

原発性胆汁性肝硬変にみられる類上皮肉芽腫の病理学的,免疫病理学的意義 細菌成分の検出を中心に

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 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/2297/4538

原発性胆汁性肝硬変にみられる類上皮肉芽腫の病理学的、 免疫病理学的意義

—細菌成分の検出を中心に—

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻形態機能病理学

(旧講座名：病理学講座第二)

(主任：中沼安二教授)

須藤 嘉子

原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) は、肝内小葉間胆管の慢性非化膿性破壊性胆管炎が特徴であり、障害胆管に接してしばしば類上皮肉芽腫の形成がみられる。今回、PBCにみられる類上皮肉芽腫性病変の病理学的意義を免疫組織化学的に検討し、さらに菌体成分が肉芽腫形成のトリガーとなっている可能性を検討した。355例のPBC肝組織を用い、組織学的、免疫組織化学的検討を行った。また、PBCおよび対照疾患の組織標本を対象に、類上皮肉芽腫部、門脈域および門脈域周囲の肝実質から選択的にDNAを抽出し、PCR法にて細菌16S rRNA遺伝子を増幅、続いてサブクローニング施行後、塩基配列から菌種の分子生物学的同定を行った。また、*Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) に特異的なプライマーを用いてPCRを行い、*P.acnes* 遺伝子を選択的に検出した。PBC症例の40.8%に類上皮肉芽腫が見られ、胆管炎、門脈域の炎症が高度になるにつれ類上皮肉芽腫の出現頻度も増加した。また、類上皮肉芽腫の周囲にオステオポンチン陽性の単核細胞や樹枝状細胞様の形態を示すS-100陽性細胞が散見され、類上皮細胞にはHLA-DRおよびCD1dの発現を認め、肉芽腫部で活発な抗原提示が行われていると考えられた。菌種の分子生物学的同定の結果、類上皮肉芽腫内に種々の腸内細菌遺伝子、特に*P.acnes*、*Bacillus*、*Pseudomonas*などの腸内細菌遺伝子が高率に検出された。特に*P.acnes*は、PBCの類上皮肉芽腫から50クローン中20クローンと高頻度に検出された。*P.acnes* 遺伝子を選択的に検出したところ、PBCの肉芽腫からは全例に検出され、肝実質からの56%、対照群からの50%以下に比べ、有意に高率であった。PBCの障害胆管周囲に高率に類上皮肉芽腫が形成され、同部では活発な抗原提示が行われていると考えられた。PBC、対照肝の肝組織内から多くの常在腸内細菌遺伝子が検出された。また、PBCの肉芽腫部では*P.acnes* を代表とした腸内細菌由来の菌体成分が集積しており、肉芽腫反応の原因(抗原)になっているものと考えられ、PBCの障害胆管での免疫応答に関与している可能性が示唆された。

Key words primary biliary cirrhosis, 類上皮肉芽腫, 細菌遺伝子, 慢性非化膿性破壊性胆管炎

原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) は代表的な自己免疫性肝疾患で、中高年の女性に好発し、疾患特異的な自己抗体である抗ミトコンドリア抗体 (antimitochondrial antibody, AMA) が高率に血中に出現する。病理組織学的には、肝内小葉間胆管が免疫病理学的な標的組織であり、胆管上皮の変性、壊死に加え、障害胆管周囲にはリンパ球、形質細胞、さらに組織球や類上皮細胞の浸潤をみる^{1)~5)}。類上皮細胞は、胆管周囲に疎に集簇し、類上皮肉芽腫の形成もしばしば見られる⁶⁾。これらの胆管病変は総称的に慢性非化膿性破壊性胆管炎と呼ばれ、PBCを特徴付ける診断価値の高い病変と考えられている²⁾³⁾⁵⁾。最終的には肝内小型胆管は進行性に破壊され、肝内から消失し、慢性胆汁うっ滞の発生により胆汁性肝硬変へと進展する²⁾³⁾⁵⁾。

PBCの自己抗原としてAMAの対応抗原であるピルビン酸脱水素酵素のE2成分 (pyruvate dehydrogenase complex-E2) が注目

されている⁷⁾。事実、この抗原はPBCの小葉間胆管の内腔縁に異常に発現することが報告されている⁸⁾⁹⁾。しかし、この抗原が宿主の抗原認識機構にどの様に提示され、また結果として、どのような免疫応答が誘導されるかに関しては不明な点が多い。障害胆管と肉芽腫が同じ門脈域内に同時に見られることが多く、特に障害胆管が肉芽腫内に埋もれている像(肉芽腫性胆管炎)はPBCに診断特異的な所見である²⁾⁶⁾。現在まで、PBCの肉芽腫に関する研究は少なく、未だ肉芽腫の発生機序や病因的意義は不明である。また、類上皮肉芽腫と胆管上皮におけるPDC-E2の異常発現およびAMA出現との関連性も不明である。

一般的に、肉芽腫は単球-マクロファージ系由来の類上皮細胞とリンパ球 (特にCD4⁺T細胞) からなり、細菌感染症やある種の真菌症、異物の侵入などに際して好発し、IV型アレルギー (遅延型過敏症) を特徴付ける病変である。現在まで、細菌感染

平成13年11月29日受付, 平成14年2月6日受理

Abbreviations : AMA, antimitochondrial antibody; BD, bile duct; CH, chronic viral hepatitis; EBO, extrahepatic biliary obstruction; Gra, granuloma; HC, hepatocyte; NK, natural killer; LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic

症とPBCとの関連性を検討した報告があり、*Mycobacterium*¹⁰⁽¹¹⁾や*Escherichia coli (E.coli)*¹²⁾などがPBCの原因菌として挙げられているが、このような菌種が直接PBCの発症に関与しているのかどうかに関して、不明な点が多く残されている。また、最近、Hiramatsuら¹³⁾はPBCの胆嚢胆汁中に多くの腸内細菌遺伝子が同定され、特にグラム陽性球菌由来の遺伝子が主体であったと報告している。胆嚢結石胆汁からも種々の腸内細菌が同定されたが、それらは主にグラム陰性菌であり、PBCの細菌種とは異なっていたことから、グラム陽性腸内細菌がPBCの胆管病変および肉芽腫の発生に関与する可能性を述べている。

