss the clinical significance of this antibody.

Key words : liver specific antibody,
PBC,
AMA,
immunoprecipitation

【概 要】

症例は 69 歳時、会社の検診で肝機能異常を指摘された。75 歳時、胆道系酵素が高値のため、B 病院肝臓外来へ紹介された。ERCP で肝外胆道系疾患はなく、抗ミトコンドリア抗体 (AMA) 陽性のため PBC が疑われ、77 歳時肝生検目的のため入院となった。肝生検像では、PBC の所見は乏しく、chronic persistent hepatitis の所見のみであった。本抗体の対応抗原が免疫沈降法により 95 kDa の蛋白で、細胞質の cytosol 分画に存在していることから、本抗体を抗 p 95 cytosol (C) と改名した。

本症例はその後の免疫学的検査では、AMA と異なる抗 p 95 C 抗体陽性の他、抗セントロメア抗体も陽性であった。さらに血液生化学的検査では、高度の閉塞性肝機能障害を呈していたが、自覚症状では全身倦怠感、掻痒感、黄疸はなく、予後良好の 1 例と考えられた。本研究所で経験した本抗体陽性の 15 症例を呈示し、臨床的特徴について考案した。

I. はじめに

自己免疫性肝疾患には種々の自己抗体が報告されている。Walker ら¹⁾は PBC 患者血清中に AMA を発見し、現在では 9 種類に分類され AMA の多様性が報告されている²⁾。一方ウイルス性以外の自己免疫性肝炎 (AIH) の血清診断には、ANA, LE 細胞³⁾, 抗平滑筋抗体⁴⁾, 抗細胞膜抗体⁵⁾らが報告されており、これらの抗体を有する群は type 1 の AIH を形成する。その他頻度は低いが、抗 liver kidney microsome (LKM) 抗体^{6,7)}が報告され、type 2 AIH の存在が報告されている。type 2 AIH は type 1 に比して若年者に多く、急速に肝硬変に移行しやすいとされ、ステロイドが著効することから早期発見が重要であるが、日本で小児例の報告⁸⁾はきわめて少ない。さらに Manns ら⁹⁾は抗 soluble liver antigen (SLA) 抗体陽性例をあつめ type 3 AIH と称している。本抗体の主要抗原は Cytokeratin 8 と 18¹⁰⁾であることが報告され

ているが、日本では、その検討がされていない。筆者らは AMA 陽性の PBC と思われた症例 Is に AMA と異なる cytosol に存在する抗原に対する抗体を発見し、抗 Is 抗体と命名した¹¹⁾。本症例は肝機能異常を指摘されてから 14 年を経過しているが、自覚的には全身倦怠感、掻痒感、黄疸なく非進行性の患者であった。これまで経験した本抗体陽性の 15 症例を提示し考案する。

II. 方 法

対 象：関東の諸施設より AIH, PBC を疑われ、保健科学研究所に自己抗体検索を依頼された血清中、二重免疫拡散法で抗 Is 抗体と同一の沈降抗体を確認された 15 血清を対象とした。

抗体検索：抗体の検索は従来より施行されている二重免疫拡散法 (抗原はラット肝ミクロソーム分画、蛋白質 60 mg/ml)、間接蛍光抗体法、免疫沈降法によった¹¹⁾。

III. 症 例

患 者：76 歳男性。

主 訴：肝精査希望。

家族歴：特記すべきことなし。

既往歴：44 歳，十二指腸潰瘍にて手術，輸血を受けた。酒 1 合/日，約 50 年間。

現病歴：昭和 53 年検診にて肝障害を指摘された。

A 医院にて高血圧も指摘され治療を受けていたが，昭和 58 年 9 月，Al-p， γ -GTP 高値のため B 病院を紹介された。AMA 陽性で ERCP にて肝外胆道系病変は否定された。昭和 60 年肝生検目的のため入院。

入院時現症：身長 165 cm，体重 53.6 kg，体温 36.4°C，脈拍 72/分，整，血圧 160/86 mmHg，眼球結膜，眼瞼結膜に黄疸，貧血なし。リンパ節腫大，甲状腺腫大なし。心音純，呼吸音清。正中線上心窩部より臍下部にかけて手術痕を認めた。腹部は平坦かつ軟，肝脾腫触知せず。下肢には浮腫，紅斑なし。神経学的に異常なし。

