## 3) 原発性胆汁性肝硬変

新潟大学医学部第三内科 吉田 俊明・早川 晃史
伊藤 信市・上村 朝輝
朝倉 均
新潟大学医療技術短期大学部 石原 清

## Primary Biliary Cirrhosis

Toshiaki YOSHIDA, Akifumi HAYAKAWA, Shin'ich ITOH,
Tomoteru KAMIMURA and Hitoshi ASAKURA

*The Third Division, Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine*

Kiyoshi ISHIHARA

*Collage of Biomedical Technology, Niigata University*

Antimitochondrial antibodies, serological hallmarks of primary biliary cirrhosis, recently were found to be directed against the E2 subunits of mitochondrial dehydrogenase complexes. The first objective of this study was to extend these findings and to determine whether purified immunoglobulin from the sera of patients with primary biliary cirrhosis inhibit activity of these dehydrogenase complexes in vitro. The second objective was to confirm whether the detection of antibodies against mitochondrial dehydrogenase complexes contributes the diagnosis of primary biliary cirrhosis and prediction of prognosis of the disease. Purified immunoglobulin from 13 patients with various titer of mitochondrial antibodies showed concentration-dependent inhibition of activity of the dehydrogenase complexes, and close correlation was observed between inhibitory activity against pyruvate dehydrogenase complex and the reciprocal titer of immunoglobulin against this complex. Of 100 patients with primary biliary cirrhosis, 79, 77 and 24 patients showed positive test for antibody against pyruvate dehydrogenase, branched-chain ketoacid dehydrogenase, and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, respectively by enzyme linked immunosorbent assay. Only 7 patients with primary biliary cirrhosis showed none of positive test for antibodies against these enzyme complexes. Patients with positive for antibody against pyruvate dehydrogenase complex showed higher level of serum cholesterol and bilirubin than those with negative. Furthermore, all of the patients with positive test for antibodies against pyruvate dehydrogenase complex showed early stage of liver histology. We conclude that the detection of antibody against pyruvate dehydrogenase complex, besides serving as diagnostic markers for primary biliary cirrhosis, may contribute to predict the prognosis of patient with this

Reprint requests to: Toshiaki YOSHIDA, The Third Division, Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町 新潟大学医学部第三内科 吉田俊明

disease.

Key words: Primary biliary cirrhosis, Anti-mitochondrial antibodies, Anti-pyruvate dehydrogenase complex antibodies
原発性胆汁性肝硬変，抗ミトコンドリア抗体，抗ピルビン酸脱水素酵素抗体

## 1. 目　　的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）は胆汁うっ滞を主徴とする慢性の進行性肝疾患である．組織学的には慢性非化膿性破壊性胆管炎と肝の肉芽腫形成を特徴とする[1)-3)]．病因はいまだ不明であるが，自己抗体の出現や細胞性免疫異常より，その病状の進展には自己免疫的機序が関与しているものと想定されている．