今回、我々は、PBCに出現する肉芽腫の発生機序および病因的意義の解明のため、PBCにおける類上皮肉芽腫の頻度とその他の病理所見との関連性、肉芽腫性病変の形成および免疫学的機序の検討、肝組織、特に肉芽腫性病変部から細菌遺伝子の検出と菌種の同定を行い、PBCに出現する肉芽腫性病変が細菌菌体成分に対する組織球反応による可能性について考察した。

対象と方法

I. 組織学的検討

当教室で保管しているPBC肝410例を対象とした。これらの症例は金沢大学附属病院や関連病院で経験された症例および国内の医療機関から当教室に病理診断を依頼された症例であり、臨床所見、検査成績、肝組織像がPBCに一致する、あるいは矛盾しないと判断された症例である。いずれも中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋された肝であり、その内訳は、針生検355例、楔状生検42例、肝移植時摘出肝および剖検肝13例であった。なお、410例中55例はPBCの治療薬であるウルソデオキシコール酸、D-ペニシラミンまたはステロイド投与後の症例である。薬物治療による組織病変の修飾を避けるため、これら既治療症例を除いた355例(男女比41:314; 年齢は28~83歳に分布し、平均年齢56歳)を検討対象とした。

これら症例のパラフィン包埋肝組織切片(4 μ m)を常法にしたがって脱パラフィンし、HE染色とGomoriの鍍銀染色を行い、門脈域内および肝実質内での類上皮肉芽腫の分布を観察した。なお本研究では、類上皮細胞が4~5個以上集簇しているものを類上皮肉芽腫とした(図1)。次に、Scheuerの組織学的病期分類に従い、PBC肝を1期(胆管炎および門脈域炎をみるが肝限界板が保たれている)、2期(interface hepatitisあるいは非定型的細胆管増生のため、肝限界板が破壊されている)、3期(線維性隔壁あるいは架橋形成性壊死を示す)、4期(再生結節を認める肝硬変期)に分類した⁵⁾¹⁴⁾。その結果、1期が163例、2期が124例、3期が53例、4期が15例であった。さらに、その他の肝病変として、小葉間胆管の炎症と消失、肝内小型門脈域の炎症の程度を-(なし)、+(軽度)、++(中等度)、+++ (高度)の4段階に評価し、類上皮肉芽腫の出現頻度および程度との関連性を検討した。

類上皮肉芽腫を認めたPBC12例(1~2期で全て楔状生検; 平均年齢58歳; 男女比1:11)のホルマリン固定パラフィン包埋肝組織切片を用い、細菌および真菌染色法であるグラム染色、グロコットのメテナミン銀染色、ジアスターゼ消化後PAS

(消化PAS)染色を行った。

II. 免疫組織化学的検討

類上皮肉芽腫を認めたPBC12例のホルマリン固定パラフィン包埋肝組織切片を用い、early T lymphocyte activation protein (Eta-1)とも呼ばれているオステオポンチン¹⁵⁾¹⁶⁾、神経系のマーカーで炎症の調節にも関与するS-100¹⁷⁾、MHC関連分子であるHLA-DRとCD1d¹⁸⁾¹⁹⁾、組織球マーカーであるCD68の免疫染色を行った。なお、オステオポンチンは、破骨細胞、活性化T細胞、ナチュラルキラー(natural killer, NK)細胞、マクロファージなどから産生され、組織球に対し遊走、細胞接着、貪食を誘導するサイトカインとして知られている¹⁵⁾¹⁶⁾。

常法にしたがって、肝組織切片を脱パラフィン後、クエン酸緩衝液(pH6.8)にてマイクロウエーブ処理を20分間施行し、抗原賦活化を行った²⁰⁾。続いて、内因性ペルオキシダーゼを失活させるため0.3%過酸化水素水添加メチルアルコールにて20分間処理し、また非特異的の化学結合反応を防止するため正常ヤギ血清(Vector Lab., Burlingame, USA) (10倍希釈)にて10分間処置した。次いで、一次抗体として抗オステオポンチン抗体(マウスモノクローナル抗体 clone MPIIB10, ARP Inc. Belmont, USA) (100倍希釈)、抗S-100抗体(ポリクローナル抗体, Dako Japan, 京都) (800倍希釈)、HLA-DR抗体(マウスモノクローナル抗体 clone TAL.1B5, Dako Japan) (100倍希釈)、CD1d抗体(マウスモノクローナル抗体 clone NOR3.2, Biosource International, Camarillo, USA) (10倍希釈)、CD68抗体(マウスモノクローナル抗体 clone KP1, Dako Japan) (600倍希釈)を用いて、4℃で一晩反応させた。2次抗体として、Dako EnVision/HRPシステム(Dako Japan, 原液)を用い、ジアミノベンチジンで発色後、ヘマトキシリンで核染色し鏡検した。なお、抗体の希釈はPBSを用い、また、各々の反応後の切片の洗浄はPBSにて3分間3回行った。陰性対照は、一次抗体の代わりにPBSを用い、陽性反応が陰性化することで確認した。

III. 肝組織中細菌遺伝子の分子生物学的検出

1. 細菌遺伝子の塩基配列解読による菌種の同定

1) 肉芽腫および肝実質部からの選択的なDNA抽出

類上皮肉芽腫を認めたPBC 9例(組織学的病期 I/II/III=5/3/1; 平均年齢56歳; 男女比2:7)、対照疾患として、原発性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC) 3例(組織学的病期²¹⁾ I/II=1/2; 平均年齢70歳; 男女比2:1)、肝外閉塞性黄疸(extrahepatic biliary obstruction, EBO) 2例(平均年齢59歳; 男女比1:1)、ウイルス性慢性肝炎(chronic viral hepatitis, CH) 4例(平均年齢62歳; 男女比2:2; B型肝炎ウイルス/C型肝炎ウイルス=1/3)、組織学的正常肝(normal liver, NL) 4例(平均年齢61歳; 男女比2:2)、陽性対象として肺結核症2例、肝サルコイドーシス2例のホルマリン固定パラフィン包埋切片(5 μ m)を対象とした。HE染色を施行後、PBC症例の類上皮肉芽腫と門脈域周囲肝実質、対照肝症例の門脈域と肝実質を特定し、マイクロダイセクションシステム(LM1000, オリジナル, 東京)を用いて選択的に採取した。肺結核症、肝サルコイドーシス症例は、同様に肉芽腫部を採取した。採取した組織片を0.5mlのDEXPAT溶液(宝酒造, 東京)で懸濁後、100℃で10分間熱処理し10,000gで10分間遠心した後のDNA含有上清をPCRのDNA

