

劇症化時DNAポリメラーゼ高値を呈した，HBE抗体陽性HBV-DNA陰性重症肝炎の2剖検例

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7061

<症例報告>

劇症化時 DNA ポリメラーゼ高値を呈した, HBe 抗体陽性 HBV-DNA 陰性重症肝炎の 2 剖検例

足立 浩司 金子 周一 柳 昌幸 松下 栄紀
 卜部 健 寺田 光宏 寺崎 修一 稲垣 豊
 鷺浦 雅志 小林 健一* 木谷 恒 西出啓二郎**
 細 正博***

要 旨 : HBe 抗体陽性 B 型慢性肝疾患の経過観察中, 劇症化し, 死亡した 2 剖検例を経験した。2 例とも DNA ポリメラーゼ (DNA-P) は陽性であったが, dot blot 法による HBV-DNA は陰性であった。そこで, 2 症例における DNA-P の意義と劇症化の関連を検討するため, PCR 法による HBV-DNA, 組織中 HBe 抗原の検出と DNA-P 反応産物の電気泳動法による解析を行なった。肝組織において HBe 抗原は検出されず, また PCR 法では HBV-DNA は検出されたが, HBV 量は少ないと判定した。さらに, DNA-P 反応産物は電気泳動でスミアとなり, この DNA-P は HBV 由来とは考えられなかった。以上より, 今回の劇症化には HBV 以外の機序が関与しており, このような症例における DNA-P の解釈には注意が必要と考えられた。なお, HCV 抗体を測定した結果, 症例 1 のみ陽性であり, その劇症化に HCV の関与が示唆された。

索引用語 : DNA ポリメラーゼ Acute on chronic HBe 抗体陽性 B 型慢性肝炎
 組織中 HBe 抗原 PCR 法

はじめに

B 型慢性肝疾患における e 抗原から e 抗体への sero-conversion は B 型肝炎ウイルス (HBV) の増殖の低下を意味し, 一般に肝炎も鎮静化することが知られている¹⁾。しかし, 一部の症例においては, e 抗体陽性にもかかわらずトランスアミナーゼ値の変動を認め, 肝病変が進行することが問題となっている^{2-5,9)}。こうした症例では, DNA ポリメラーゼ (DNA-P), IgM-HBe 抗体の陽性化や e 抗原の再出現を認めることがあるため, 本病態に, HBV 増殖の再燃 (reactivation) が関与しているものと考えられている^{7,8)}。また, B 型慢性肝疾患の経過中に急性肝不全様の症状を呈する, いわゆる acute on chronic が問題となっているが, その機序に関しては, HBV の reactivation や他の因子の関与などが考えられている¹⁰⁻¹²⁾。

今回我々は, e 抗体が持続陽性にもかかわらず劇症

化し, その際, DNA-P が陽性であったため B 型肝炎の再燃が推測されたが, dot blot 法による検索では HBV DNA が陰性であった慢性肝疾患の 2 症例を経験し, 両者における劇症化の機序を明らかにする目的で各種 HBV の再燃化のマーカー, および C 型肝炎ウイルス (HCV) 抗体について検討したので報告する。

症例呈示

症例 1 : 70 歳, 男性, 昭和 55 年 HBsAg, eAg 両者陽性を指摘され, 昭和 58 年, 肝生検にて慢性非活動性肝炎と診断された。昭和 62 年より eAg は消失し, e 抗体が持続陽性となっていた。昭和 63 年 10 月食欲不振, 全身倦怠感を自覚し, 黄疸が出現したため当科入院となった。入院時検査成績では, 高度の肝障害を認め, ウイルスマーカーについては, HBe 抗体陽性で, IgM-HBe 抗体, delta 抗体, IgM-HA 抗体は陰性であった。また, DNA-P は 404cpm と陽性であったが, dot blot 法による HBV-DNA は陰性であった (Table 1)。入院後, acute on chronic として血漿交換療法, IFN 投与を行い, GPT, DNA-P は低下したものの, 第 20 病日肝不全が進行し死亡した (Fig. 1)。剖検所見では, 肝細

* 金沢大学医学部第 1 内科

** 厚生連高岡病院内科

*** 金沢大学医学部第二病理

Table 1 Laboratory data on admission of patient 1.