PBC 患者血清中には高頻度，かつ高力価で抗ミトコンドリア抗体（AMAs）が出現し，疾患特異性も高く，PBC

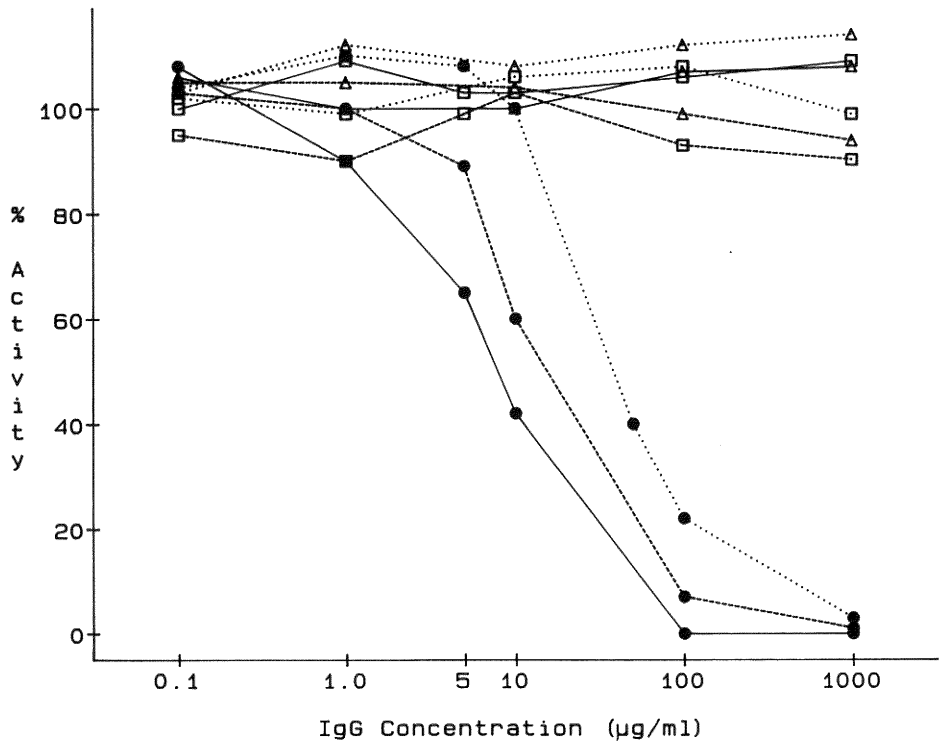



**Fig. 1** Assay for enzyme inhibition by IgG. Enzyme activities were measured in the presence of increasing concentrations of purified IgG from PBC patients (●), alcoholic liver disease (△) or normal subject (□). For ease of comparison, activities of PDH (———), BCKD (- - -) and KGDH (·····) are shown as a percentage of no IgG control. Each point is the average value of two assays, which varied lessthan 7% of the mean. The 100% activities were as follows: PDH, 1.3 μmole NADH/min per mg protein; BCKD 0.7 μmole NADH/min per mg protein; KGDH 0.3 μmole NADH/min per mg protein. Note that 50% inhibition of PDH, BCKD and KGDH were observed by the IgG from the patient at concentrations of 8, 15, and 38 μg/ml, respectively. The IgG from an alcoholic liver disease or a normal subject did not inhibit any of three enzyme activities even at 1,000 μg/ml.

の診断に有用である．近年 AMAs の対応抗原がピルビン酸脱水素酵素複合体（PDH）[4]，分枝鎖ケト酸脱水素酵素複合体（BCKD）[5]，αケト酸脱水素酵素複合体（KGDH）[6] であることが証明された．我々は PBC 患者血清より IgG を精製し，これらの酵素活性の抑制作用を検討した．また，個人の酵素複合体を精製し，それらを抗原とした ELISA 法を開発し，PBC 患者血清中の AMAs を anti-PDH，anti-BCKD，anti-KGDH として個別に測定した．さらにこれらの抗体の出現の有無と臨床症状との関連性について検討した．

## 2. 対象および方法

当教室および関連病院で組織学的，血清学的に PBC と診断された 100 例について検討した．IgG の精製は McKinney らの方法[7] により行った．PDH はウシ心より Stanley らの方法[8] で，BCKD はウシ腎より Lawson らの方法[9] で精製した．KGDH は Sigma 社のウシ心 KGDH をセファロース CL-2B によるゲル ろ過法で精製した．いずれの精製酵素複合体も SDS-PAGE および Western blot 法によりその精製度を検討し，各酵素間のクロスコンタミネーションのないことを確認した．PDH，BCKD および KGDH の酵素活性は分光光度計を用いたカイネティックアッセイにより算出した[10]．IgG による酵素活性阻害作用は以下の方法で検討した．即ち，被検 IgG と 5 分間プレインキュベートした酵素の活性を測定し，IgG 非添加の酵素活性との百分率で表した．anti-PDH，anti-BCKD，および anti-KGDH の測定には ELISA 法を用いた．96穴プレートにそれぞれの精製酵素複合体（0.5 ug/well）を固相化した．1％ BSA-PBS でポストコートし，1,000 倍希釈の被検血清