サンプルとした。陰性対照材料としてスライドガラス上で組織切片のない部位から同様にマイクロダイセクションを行い、陰性DNAサンプルを得た。

2) 細菌16S rRNA遺伝子断片の増幅

細菌16S rRNA遺伝子は約1540塩基対からなり、その中に菌種を越えて保存されている保存領域(conserved region)と種特異的な配列からなる可変領域(divergent region)がそれぞれ10箇所存在する²¹⁾。保存領域には、ユニバーサルプライマーと称されるすべての細菌を増幅しうるプライマーが設定されている²¹⁾。今回ユニバーサルプライマーとして、1100F(センス)(5'-GCAACGAGCGCAACCC-3'), 1400R(アンチセンス)(5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3')(PCR産物約310bp)²¹⁾を用い、抽出DNAサンプルから細菌16S rRNA遺伝子断片をPCRにて増幅した。PCR反応液としてdNTPs(宝酒造)0.2mM, センスおよびアンチセンスプライマー各1 μ M, DNAポリメラーゼ(Takara EX TaqTM)(宝酒造)5 unitsと添付PCR緩衝液(宝酒造)にて全量20 μ lを調製した。溶液中に混入している細菌DNAを排除するため、DNase I(Roche Diagnostics K.K., Indianapolis, USA)0.2units/ μ lにて37 $^{\circ}$ C, 10分間処理後、続いて90 $^{\circ}$ C, 30分にてDNase Iを失活化させた。その後、5 μ lのDNAサンプルを添加し、初期熱変性94 $^{\circ}$ C, 5分間の後、94 $^{\circ}$ C(30秒), 55 $^{\circ}$ C(30秒), 72 $^{\circ}$ C(1分)の条件にてPCRを35サイクル施行した。5 μ lのPCR産物をエチジウムブロマイド添加1.5%アガロースゲルにて泳動後、310bp相当のPCR産物を確認した。

3) PCR産物のサブクローニングと塩基配列の解読および菌種の分子生物学的同定

各PCR産物から未反応のプライマーを除去するため、スピンカラム(QIAGEN K.K., 東京)にて精製後、TOPO TAクローニングキット(Invitrogen, Carlsbad, USA)を用いてベクター(pCRII-TOPO, Invitrogen)のマルチクローニングサイトへの挿入およびコンピテント大腸菌(Invitrogen)へのトランスフォーメーションによりサブクローニングを施行した。大腸菌をアガロスプレート上で37 $^{\circ}$ C, 12時間生育させ、PCR産物の挿入の有無はコロニーからのダイレクトPCRにて確認した。挿入を確認したコロニーを各例当該部から10個選択し、サイクルシーケンシング法と自動DNAシーケンサー(ABI PRISMTM 377, Parkin-Elmar, Norwalk, USA)を用いてPCR産物の塩基配列を解読した。塩基配列のホモロジー検索は、インターネットデータベースのBLAST法(<http://www.blast.genome.ad.jp/>)により行い、95%以上の塩基配列一致にて細菌種を決定した。

2. *P.acnes*特異的なプライマーを用いたPCR増幅

後述の如く、PBCの類上皮肉芽腫内に高率に*Propionibacterium acnes*(*P.acnes*)の16S rRNA遺伝子が検出された。そこで、PBC肝と対照肝より抽出したDNAサンプルから*P.acnes*遺伝子を選択的に検出するため、16S rRNA遺伝子内で*P.acnes*に特異的なプライマー(センス, 5'-GGGTTGTAA(A/T)CCGCTTTCGCCTG-3; アンチセンス, 5'-GGGACACCCATCTCTGAGCAC-3')(PCR産物587bp, GenBank accession number: PA16SLIP4)を設定しPCRを施行した²²⁾。抽出DNAサンプル(5 μ l)を用い、初期熱変性94 $^{\circ}$ C, 4分の後、94 $^{\circ}$ C(30秒), 50 $^{\circ}$ C(30秒), 72 $^{\circ}$ C(1分)の条件にてPCRを45サイクル施行し、*P.acnes*の16S rRNA遺伝子の有無を検討した。

組織片から抽出したサンプル中にDNAが存在していることを確認するため、ヒト β -globin遺伝子を内部コントロールとし

てnested PCRを施行した。まず、外部プライマーGH20(5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'), GH21(5'-GGAAAATAGACCAATAGGCAG-3')(宝酒造)を用いて、94 $^{\circ}$ C(30秒), 50 $^{\circ}$ C(30秒), 72 $^{\circ}$ C(1分)の条件でPCRを25サイクル施行。続いて、初回PCR産物の2 μ lと内部プライマーKM29(5'-GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG-3'), PC04(5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3')(宝酒造)を用いて、PCRを25サイクル施行し、ヒト β -globin遺伝子断片(最終PCR産物205bp)の増幅を確認した。

Ⅲ. 統計学的解析

Chi-squaredの検定またはFisherの直接確率計算法で検定し、危険率0.05以下を以て有意差ありと判断した。

成 績

I. 類上皮肉芽腫の組織学的検討

1. 類上皮肉芽腫の出現頻度と他の肝組織病変との関連性

類上皮肉芽腫は、門脈域および肝実質内にみられた。門脈域内では類上皮細胞が密在しサルコイド型肉芽腫に似るもの(図1A,B)、疎に胆管周囲に分布するものがあつたが、特に後者が多かった。いずれも非乾酪壊死型であり、障害胆管周囲に好発していた。同一肝でも門脈域により類上皮肉芽腫の分布は異なっていた。肝実質に出現する類上皮肉芽腫は、小型であり巣状壊死に類似するものも見られた。