入院時検査成績：表 1 に示すように末梢血，血液凝固系に異常なく，生化学的検査にて T.P. 8.8 g/dl， γ -gl 24.7% (2.2 g/dl)，TTT 47.9 単位，ZTT 20.2 単位，AST 60 IU/l，ALT 55 IU/l，Al-p 1419 IU/l， γ -GTP 614 IU/l と高値であった。IgG は正常値であったが，IgM 915 mg/dl と高値であった。ANA は 80 倍以下，AMA は間接蛍光抗体法で 160 倍陽性，ラット肝より抽出した microsome 分画を用いた二重免疫拡散 (DID) 法で抗 Is 抗体 32 倍陽性であった。

胃十二指腸透視：食道静脈瘤なし。

腹部超音波所見：肝左葉の軽度肥大，軽度の脾腫を認めた。

肝針生検像：昭和 60 年 9 月 26 日施行。小葉構造は比較的保たれており，肝細胞は軽度変性で focal necrosis が認められる。門脈域は細胞浸潤を伴い，軽度の拡大を呈するが，線維化はごく軽度に認めるにすぎない。granulomatous change や bile duct の破壊も認めない (図 1)。病理診断は chronic persistent hepatitis であった。以後の肝生検は施行されていない。

その後の臨床と検査経過：図 2 に示すように昭和 60 年 (1985 年) 10 月 5 日退院。以後 1~2 ヶ月に 1 度外来受診。特に発熱，多発性関節炎症状は認めなかったが，昭和 62 年頃より口渇を認め，冬になると手

表 1 Laboratory findings on admission

Urine	np	Serological Exam	
Feces	np	HBs Ag	(-)
Peripheral blood		HBs Ab	(+)
WBC	4,300/mm ³	HBe Ag	(-)
RBC	369×10 ⁴ /mm ³	HBe Ab	(+)
Hb	12.0 g/dl	HBc Ab	(+)
Ht	34.9%	HA-Ab	(-)
Plt	24×10 ⁴ /mm ³	HCV-Ab(C-100.3)	(-)
Hemogram	WNL	WaR	(-)
ESR	77 mm/1h	Immunological Exam	
Coagulation system		IgG	1,370 mg/dl
HPT	148%	IgA	466mg/dl
PT	10.8 sec.	IgM	915 mg/dl
APTT	39.5 sec.	RAHA	160
Fibrinogen	305 mg/dl	TGHA	<100
Blood chemistry		MCHA	<100
T.P.	8.8 g/dl	ASMA	(-)
γ -gl	24.7%	ANA	<80
T.B.	0.8 mg/dl	anti-DNA	80
TTT	47.9 KU	LE cell	(-)
ZTT	20.2 KU	AMA (IIF)	160
AST	60 IU/l	AMA (DID)	
ALT	55 IU/l	anti-M A	(-)
ALP	1,419 IU/l	anti-M B	(-)
γ GTP	614 IU/l	anti-M C	(-)
T. Chol	278 mg/dl	anti-p95 C(Is)	32
T.G.	136 mg/dl	anti-ENA	
BUN	21 mg/dl	anti-n RNP	(-)
creatinine	1.4 mg/dl	anti-Sm	(-)
uric acid	5.8 mg/dl	anti-SS A/Ro	(-)
		anti-SS B/La	(-)

指が冷たくなることがあった。しかし 2 相性の色調の変化はなかった。検査結果では平成 3 年 1 月までを通じ IgM のみでなく，IgG，IgA も上昇傾向を示した。ANA は当初マウス腎切片を使用されており陰性と判定されていたが，平成元年より培養細胞に変わったのち，ANA は 160 倍で陽性，discrete speckled であった。Al-p， γ -GPT は正常の 5~10 倍と持続的に高値，ALT，T.B. は緩徐であるが上昇傾向にある。

免疫沈降 (Immunoprecipitation, IPP) 法による抗体分析：³⁵S methionine 標識 HeLa 細胞抽出物と protein A sepharose 4 B CL 結合患者血清 IgG との結合物を SDS-PAGE で展開し，オートラジオグラフィで検索した (図 3)。lane 2 の本症例 IK は 140 kDa と 80 kDa にセントロメア C と B 蛋白を，60 kDa に SS-A 蛋白を，34 kDa，28 kDa に U1 RNP の A，

図 1 a Liver biopsied specimen demonstrated moderate mononuclear cell infiltration without fibrosis, showing slight enlargement of Glisson's area. Chronic non-suppurative destructive cholangitis (CNSDC) and granulomatous change were not observed.