WBC	5,900 /mm ³	T.P	7.5 g/dl
RBC	412×10 ⁴ /mm ³	Alb	48.2% α ₁ 2.8%
Hb	12.4 g/dl	α ₂	6.8% β 4.8%
Ht	38.6 %	γ	37.4%
Plt	158×10 ³ /mm ³	ZTT	56.0 u
HBsAg	(+)	TTT	44.1 u
(>10,240, RPHA)		ALP	234 IU/L
anti-HBs	(-)(0.4, RIA)	GOT	1,662 IU/L
HBeAg	(-)(0.5, RIA)	GPT	833 IU/L
anti-HBe	(+)(100, RIA)	LDH	670 IU/L
anti-HBc(IgM)		γ-GTP	65 IU/L
(-)(0.9, RIA)		T-Bil	20.0 mg/dl
DNA-P	(+)(404CPM)	D-Bil	11.1 mg/dl
HBV-DNA	(-)	PT	16.8 sec
anti-delta	(-)	HPT	24.0 %
anti-HA(IgM)			
(-)(0.6, RIA)			

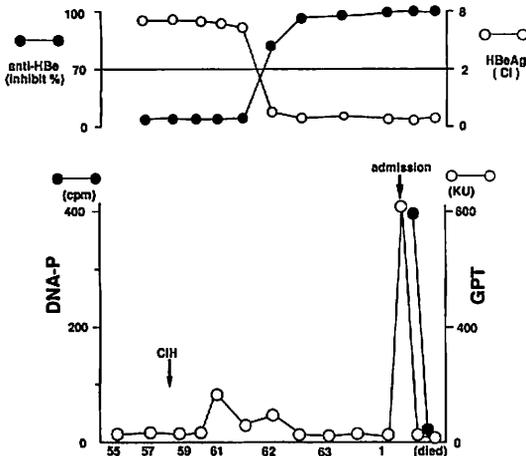


Fig. 1 Clinical course of patient 1.

胞の広範な脱落，および強い胆汁鬱帯を認め，亜広汎性肝壊死の状態であり，所々に線維化及び小葉構造の歪みも認められ，いわゆる acute on chronic の組織像と一致する所見であった (Fig. 2a).

症例 2 : 64歳，女性，昭和63年7月当院精神科にて HBs 抗原陽性を指摘された。本年3月食欲不振，全身倦怠感が出現し，検査成績では，高度の肝障害を認め，acute on chronic を疑われ当科入院となった。ウィルスマーカーでは，HBe 抗体は陽性で，IgM-HBc 抗体，delta 抗体および IgM-HA 抗体は陰性であった。また，DNA-P は陽性で，dot blot 法による HBV-DNA は陰

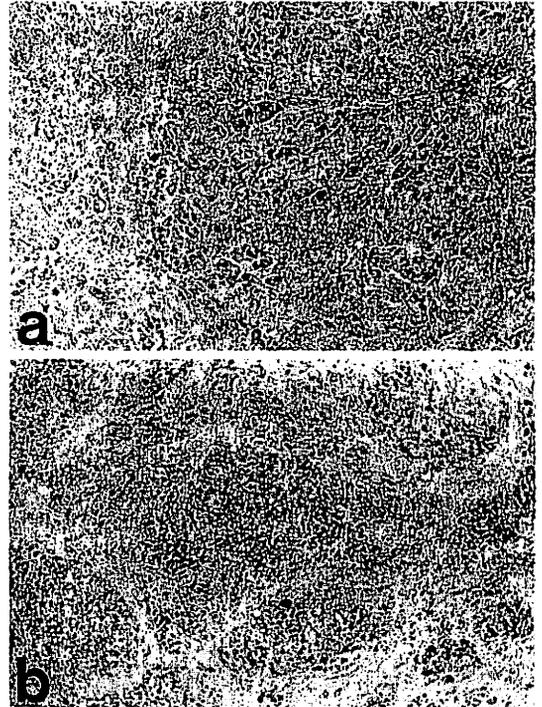


Fig. 2 Histological findings of the autopsied liver show extensive necrosis of hepatocytes. (a : case 1, b : case 2)
Case 2. 64 . F.

Table 2 Laboratory data on admission of patient 2.