PBC症例355例中145例(40.8%)に類上皮肉芽腫が見られた。門脈域に認められたもの126例(35.5%)、肝実質に認められたもの39例(10.9%)、両方に認められたもの20例(5.7%)であった。採取方法の違い(針生検, 楔状生検, 移植および剖検)による類上皮肉芽腫の出現率に有意差は認められなかった。

類上皮肉芽腫の出現頻度と組織学的病期およびその他の組織所見との関連性を図2に示す。組織学的病期分類との間には有意な相関性は得られなかったが、4期で出現率が低率であった(図2A)。胆管消失の程度との間にも有意な相関は見られなかったが、胆管消失が高度な症例(+++)では出現率が低率であった(図2B)。しかし、胆管炎、門脈域の炎症との間には相関性が見られ、炎症の程度が高度になるにつれ類上皮肉芽腫の出現頻度も増加する傾向が見られた(図2C, 2D)。

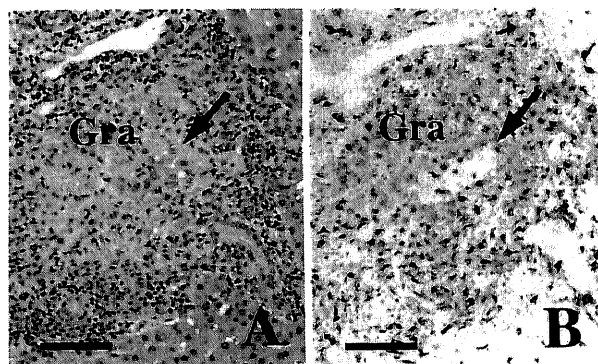
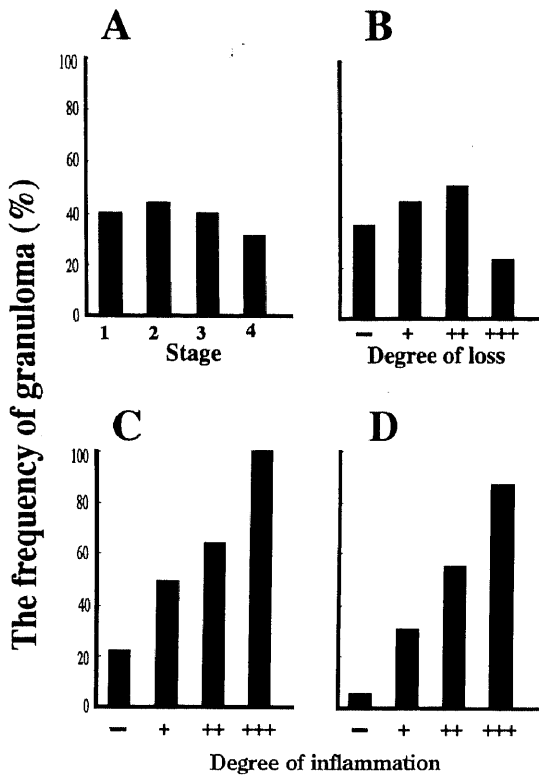


Fig.1 A fully developed granuloma (Gra) consisting with CD68-weakly positive epithelioid cells is found in PBC. Moreover, damaged bile duct (arrows) is embedded within granuloma (Granulomatous cholangitis). (A) HE staining. (B) immunohistochemical staining for CD68. Scale bars indicate 100 μ m.



2. 特殊染色による菌体成分の検出

グラム染色, グロコットのメテナミン銀染色, 消化PAS染色にてPBC肝の肉芽腫部に菌体成分の染色は認めなかった。

II. 類上皮肉芽腫の免疫組織化学的検討

PBCの門脈域内にはオステオポンチン陽性の単核細胞(図3A), それに樹枝状細胞の形態を示すS-100陽性細胞(図3B)が種々の程度に浸潤していた。オステオポンチンは, 類上皮肉芽腫の辺縁部の単核細胞にも発現が見られた(図3A)。S-100陽性細胞は肉芽腫の周囲やその内部, また障害胆管の周囲に密在する傾向があり, 障害胆管上皮層内にもS-100陽性細胞が散見された(図3B)。

また, HLA-DR陽性の単核球が門脈域内に多数みられ, 類上皮肉芽腫構成細胞のほとんどがHLA-DR陽性であった(図3C)。

Fig.2 The prevalence of granuloma in several histopathologic parameters, histological stage (A), bile duct loss (B), cholangitis (C), and portal inflammation (D) in PBC. The frequency of granuloma is comparatively low in stage 4 (A) and the severe (+++) degree of bile duct loss (B), though there is no statistical difference. It is found that the frequency of granuloma is correlated with the degree of cholangitis (C) and portal inflammation (D).