図 1 b Follicle were relatively well conserved and focal necrosis was observed in hepatocytes.

B/B' 蛋白を沈降させていた。また lane 2~8 には DID 法で抗 Is 抗体陽性と判定した血清を用いた。1 例を除き、95 kDa の蛋白を沈降させており、本抗体を抗 p95 C と命名した。

15 症例を分析すると (表 2), 男女比は 2:13 で女性に多く、平均年齢はそれぞれ 83 歳と 59 歳であった。PBC の診断が 9 例, AIH の診断が 6 例であった。5 症例が膠原病の合併例であり、そのうち 4 例は頻回にわたり、drug allergy が認められた。本抗体陽性 PBC は、臨床的には Scheuer の I~II に属していた。小数例であるが軽症例が多かった。AMA は 320

以上の高値例は 4 例にすぎず、80 倍以下の低値例は 6 例であった。しかし AIH 診断した症例にも IgM あるいは IgA の高値例が多く認められ PBC に類似する点もあった。

IV. 考 案

抗 Is 抗体は以前報告したとおり、DID 法で検出された抗 liver cytosol 1 (LC 1) 抗体¹²⁾, また Rizzetto らが報告し、その後 type 2 AIH の marker 抗体である抗 LKM 1 抗体¹³⁾とも異なった抗体である。また Szosteck らは PBC 患者血清中にみられる nuclear

図 2 Seven year follow-up of patient I. K. : Laboratory findings

図 3 The immunoprecipitation pattern of sera from patients with autoimmune hepatic diseases

As marker, prototype sera containing anti-n RNP and anti-SS-A/Ro in lane 10, and anti-SS A/Ro alone in lane 9 were placed. Seven sera containing anti-p 95 C antibody were placed in lane 2~8. A 95 kDa band was detected in lane 2~8 except lane 6. Serum DH in lane 6, known to be anti-p 95 C antibody positive only at a 1 : 2 dilution which was considerable lower than that obtained from the other sera in lane 2~5 and lane 7~8, did not demonstrate a 95 kDa.

表 2 Laboratory findings of 15 patients with anti-p95 C antibody

No.	Name	Sex	Age	Diagnosis	ANA	AMA	a p95 C	IgG/IgA/IgM	AST/ALT	T.B.	T. chol	ALP/ γ GTP
1.	I.K.	m	83	AIH/SjS**	160	160	128	1370/466/915	60/ 55	0.8	278	1766/614
2.	G.S.	f	64	AIH/PSS**	80	20	32	nd nd nd	57/106	0.4	nd	695/638
3.	M.M.	f	54	PBC/SjS(I)*	20	80	32	1008/220/446	15/ 8	0.5	178	177/ 20
4.	N.T.†	f	61	AIH/MCTD/SjS**	20480	—	16	3245/645/474	44/ 31	0.3	130	74/ 15
5.	I.M.	f	55	PBC/RA**	160	320	64	nd nd nd	34/ 22	0.5	nd	288/ 29
6.	N.K.	f	54	PBC	—	320	32	nd nd nd	256/327	7.0	131	89/ 67
7.	T.S.	f	49	PBC	80	160	256	1618/140/799	25/ 22	0.4	nd	172/ 48
8.	N.K.	f	71	PBC	—	640	128	2468/438/1241	77/ 47	1.0	309	341/600
9.	K.A.	f	57	AIH	20	—	64	nd nd nd	21/ 22	2.1	176	122/ 6
10.	O.Y.†	m	83	PBC(II)*	—	640	8	1654/520/128	36/ 24	1.7	112	187/ 19
11.	D.H.	f	53	PBC(II)*	80	160	2	1545/391/577	35/ 41	1.0	261	490/260
12.	H.S.	f	76	AIH	320	10	256	1093/452/139	25/ 20	0.7	246	512/ 87
13.	N.K.	f	61	PBC(II)*	80	160	128	2440/407/1360	49/ 30	0.5	422	798/180
14.	A.A.	f	65	PBC	80	160	32	nd nd nd	15/ 30	0.7	nd	147/109
15.	N.K.	f	61	AIH	80	40	64	2130/447/761	21/ 17	nd	274	257/ 50