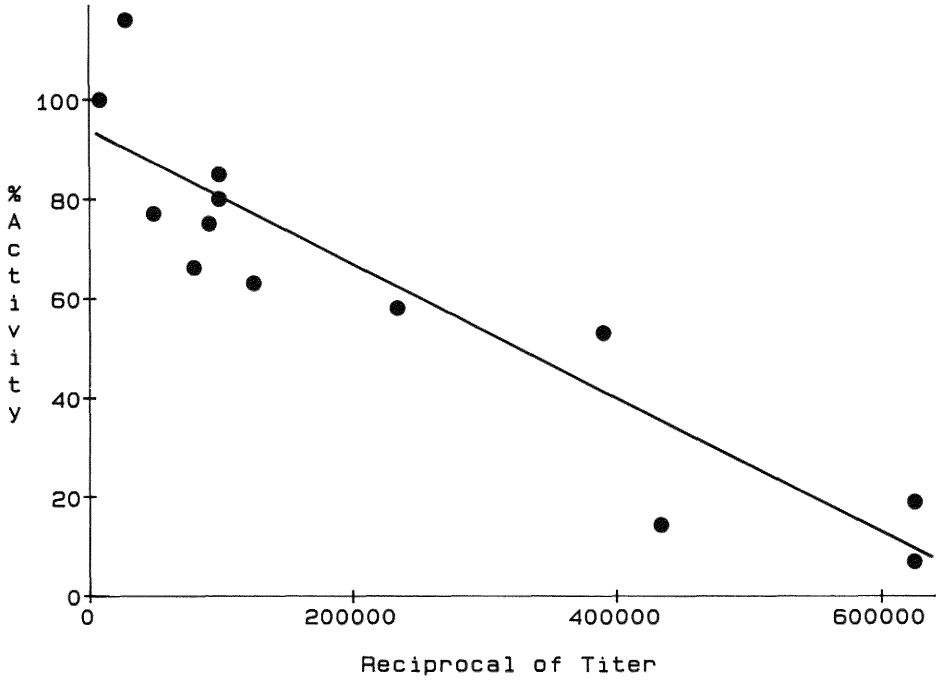



**Fig. 2** Correlation between enzyme inhibitory activity and antibody activity against PDH complex estimated by ELISA. The enzyme inhibition assay for the PDH complex was carried out in the presence of 10 μg/ml of IgGs from AMA-positive PBC sera. The lowest IgG concentration that produced a positive signal by ELISA was obtained from titration curves against PDH complex. The IgGs titers are expressed as dilutions of 20 mg of IgG/ml. The data show a high degree of correlation ($r=-0.917$, $n=13$) between antibody activity against PDH complex by ELISA and inhibition of enzyme activity.

を室温1時間，さらに HRPO 標識の抗ヒト免疫グロブリン抗体（4,000倍希釈）を1時間反応させた．ABTS で10分間発色させ，OD412 を測定した．カットオフ値は正常血清の平均 OD+6SD とした．

## 3．結　　果

精製 IgG による酵素活性阻害作用

AMAs 陽性の PBC 患者の血清より精製した IgG は PDH，BCKD および KGDH の酵素活性を阻害した（図1）．予備実験によると各酵素は IgG を添加すると即座に酵素活性の低下を示し，約2分で nadir に達した．PBC 由来の IgG では PDH，BCKD，KGDH の酵素活性を50%阻害する濃度はそれぞれ 8 ug/ml，15 ug/ml，38 ug/ml であった．健常者由来の IgG は 1,000 ug/ml の濃度でも阻害作用を示さなかった．AMAs 陽性の PBC 患者由来 IgG（13検体）の PDH に対する酵素活性阻害作用は anti-PDH の抗体価と正の相関を示した（図 2）．

PBC 患者血清の anti-PDH，anti-BCKD，anti-KGDH スクリーニング検査

PBC 患者100例の各抗体の出現型は表 1 に示す如くであり，anti-PDH，anti-BCKD，anti-KGDH の陽性率はそれぞれ79%，77%，24%であった．また三抗体ともに陰性の症例は7%であった．

臨床症状と anti-PDH，anti-BCKD，anti-KGDH との関連性

臨床経過の追跡調査が可能であった PBC 症例70例について，anti-PDH の有無と臨床像との関連性を検討した．anti-PDH 陽性の PBC 症例は55例，anti-PDH 陰性の PBC は15例であった．各群の年齢，診断時の GPT，アルカリフォスファターゼ，IgM 値に有意差を認めなかったが，コレステロールおよび血清ビリルビン値は anti-PDH 陽性群が有意に高値であった（表 2）．組織学的検索では，anti-PDH 陽性群の55例中43例が，また anti-PDH 陰性群の15例全例が Scheuer の I 期または II 期の初期病変を示した（表 3）．無症候性 PBC は anti-PDH 陽性群の55例中32例であり，anti-PDH 陰性群では15例中13例であった．anti-PDH 陽性群の55例中10例が黄疸を伴う症候性 PBC であり，anti-PDH 陰性の症例はいずれも無黄疸であった．anti-BCKD および anti-KGDH の有無と臨床像の間に関連性は認められなかった．

表 1　PBC 100例における各抗体の出現型

| anti-PDH | anti-BCKD | anti-KGDH | 例数 |
|---|---|---|---|
| + | + | + | 20 |
| + | + | − | 44 |
| + | − | − | 3 |
| + | − | − | 12 |
| − | + | + | 0 |
| − | + | − | 13 |
| − | − | + | 1 |
| − | − | − | 7 |

## 4．考　　案

今回の主要所見は次の4点である．すなわち，a）AMAs 陽性の PBC 由来の IgG は PDH，BCKD，KGDH の酵素活性を阻害し，b）PDH 酵素に対する阻害率は anti-PDH の抗体価との間に高い相関を示した．c）anti-PDH，anti-BCKD，anti-KGDH のいづれかが陽性の PBC は93%と高率であり，d）anti-PDH 陽性の PBC 症例では臨床像の進展している症例が多い傾向が認められた．

PBC 血清中に出現する anti-PDH は強い酵素阻害作用を有するが，後に anti-PDH の対応抗原は E2 サブユニットの活性中心であるリポ酸結合ドメインである