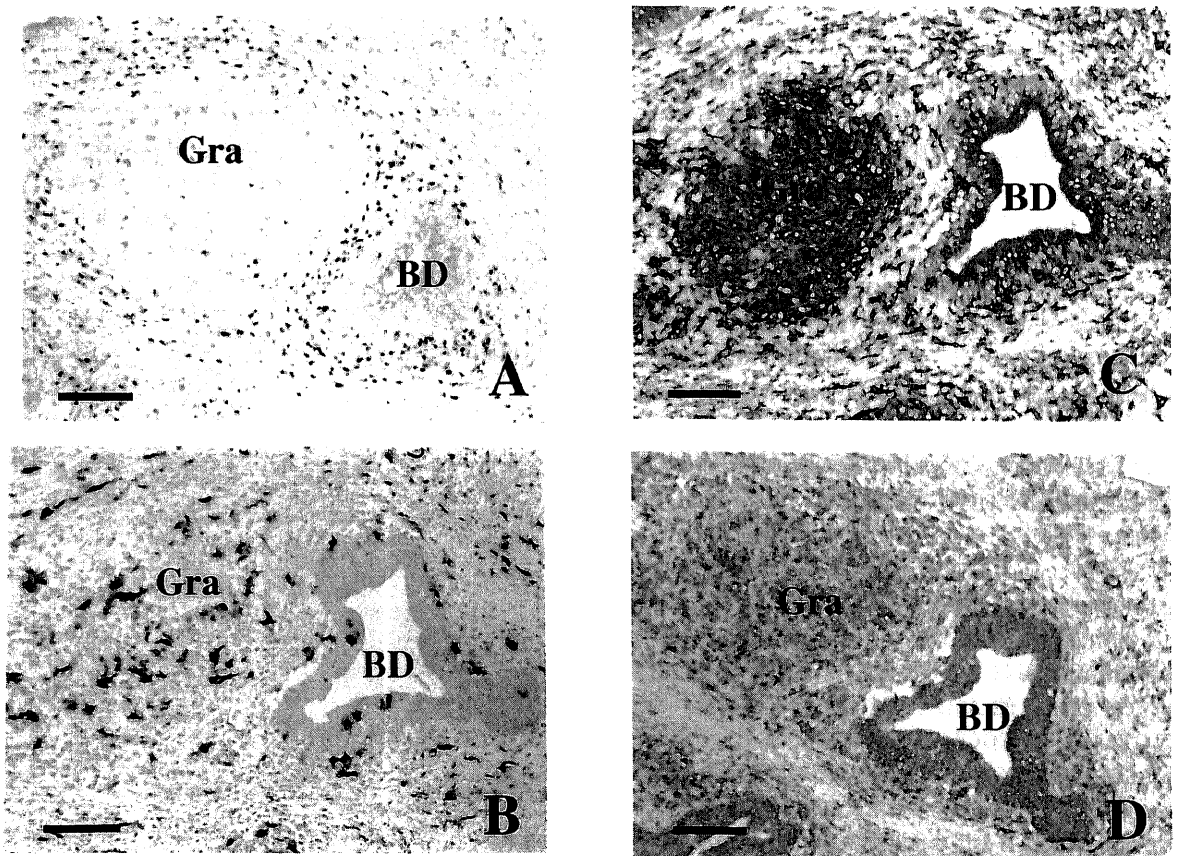


Fig. 3 Immunohistochemical staining for osteopontin (A), S-100 (B), HLA-DR (C), and CD1d (D). (A) Osteopontin-positive infiltrating cells are accumulated around granuloma and injured bile duct. (B) S-100-positive cells showing dendritic cell-like morphology are scattered around granuloma (Gra) and injured bile duct (BD), and within biliary epithelium. (C) and (D) HLA-DR and CD1d are expressed in granuloma and bile duct. 'Gra' and 'BD' denote granuloma and injured bile duct, respectively. Scale bars indicate 50 μ m.

CD1d陽性細胞も門脈域に多数みられ、類上皮肉芽腫にCD1dの強い発現が認められた(図3D)。一部の障害胆管上皮にも、HLA-DRおよびCD1dの発現が認められた(図3C, 3D)。

Ⅲ. 細菌遺伝子の分子生物学的検出

抽出DNAサンプルのうち、PBC5例と対照肝6例(原発性硬化性胆管炎(PSC)2例,慢性ウイルス性肝炎(CH)2例,正常肝(NL)2例)および肺結核症1例を用い、該当組織中から細菌遺伝子の検出と菌種の同定を施行した。類上皮肉芽腫,門脈域,肝実質から得たすべてのDNAサンプルから細菌16S rRNA遺伝子由来のPCR増幅産物が得られた(図4)。なお、陰性対照材料として作成したスライドガラス上で組織切片のない部位からの陰性DNAサンプルからもわずかなPCR増幅産物が見られた。

PBC5症例の類上皮肉芽腫と門脈域周囲肝実質,対照肝6症例の門脈域と肝実質につき、各々10クローン分の塩基配列を解読しホモロジー解析から細菌種の分子生物学的同定を行った。すなわち、PBCの肉芽腫からの50クローン、肝実質部から

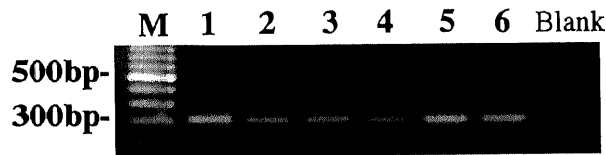


Fig. 4 Representative electrophoresis of PCR amplification products using bacterial universal primers. Amplified bacterial genes were detected in all DNA samples extracted from granuloma (lanes 1, 3, and 5) and parenchyma (lanes 2, 4, and 6) of three PBC patients. A weak band is also found in the 'Blank' lane, which was amplified in the template extracted from the blank area around the tissue section used as a negative control for the microdissection procedure. Lanes 1 and 2, granuloma and parenchyma of PBC1, respectively; Lanes 3 and 4, granuloma and parenchyma of PBC2, respectively; Lanes 5 and 6, granuloma and parenchyma of PBC3, respectively.

らの50クローン,対照肝の門脈域からの60クローン,それに肝実質部からの60クローンから同定された細菌種を表1に示す。検出された細菌はいずれも常在細菌であり、主に*P.acnes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*などの腸内細菌であった。特に*P.acnes*は、PBCの類上皮肉芽腫から50クローン中20クローン(40%)と最も高頻度に検出され、PBCの肝実質部(50クローン中4クローン,8%),対照肝の門脈域(60クローン中7クローン,12%),肝実質(60クローン中5クローン,8%)に較べ高率であった。陽性対象として用いた肺結核症の肉芽腫からは、10クローン中6クローン(60%)が*Mycobacteria*属菌であった(今回増幅した細菌16S rRNA遺伝子領域では、*M.tuberculosis*と*M.bovis*の区別が不可能)。なお、陰性対照材料として作成した組織切片のない部位からは*Acidovorax*属, *Acinetobacter*属, *Bradyrhizobium*属, *Comamonas*属, *Mesorhizobium*属, *Syntrophus*属, *Rhizobium*属, *Corynebacterium callunae*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*が検出された。これらのいくつかは肝組織部からも検出されたが、実験手技中の混入の可能性があるので表1では“その他”として別記した。