AIH : autoimmune hepatitis, SjS : Sjögren's syndrome, PSS : progressive systemic sclerosis,

MCTD : mixed connective tissue diseases, * : stage determined by Scheuer's classification,

** : recurrent drug allergy, † : deceased

dot 抗体を報告し¹⁴⁾対応抗原が 100 kDa としているか、抗 Is (p 95 C) 抗体には nuclear dot を認めず cytosol の抗原に対する抗体で明らかに異なるものである。

DID 法により抗 Is 抗体陽性を判定した 7 血清を³⁵S methionine 標識 HeLa 細胞抽出抗原を用いた IPP 法で検索したところ 1 例を除き 95 kDa の蛋白を沈降させた。陰性の 1 例は DID 法でも 2 倍陽性と他の血清に比し低力価であり、その後の治療により抗体が陰性化した可能性が考えられた。同抗体は膠原病患者血清中の自己抗体検索に用いられている家兎胸腺抽出物でも容易に検出されること、さらにヒト子宮頸癌扁平上皮細胞である HeLa 細胞を使用した IPP 法でも検出されることから、肝特異性抗体ではない。

細胞質分画 (mitochondria, microsome, cytosol)¹⁵⁾ を用いて、その反応性を検討すると、以前の報告¹¹⁾とおり抗 Is 抗体は cytosol 分画と最小蛋白濃度で反応することが確認された¹⁶⁾。したがってこの分画に主に存在していることがわかり、本抗体を蛋白の分子量と局在する細胞分画により抗 p 95 C 抗体と改名した。

本症例の自己抗体について検討してみた。血清生化学的には PBC に酷似しているが、免疫学的には抗セントロメア抗体は存在しているものの AMA はどうか？ マウス腎切片を用いた間接蛍光抗体法

では、近位、遠位尿細管細胞質を均質に弱く染色し、AMA 陽性での染色パターンとは異なっていた。IPP 法による 54 kDa は正常人血清にもみられ、非特異的と判定した。52 kDa の蛋白は抗 SS-A 抗体由来の蛋白¹⁷⁾か、branched chain α -ketoacid dehydrogenase (BCKD)、あるいは α -ketoglutarate dehydrogenase (KGDH) の E 2 component¹⁸⁾ を沈降させたのか不明である。少なくとも PBC の主要抗原である pyruvate dehydrogenase (PDH) の E 2 component である 74 kDa や protein X である 56 kDa を沈降させていないことは確かである。ちなみに抗 M 2 抗体 (ELISA 法・MBL 社製) は陰性であった。もし BCKD や KGDH の E 2 component に対する AMA 陽性にとれば、肝機能異常が指摘され、14 年経過し現在 83 歳の予後のよい無症候性 PBC と診断¹⁹⁾できるであろう。Berg らは予後のよい非進行性 PBC として抗 M 9 抗体単独例を報告している。筆者らは以前より抗 M 9 抗体と本抗体の類似性が多いことに気づいていた。第 1 に抗 M 9 抗体の対応抗原は mitochondria でなく liver cytosol 中にあると訂正されたこと、第 2 に間接蛍光抗体法では検出されない。第 3 に抗 M 9 抗体単独例は予後がよく非進行性であること、第 4 に出現頻度が抗 M 2 に比しまれであること、第 5 に対応抗原が 98 kDa と 59 kDa であると報告している。最近抗 M 9 抗体の対応抗原が glycogen phosphorylase であ

ることが判明した²⁰⁾。しかしながら抗 M 9 抗体を手していないので抗 p 95 C 抗体との異同については、慎重な検討が必要である。

最後に昭和 60 年の肝針生検の所見のみから PBC を否定できない。現在 83 歳と高齢のため再度肝生検を施行することは困難であろう。今後の症例の積み重ねが必要である。

V. 結 語

AMA と共存し、鑑別を要する抗 p 95 C 抗体陽性の 83 歳男性例を報告した。77 歳時の肝針生検で chronic persistent hepatitis の像であるが、PBC も完全に否定できない。本症例は肝機能異常を指摘され 14 年経過しているが、進行はきわめて緩徐であると思われた。