WBC	4,200 /mm ³	T.P	6.7 g/dl
RBC	383×10 ⁴ /mm ³	Alb	51.5% α ₁ 3.1%
Hb	13.0 g/dl	α ₂	6.5% β 4.9%
Ht	38.9 %	γ	34.0%
Plt	91×10 ³ /mm ³	ZTT	24.2 u
HBsAg	(+)(36.0, RIA)	TTT	23.7 u
anti-HBs	(+)(2.2, RIA)	ALP	403 IU/L
HBeAg	(-)(0.3, RIA)	GOT	1,183 IU/L
anti-HBe	(+)(99.5, RIA)	GPT	833 IU/L
anti-HBc(IgM)		LDH	833 IU/L
(-)(0.9, RIA)		γ-GTP	111 IU/L
DNA-P	(+)(829CPM)	T-Bil	30.8 mg/dl
HBV-DNA	(-)	D-Bil	22.0 mg/dl
anti-delta	(-)	PT	16.0 sec
anti-HA(IgM)		HPT	30.0 %
(-)(0.5, RIA)			

性であった (Table 2)。入院後，血漿交換療法などを行ない，GPT, DNA-P の低下を認めたものの第43病日肝不全にて死亡した (Fig. 3)。剖検所見では，広範な

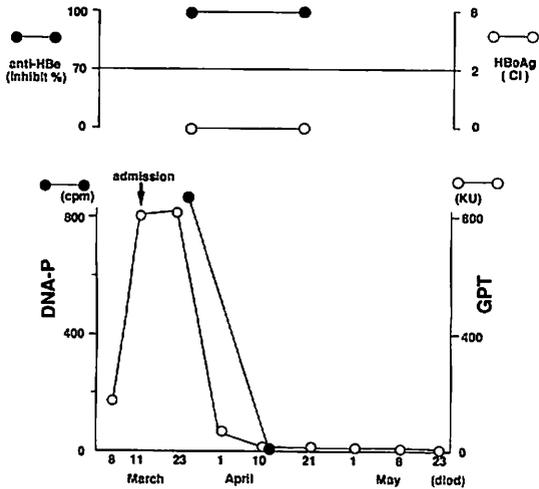


Fig. 3 Clinical course of patient 2.

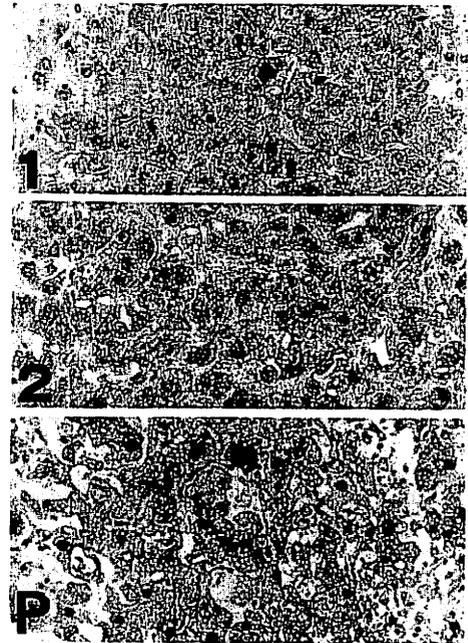


Fig. 4 Localization of HBeAg in the autopsied liver. (1 : case 1, 2 : case 2, P : positive control)

肝細胞壊死と胆汁の鬱滯を認めた (Fig. 2b).

方法と成績

HBV 再燃化のマーカーとして組織中の HBc 抗原、および血中の HBV-DNA を検討した。また、DNA-P と HBV の関連を検討するため DNA-P 反応産物の電気泳動法による解析を行なった。さらに、HCV 抗体を EIA 法 (オルソ社製キット) で測定した。

1. 組織中 HBc 抗原の検討

HBc 抗原の染色は、e 抗原陽性の肝不全で死亡した症例を陽性コントロールとして、パラフィン包埋された剖検肝において、ニチレイの BSA-PO(R) キットを用いた BSA 法 (Biotin-Streptavidin 法) でおこなった。結果を Fig. 4 に示す。コントロール例では核及び細胞質に HBc 抗原が染色されているのに対し、症例 1 及び 2 では肝組織中に HBc 抗原は認められなかった。

2. 血中 HBV-DNA の検出

HBV-DNA は当科入院時の血清を用いアルカリ法にてサンプル DNA を調整した。PCR 法は、すでに報告したごとく¹³C 抗原領域のプライマーセットを用いて double PCR 後、3% アガロースゲルにて電気泳動し、続いてエチジウムブロマイドで染色後、DNA をバンドとして検出した。結果を Fig. 5 に示す。lane 1, 2, 7, 8 は dot blot 法にて HBV-DNA 陽性を示す 2 例をコントロールとして用いた。症例 1 は lane 3, 4 で症例 2 は lane 5, 6 であるが、いずれも予想される大きさに DNA のバンドを認め、2 症例とも血中に HBV-DNA が存在することが示された。