Ⅳ. *P.acnes*特異的16S rRNA遺伝子の検出

抽出DNAサンプル全例を用いて*P.acnes*特異的プライマーを用いてPCRにて16S rRNA遺伝子の検出を行ったところ、PBCの肉芽腫からは9例全例で強いバンドで検出された(図5)(表2)。PBCの肝実質からは9例中5例(56%)で検出が出来たが、類上皮肉芽腫部に較べ低率であった(p<0.05)。対照群からも門脈域で13例中6例(47%),肝実質で13例中4例(31%)で弱い染色バンドながら検出されたがPBCの肉芽腫部での検出率に較べ低率であった(p<0.05)。なお、肺結核(2例)の肉芽腫部からは*P.acnes*は検出されなかったが、肝サルコイドーシス(2例)の肉芽腫部からは2例共に検出された。

内部コントロールとして用いたヒトβ-globin遺伝子は、全てのDNAサンプルから検出された(図5)。肝組織内でのDNAがよく保存され、また組織由来のDNAが十分に含まれていることを示唆する。

Table 1. Bacterial species detected in liver tissues

Bacterial species	Primary biliary cirrhosis		Controls	
	Granuloma	Hepatocyte	Portal area	Hepatocyte
<i>Propionibacterium acnes</i>	20	4	7	5
<i>Bacillus species</i>	7	4	1	
<i>Pseudomonas species</i>	5	6	9	7
<i>Leptothrix species</i>	3	5	1	
<i>Corynebacterium species</i>		5		1
<i>Listeria monocytogenes</i>			5	2
<i>Streptococcus speies</i>			2	2
Miscellaneousness	15	26	35	43
Total of sequenced clones	50	50	60	60

Granuloma in portal tracts, portal tracts without granuloma and adjacent hepatic parenchyma, were selectively microdissected from sections of 5 PBC and 6 control livers, and then DNA was extracted from them. After amplifying part of the bacterial 16S rRNA gene from DNA samples, their amplicons subcloned into the vector and transformed into competent cells. Then, ten clones were sequenced for the identification of bacterial species.

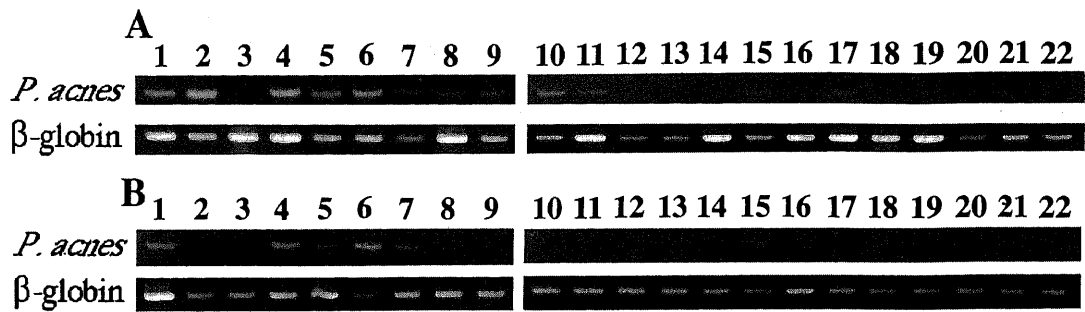


Fig.5 Electrophoresis of PCR amplification products of *P. acnes* 16S rRNA gene and of human β -globin. PCR products for *P. acnes* are of expected size (587 bp) in all granuloma samples (lanes A1-9) and 5 parenchyma samples (lanes B1,4-7) of PBC, and in 6 portal tract samples (lanes A10,11,15,17,19, and 21) and 4 parenchyma samples (lanes B15,16,18, and 21) of controls. The β -globin gene are detected at the predicted size (205 bp) in all samples by nested PCR. Lanes A1-9 and B1-9 are granuloma and parenchyma samples of 9 cases of primary biliary cirrhosis, respectively; Lanes A10-12 and B10-12 are granuloma and parenchyma samples of 3 cases of primary sclerosing cholangitis, respectively; Lanes A13&14 and B13&14 are granuloma and parenchyma samples of 2 cases of extrahepatic biliary obstruction, respectively; Lanes A15-18 and B15-18 are granuloma and parenchyma samples of 4 cases of chronic viral hepatitis, respectively; Lanes A19-22 and B19-22 are granuloma and parenchyma samples of 4 cases of normal liver, respectively.

Table 2. Summary of *P. acnes*-specific PCR

Patient groups	Microdissected location		
	Granuloma (%)	Hepatocytes (%)	Portal area (%)
Primary biliary cirrhosis	9/9 (100)*	5/9 (56)	
Controls			
Primary sclerosing cholangitis		0/3 (0)	2/3 (67)
Extrahepatic biliary obstruction		0/2 (0)	0/2 (0)
Chronic viral hepatitis		3/4 (75)	2/4 (50)
Normal liver		1/4 (25)	2/4 (50)
Total		4/13 (31)	6/13 (47)

Data show (positive cases/total cases). Parentheses, the incidence of positive cases.

* $p < 0.05$ versus hepatocytes in primary biliary cirrhosis or portal area and hepatocytes in controls.

考 察

PBCは原因不明の自己免疫性肝疾患であり、肝組織中に類上皮肉芽腫が出現する。類上皮肉芽腫は、通常、単球-マクロファージ系由来の類上皮細胞とリンパ球（特にCD4⁺T細胞）からなり、肉芽腫性病変の発生には炎症刺激因子の特殊性と宿主の免疫反応の両者が重要な役割を果たすとされている。そして、類上皮肉芽腫は細菌感染症やある種の真菌症、異物の侵入などに際して好発するIV型アレルギー（遅延型過敏症）の代表的所見でもある。PBCの類上皮肉芽腫は障害胆管周囲に好発し、特に肉芽腫性胆管炎はPBCに特徴的であり診断的価値が高いとされている¹⁾。しかし、PBCの肉芽腫に関する研究は少なく、特に細菌感染症に注目した類上皮肉芽腫の成因研究は殆どなされていない。

今回、355例のPBC肝を用い、類上皮肉芽腫の病理学的意義を病理組織学と免疫組織化学を用い検討した。PBC肝の40.8%の症例に類上皮肉芽腫の出現が見られ、それらの多くは門脈域、特に障害胆管周囲に見られた。従来の報告⁹⁾と同じく、類上皮肉芽腫が疎に分布するものがほとんどであった。肝実質にもみられたがその頻度は低率であった。