表 2　臨　床　検　査　成　績

| anti-PDH | 陽　性　群 | 陰　性　群 | |
|---|---|---|---|
| 例数 | 55 | 15 | |
| 年齢 | 52.8± 11.7 | 57.7± 6.3 | |
| GPT | 81.7± 66.5 | 60.3± 67.9 | |
| AIP | 1015.3±741.2 | 639.3±534.5 | |
| Cholesterol | 249.9± 87.3 | 198.6± 53.0 | $p<0.01$ |
| Bilirubin | 1.9± 3.2 | 0.6± 0.4 | $p<0.01$ |
| IgM | 538.6±291.7 | 384.9±272.6 | |

表 3　組織学的 Stage 分類

| anti-PDH | 陽性群 | 陰性群 |
|---|---|---|
| Scheuer Ⅰ | 35 | 13 |
| Ⅱ | 8 | 2 |
| Ⅲ | 5 | 0 |
| Ⅳ | 7 | 0 |
| | 55例 | 15例 |

ことが判明し[11]，生化学的にも酵素阻害作用が裏付けられた．PDH，BCKD，KGDH はそれぞれ解糖系，アミノ酸代謝，TCA 回路における重要な酵素である[12]．生体内でこれらの酵素活性が障害されるなら，重大な代謝異常を示すはずである．しかしながら，PBC 症例でこれらの代謝障害を示唆する報告はない．これらの酵素の細胞内局在はミトコンドリア内膜であり，血清中の抗体が直接酵素と接触することは考えにくい．したがって，AMA の持つ酵素阻害作用そのものは PBC の病因に関与していないものと考えられる．

当教室での PBC 症例の IF 法を用いた AMAs 陽性率は85%で，ミトコンドリア内膜を抗原とした ELISA 法を用いた AMAs（anti-M2）の陽性率は95%であった．精製 PDH，BCKD，KGDH を抗原とした ELISA 法ではその陽性率は93%で，ほぼ従来の ELISA 法と同等の検出率であった．各抗体と臨床像との関連性を検討すると，anti-PDH 陽性の PBC 症例は病態の進行した例が多かった．従来の AMAs（IF）および anti-M2（ELISA）の出現の有無と臨床像には関連性が認められておらず，AMAs のうち主要な抗原である PDH に限定して検討した場合にのみこの傾向が示された．したがって，anti-PDH の出現は PBC の診断のみならず，予後推定のマーカーとなる可能性があるものと推測される．この問題についてはさらに抗体価の変動などと，臨床像と関連性を検討する必要がある．

## 参　考　文　献


1) **Kaplan, M.M.**: Primary biliary cirrhosis. N Engl J Med, **316**: 521～528, 1985.

2) **Vierling, J.M.**: Primary biliary cirrhosis. In: Zakim D, Boyer TD, eds. Hepatology: a textbook of liver disease. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, **1990**: 1158～1205.

3) **Sherlock, S.**: Primary biliary cirrhosis. In: SchiffL, Schiff ER, eds. Diseases of the liver, 6th ed. Philadelphia: Lippincott, **1987**: 979～1000.

4) **Yeaman, S.J., Fussey, S.P.M., Danner, D.J., James, O.F.W., Mutimer, D.J. and Bassendine, M.F.**: Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. Lancet, **1**: 1067～1070, 1988.

5) **Surh, C.D., Danner, D.J., Ahmed, A., Coppel, R.L., Mackay, I.R., Dickson, E.R. and Gershwin, M.E.**: Reactivity of primary biliary cirrhosis sera with a human fetal liver cDNA clone of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase dihydrolipoamide acyltransferase, the 52 kD mitochondrial autoantigen. Hepatology, **9**: 63～68, 1989.

6) **Fregeau, D.R., Prindiville, T., Coppel, R.L., Kaplan, M., Dickson, E.R. and Gershwin, M.E.**: Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase activity by a distinct population of autoantibodies recognizing dihydrolipoamide succinyl-transferase in primary biliary cirrhosis. Hepatology, **11**: 975～981, 1990.

7) **McKinney, M.M. and Parkinson, A.**: A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from sera and ascites fluid. J Immunol Methods, **96**: 271～278, 1987.

8) **Stanley, C.J. and Perham, R.N.**: Purification of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes from ox heart by a new method. Biochem, J, **191**: 137～154, 1980.

9) **Lawson, R., Cook, K.G. and Yeaman, S.J.**: Rapid purification of bovine kedney branched-chain 2-oxoacid dehygrogenase complex containing endogenous kinase activity. FEBS Lett, **157**: 54～58, 1983.

10) **Heffelfinger, S.C., Sewell, E.T. and Danner, D.J.**: Identification of specific subunits of highly purified bovine liver branched-chain ketoacid dehydrogenase. Biochemistry, **22**: 5519～5522, 1983.