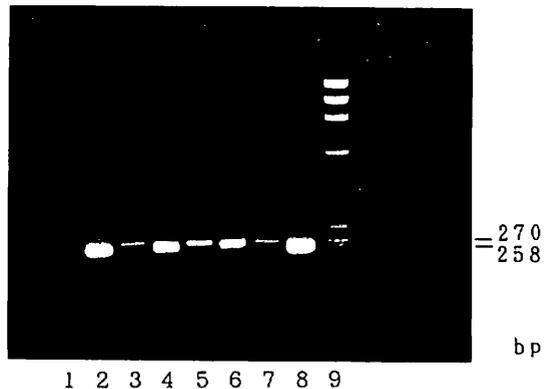


Fig. 5 HBV-DNA detection by Polymerase Chain Reaction (PCR). 10 μ l of serum was amplified by PCR using HBV specific primers. Amplified samples were analyzed by 3% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. (lanes 1, 2, 7, 8: positive control. lanes 3, 4: case 1. lanes 5, 6: case 2. lanes 1, 3, 5, 7: first PCR samples. lanes 2, 4, 6, 8: double PCR samples. bp: basepairs)

3. DNA-P と HBV の関連に関する検討

DNA-P が陽性であった当科入院時の血清を用いて

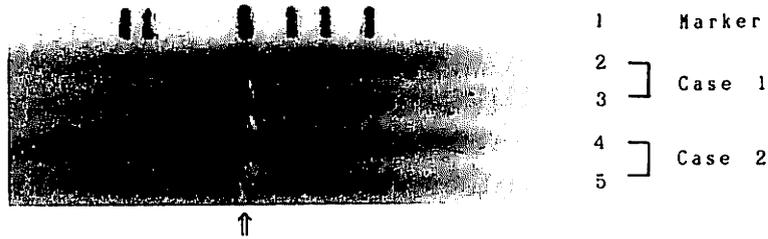


Fig. 6 Analysis of DNA-P products by autoradiography. 80 μ l of serum was incubated with 32 P-dCTP. 40 μ l of the resultant sample was analyzed by electrophoresis followed by autoradiography. Electrophoresis was duplicated using same sample. (ie, lane 2 and 3, lane 4 and 5)

検討した。反応基質として 32 P-dCTPを用いて反応後、電気泳動し、オートラジオグラフィを行なった¹⁴⁾。反応産物は、Fig. 6に示すようにスミアとなり、矢印で示したHBV由来DNA-P反応産物で予想される位置にバンドは認めなかった。

4. HCV抗体の測定

HCV抗体はEIA法(オルソ社製キット)で測定した。結果は症例1が陽性(OD値2.409)、症例2は陰性(OD値0.353)であった。

考 察

e抗体陽性B型慢性肝炎患例における、肝炎の再燃には、HBVの他、HAV、HDV、HCVの重感染や薬剤、自己免疫の関与などが考えられる。なかでも、Hoofnagleらがe抗体陽性例におけるHBVのreactivationを報告して以来、e抗体陽性例においても、DNA-P、IgM-HBe抗体の出現、時にeAgの再出現を認める病態があることが見いだされ、肝病変の進行を合わせ問題となっている。そこで本症例のようにe抗体陽性B型慢性肝炎例におけるトランスアミナーゼの増悪時にはDNA-P、IgM-HBc抗体を測定することが一般化しており、事実、頻繁に採血し得た例ではこれらのマーカーが陽性化されることが多い^{6,8)}。

本症例でも、DNA-Pが陽性であったためIgM-HBc抗体陰性、e抗体持続陽性であったもののHBVの再燃による肝炎の増悪と考え、症例1では、ウイルスのreplicationを抑える目的で、IFN投与を行なった。一般に、DNA-P陽性血清はほとんどがdot blot法によるHBV-DNAにて陽性となることが知られているが、今回検討した2症例では、ともに検出されず、PCR法によるHBV-DNAの結果と合わせ、HBV-DNAは血中に存在するものの、HBV-DNA量はdot blot法による検出感度限界の0.1pg以下であったと思われる。

そこで、さらに本症例で得られたDNA-PがHBV由来のものであるか否かを検討するため、アガロースゲル電気泳動法をおこなった。反応産物は、HBVのDNA-Pで得られるものと異なり、種々のサイズの反応産物を示すスミアとなり、本症例のDNA-PがHBVに特異的でないことが示された。このように現行のDNA-P測定法では、ポスト由来やバクテリア由来などによる偽陽性が生じる可能性も考えられるが、今回はその点については検討しなかった。以上より、本症例における劇症化にはHBV以外の機序が関与しており、このような病態においては、DNA-Pの解釈に注意が必要と考えられた。最後に、入院時の血清にてHCV抗体を測定した結果、症例1では陽性でしかもOD値は2.409と高値を示し、劇症化にHCVの関与が強く示唆された。症例2では、HCV抗体は陰性であったが、劇症化におけるHCVの関与は否定できず、今後さらにPCR法によるHCV-RNAの検出などの検討が必要と思われた。