類上皮肉芽腫は、胆管炎および門脈域の炎症の程度と関連して出現頻度が高くなっていった。すなわち、胆管炎および門脈域

炎症の発生程度と類上皮肉芽腫の発生との間に密接な正の相関性があり、類上皮肉芽腫はPBCの胆管病変の一部を構成しているものと考えられた。なおEpsteinら²³⁾は、肝内の類上皮肉芽腫がPBC患者の予後と関連し、類上皮肉芽腫陽性例の予後は陰性例に較べ良好であったと報告している。今回の成績でも類上皮肉芽腫の出現は非硬変期に較べ肝硬変期で減少する傾向があり、また肉芽腫陰性例は病期の進行した症例や胆管消失の高度例に多いため肉芽腫陰性が患者の予後不良因子と考えられた。

S-100は従来神経系のマーカーとされてきたが、樹状細胞や上皮への発現が報告され、近年ではS-100-AGEレセプター (receptor for advanced glycosylation end product) を介した炎症の調節に重要な役割を果たす分子と考えられている¹⁷⁾。今回の免疫組織化学的検討によりS-100陽性の樹枝状細胞(抗原提示細胞)が、PBCの類上皮肉芽腫内や周囲および障害胆管周囲に多く見られた²⁴⁾。この所見は、障害胆管周囲や類上皮肉芽腫形成部で活発な抗原提示と炎症の調節が行われていることを示唆している。一般的に単球は抗原提示機能に分化した細胞群 (HLA-DR, S-100陽性) と貪食機能に分化したマクロファージ系の細胞群(CD68陽性)に分けられる²⁴⁾。今回の検討では、PBCに出現する類上皮肉芽腫はHLA-DRが強陽性であり、MHC class II/ペプチドを介した抗原提示作用が類上皮肉芽腫で活発に行われ

ている事を示唆する²⁵⁾。また類上皮肉芽腫の周囲にオステオポンチン陽性単核細胞を認めたことより、組織球あるいは単球の新たなリクルート、組織球相互の接着や貪食機能の促進が持続的におこっていると推測され、類上皮肉芽腫の形成および維持に関与していることを示唆している。このようなオステオポンチンの発現パターンは、結核結節、珪肺結節などのその他の肉芽腫性病変でも報告²⁶⁾されており、一般的な肉芽腫形成に共通した機序の関与を反映していると考えられる。さらに、今回の検討によりPBCの障害胆管周囲の類上皮肉芽腫や胆管上皮、胆管周囲単核球にCD1dの強い発現を認めた。CD1dは、MHC class I-like分子として細菌由来の脂質や糖脂質成分をT細胞やNK/T細胞に抗原提示しうる分子であるとされている¹⁸⁾¹⁹⁾。PBCの類上皮肉芽腫はMHC-class II/ペプチド複合体のみならずCD1d/糖脂質複合体をも表出し、何らかのペプチドや糖脂質を抗原として提示していると考えられる¹⁸⁾¹⁹⁾。また後述の細菌成分(グラム陰性菌の壁成分であるリポポリサッカライド(lipopolysaccharide, LPS)、グラム陽性菌の壁成分であるリポタイコ酸(lipoteichoic acid, LTA)などの脂質成分が抗原として胆管周囲で提示されている可能性を支持する所見でもある。

次にPBCの病因と細菌感染症との関連性について考察する。胆汁の導管である肝内外胆管系は、十二指腸に連続し外界に接している。さらに、胆汁中には肝細胞を介して多くの内因性、外因性の異物が排泄されており、胆管系あるいは胆管上皮は外界からの異物や胆汁中に排泄された異物に常に曝されていると思われる。従って肝内外胆管系には、これらに対応した生体防御機構や固有の免疫監視機構(粘膜免疫を含む)が存在していると思われるが、詳細な検討はなされていない。

現在までPBCの病態発生と細菌感染症との関連性は、多数報告されている。例えば、*Mycobacterium*¹⁰⁾¹¹⁾や*E.coli*¹²⁾などがPBCの原因菌として挙げられているが、このような菌種が直接PBC発症に関与しているのかどうかは不明である。PBC患者血清中に特異的に出現するAMAが大腸菌など細菌由来のミトコンドリアと交差反応を示す²⁷⁾²⁸⁾ことやAMAの対応抗原であるPDC-E2は種を越えてよく保存されている²⁷⁾ことから、PDC-E2と反応する自己反応性T細胞の活性化機序や、AMAの出現に細菌感染症に関連した分子相同性の関与が想定されている。さらに、PBCでは標的組織である肝内小型胆管、特に小葉間胆管にPDC-E2を始めとする抗原性物質の異常な発現が目目されている⁸⁾。これらの抗原成分と胆管炎の発生に、自己抗原と細菌成分との分子相同性が目目されている。

続いて、類上皮肉芽腫と細菌感染症との関連について考察する。今回、PBCの類上皮肉芽腫形成機序において、炎症刺激因子あるいは抗原性物質として何らかの菌体成分が関与しているかどうかを検討した。すなわち、肝組織より類上皮肉芽腫、門脈域、肝実質をマイクロダイセクション法で切り出し、DNAを抽出後、ユニバーサルプライマーを用いた分子生物学的手法により細菌遺伝子の有無と菌種の特異性を行った。その結果、PBCおよび対照疾患の肝組織切片から*P.acnes*などの複数の腸内細菌由来の遺伝子が検出でき、多くの菌体成分が腸管から胆汁や門脈血流を介して肝組織内に流入しているものと推測された。しかし、肝膿瘍や胆道感染症など感染性肝疾患を形成していない限り菌体が生菌の状態では肝内に流入しているとは考えにくく、このような現象を臨床的な感染症として捉えるべきではない。今回行ったグラム染色や他の組織染色による検討でも、対