文 献

- 1) Walker, J.G., Doniach, D., Roitt, I.M. : Serological tests in diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet*, 1 : 827~831, 1965.
- 2) Berg, P.A., Klein, R. : Autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Springer Semin Immunopathol.*, 12 : 85~99, 1990.
- 3) Mackay, I.R., Taft, L.I., Cowling, D.C. : Lupoid hepatitis. *Lancet*, 2 : 1323~1326, 1956.
- 4) Johnson, G.D., Holborow, E.J., Glynn, L.F. : Antibody to smooth muscle in patients with liver diseases. *Lancet*, 2 : 878~879, 1965.
- 5) Hopf, U., Meyer Zum Buschenfelde, K.H., Arnold, W. : Detection of a liver membrane autoantibody in HBs Ag negative chronic active hepatitis. *N. Eng. J. Med.*, 294 : 578~582, 1976.
- 6) Rizzetto, M., Swana, G.T., Doniach, D. : Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin. Exp. Immunol.*, 15 : 331~344, 1973.
- 7) Miyakawa, H., Kako, H., Nagai, K., Hino, K., Iwabuchi, S., Miyachi, K., Okamoto, H., Mayumi, T. : HCV-RNA in type 2 autoimmune hepatitis. *Amer. J. Gastroenterol.*, 86 : 1688~1689, 1991.
- 8) Smith, M.G.M., Williams, R., Walker, G., Rizzetto, M. : Hepatic disorders associated with liver/kidney microsomal antibodies. *Brit. Med. J.*, 2 : 80~84, 1974.
- 9) Manns, M., Gerken, G., Kyriatsoulis, A., Staritz, M., Meyer Zum Buschenfelde, K.H. : Characterization of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet*, 1 : 292~294, 1987.
- 10) Wächter, B., Kyriatsoulis, A., Lohse, A.W., Gerken, G., Meyer Zum Buschenfelde, K.H., Manns, M. : Characterization of liver cyto-keratin as a major target antigen of anti-SLA antibodies. *Hepatology*, 11 : 232~239, 1990.
- 11) 松嶋 広・宮地清光・鷹野佐恵子・樋渡恒憲・荒川正一・加藤真明・保坂洋夫 : 自己免疫性肝疾患にみられる抗 LKM-1 抗体と抗 Is 抗体。日臨免誌, 13 : 277~285, 1990.
- 12) Martini, E., Abuaf, N., Cavalli, F., Durand, V., Johanet, C., Homberg, J.C. : Antibody to liver cytosol (anti-LC 1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology*, 8 : 1662~1666, 1988.
- 13) Homberg, J.C., Abuaf, N., Bernard, O. : Chronic active hepatitis associated with anti-liver/kidney microsome antibody type 1 : a second type of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 7 : 1333~1339, 1987.
- 14) Szosteki, C., Krippner, H., Penner, E., Bautz, F.A.S. : Autoimmune sera recognize a 100 kDa nuclear antigen (sp-100). *Clin. Exp. Immunol.*, 68 : 108~116, 1987.
- 15) Schneider, W.C., Hogeboom, G.H. : Intracellular distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.*, 183 : 123~128, 1950.
- 16) 宮地清光・鷹野佐恵子・松嶋 広・唐沢英偉・三木 亮 : 自己免疫性肝疾患，とくに原発性胆

- 胆汁性肝硬変と慢性活動性肝炎重複例に出現する新しいマーカー抗体. 日臨免誌, 11 : 216~223, 1988.
- 17) Ben-Chetrit, E., Chan, E.K.H., Sullivan, K.F., Tan, E.M. : A 52-kDa protein in a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J. Exp. Med.*, 167 : 1560~1571, 1988.
- 18) Mackay, I.R., Gershwin, M.E. : Molecular basis of mitochondrial autoreactivity in primary biliary cirrhosis. *Immunol. Today*, 10 : 315~318, 1989.
- 19) 太田康幸 : 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 診断基準. 肝臓, 73 : 657, 1992.
- 20) Klein, R., Berg, P.A. : Anti-M 9 antibodies in sera from patients with primary biliary cirrhosis recognize an epitope of glycogen phosphorylase. *Clin. Exp. Immunol.*, 81 : 65~71, 1990.
-