文 献

- 1) Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Seeff LB, et al: Seroconversion from hepatitis Be antigen to antibody in chronic type B hepatitis. *Ann Intern Med* 94: 744-748, 1981
- 2) 三浦正澄, 中村 信, 中野善之, 他: HBe抗体持続陽性にもかかわらず血中HBV-DNA polymerase活性およびHBV-DNAが持続陽性のB型慢性肝炎例で劇症化により死亡した1例. *肝臓* 26: 1522-1527, 1985
- 3) 矢野右人: 肝炎ウイルスキャリアー. *臨床成人病* 16: 1129-1134, 1986
- 4) 熊田博光, 村島直哉, 中村郁夫, 他: e抗体持続陽性例の予後と治療. *肝臓* 11: 803-808, 1985

- 5) Yun-Fan Liaw, Dar-In Tai, Chia-Wing Chu, et al: Acute exacerbation in chronic type B hepatitis: Comparison between HBe-Ag and antibody-positive patients. *Hepatology* 7(1): 20-23, 1987
- 6) 奥野忠雄, 武田 誠, 中島年和, 他: HBe 抗体持続陽性 B 型慢性肝疾患での HBV の spontaneous reactivation の検討. *肝臓* 28: 399-404, 1987
- 7) 今井康晴: B 型慢性肝炎における IgM-HBc 抗体の経時的測定の意味. *日消誌* 85(4): 876-885, 1988
- 8) Davis GL, Hoofnagle JH, et al: Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 86: 230-235, 1984
- 9) 茶山一彰, 熊田博光, 池田健次, 他: ステロイド離脱療法により e 抗体に seroconversion したにも拘らずトランスアミナーゼの上昇を繰り返した症例の検討. *肝臓* 29: 253-257, 1988
- 10) 依田英俊, 清沢研道, 袖山 健, 他: 急性肝不全を発症した HBV carrier の 7 例. *肝臓* 29: 1627-1631, 1988
- 11) 西原 隆, 山田剛太郎, 他: HBe 抗体常時陽性にもかかわらず急性増悪をきたした慢性肝炎症例の臨床的検討. *肝臓* 23: 1095-1982
- 12) 田中延善, 野田八嗣, 鷺浦雅志, 他: Acute hepatic failure on chronic liver disease (acute on chronic) 9 例の臨床病理学的検討. *肝臓* 26: 1590-1594, 1985
- 13) Kaneko S, Feinston SM, Miller FR: Rapid and sensitive method for detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J Clin Microbiol* 27: 1930-1933, 1989
- 14) 三田村圭二: HBV 関連 DNA ポリメラーゼ. *総合臨床* 37: 1138-1144, 1988

Two autopsy cases with "acute on chronic" hepatitis B who demonstrated elevated DNA polymerase activity and tested negative for HBV DNA

Hiroshi ADACHI, Shuichi KANEKO, Masayuki YANAGI, Eiki MATSUSHITA, Takeshi URABE, Mitsuhiro TERADA, Shuichi TERASAKI, Yutaka INAGAKI, Masashi UNOURA, Kenichi KOBAYASHI*, Hisashi KIDANI, Keijirou NISHIDE** and Masahiro HOSO***

Two patients with anti-HBe positive chronic hepatitis B developed severe hepatitis. Their sera tested positive for DNA polymerase (DNA-P), however, negative for HBV DNA by dot blot hybridization technique. To understand the mechanism of "acute on chronic" hepatitis, we analyzed HBV DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) method, products of DNA-P by agarose gel electrophoresis, and presence of HBc antigen by histochemical assay for liver tissues. HBcAg was not detected in the liver tissues, but HBV DNA tested positive for both sera by PCR. Thus, the quantity of HBV DNA was considered a little. The products of DNA-P demonstrated smear by the gel electrophoresis. Therefore, we concluded that the elevation of DNA-P activity did not come from HBV DNA-P. One of the two cases showed positive for HCV antibody. Understanding of DNA-P assay should be careful for these patients.

* First Department of Internal Medicine, Kanazawa University (Kanazawa)

** Department of Internal Medicine, Kouseiren Takaoka Hospital (Toyama)

*** Second Department of Pathology, Kanazawa University (Kanazawa)