象とした肝組織中に明らかな菌体成分を見出すことは出来なかった。また組織切片からの細菌遺伝子検出の予備実験として、種々の大きさの遺伝子断片をPCRにて増幅したが、組織学的に菌体を同定できない限り350bp以上の遺伝子断片を検出することは出来なかった。このような所見から、肝内に流入している菌体成分は高度に分断化した状態であると推測され、特に肉芽腫内に存在する菌体成分は組織球による分解消化の影響も考えられる。したがって、菌体そのものが肝内や肉芽腫部に存在するのではなく、LPSやLTAなどの抗原性の強い菌体脂質成分または菌種特異的な何らかの抗原物質の存在、集簇が、肉芽腫形成などの異常な免疫学的所見として現れているものと推測される。

全例のPBC肉芽腫部から*P.acnes*由来の遺伝子が検出された。*P.acnes*はグラム陽性嫌気性菌で、リパーゼ産生によるニキビの病原菌として有名である²⁹⁾。また*P.acnes*は、アジュバント活性を有し、動物実験にて類上皮肉芽腫を形成することが知られている。従って、PBCの肉芽腫から*P.acnes*が全例に検出されたことは、*P.acnes*に対する異常な免疫応答がPBCの肉芽腫形成、さらにはPBCの病態形成に拘わっていることが示唆された。

近年、*P.acnes*は全身性肉芽腫性疾患であるサルコイドーシスの病原菌²⁹⁾としても注目されており、*P.acnes*に対する宿主の異常な免疫応答が種々の疾患の病態形成に関与しているのかもしれない。今後、PBCの疾患特異性さらに胆管特異性を検討するため、細菌成分に対する胆道系の自然免疫機構の解明や樹状細胞の機能障害³⁰⁾などの宿主側免疫応答の検討も必要であり、今後さらなる検討を要する。

結 論

PBCの類上皮肉芽腫に注目し、PBC患者355例の肝組織中にみられる類上皮肉芽腫性病変の病理学的意義を病理学的、免疫組織化学的および分子生物学的に検討し、以下の結論を得た。

1. PBC症例の40.8%に類上皮肉芽腫が見られ、胆管炎、門脈域の炎症が高度になるにつれ類上皮肉芽腫の出現頻度も増加した。類上皮肉芽腫は胆管炎や門脈域炎に関連して出現すると考えられた。
2. PBCの類上皮肉芽腫の周囲にオステオポンチン陽性の単核細胞や樹枝状細胞様の形態を示すS-100陽性細胞が散見され、また、類上皮肉芽腫部あるいはその周囲に、HLA-DR、CD1d、オステオポンチンの発現を認め、同部で活発な抗原(ペプチドおよび脂質抗原)を提示していることが示された。
3. 類上皮肉芽腫部、門脈域および門脈域周囲の肝実質から選択的にDNAを抽出し、PCRにて細菌16S rRNA遺伝子を増幅、続いてサブクローニング施行後、塩基配列から菌種の分子生物学的同定を行った。PBC、対照肝の肝組織内から多くの腸内細菌遺伝子が検出でき、多くの菌体成分が腸管から胆汁や門脈血流を介して肝組織内に流入しているものと推測された。
4. 菌種の分子生物学的同定の結果、PBCの類上皮肉芽腫内に種々の腸内細菌、特に*P.acnes*、*Bacillus*、*Pseudomonas*などの腸内細菌由来の遺伝子が高率に検出された。また、*P.acnes*は、PBCの類上皮肉芽腫から50クローン中20クローンと高頻度に検出された。
5. *P.acnes*に特異的なプライマーを用いてPCRを行い、*P.acnes*遺伝子を選択的に検出した。その結果、PBCの肉芽腫から

らは全例に検出され、PBC肝実質からの56%、対照群からの50%以下に較べ、有意に高率であり、*P. acnes*が肉芽腫形成および胆管障害に関連することが示唆された。

以上より、PBCでは障害胆管周囲に高率に類上皮肉芽腫が形成され、同部で活発な抗原提示が行われていると考えられた。PBCの肉芽腫部では*P. acnes*を代表とした腸内細菌由来の菌体成分が集積しており、肉芽腫反応の原因(抗原)になっているものと考えられ、PBCの障害胆管での免疫応答に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

本論文を終えるに当り、御指導を賜りました金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 中沼安二教授に深謝します。また、直接御指導を賜りました金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 原田憲一博士、常山幸一博士に深謝します。標本作成、染色、遺伝子検出にご協力頂きました金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学の技師および事務の方々に感謝します。なお、本論文の一部を第33回日本肝臓学会西部会、第89回日本病理学会総会で発表した。

文 献

- 1) Nakanuma Y, Tsuneyama K, Sasaki M, Harada K. Destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 14: 549-570, 2000.
- 2) Nakanuma Y, Ohta G. Histometric and serial section observations of the intrahepatic bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 76: 1326-1332, 1979.
- 3) Rubin E, Schaffner F, Popper H. Primary biliary cirrhosis. *Am J Pathol* 46: 387-407, 1965.
- 4) Scheuer PJ. Pathologic features and evolution of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Mayo Clin Proc* 73: 179-183, 1998.
- 5) Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 379: 103-112, 1978.
- 6) Nakanuma Y, Ohta G. Quantitation of hepatic granulomas and epithelioid cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 3: 423-427, 1983.
- 7) Gershwin ME, Mackay IR. Primary biliary cirrhosis: paradigm or paradox for autoimmunity. *Gastroenterology* 100: 822-833, 1991.
- 8) Tsuneyama K, Van de Water J, Leung PS, Cha S, Nakanuma Y, Kaplan M, De Lellis R, Coppel R, Ansari A, Gershwin ME. Abnormal expression of the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex on the luminal surface of biliary epithelium occurs before major histocompatibility complex class II and BB1/B7 expression. *Hepatology* 21: 1031-1037, 1995.
- 9) Van de Water J, Turchany J, Leung PS, Lake J, Munoz S, Surh CD, Coppel R, Ansari A, Nakanuma Y, Gershwin ME. Molecular mimicry in primary biliary cirrhosis. Evidence for biliary epithelial expression of a molecule cross-reactive with pyruvate dehydrogenase complex-E2. *J Clin Invest* 91: 2653-2664, 1993.
- 10) O'Donohue J, McFarlane B, Bomford A, Yates M, Williams R. Antibodies to atypical mycobacteria in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 21: 887-889, 1994.
- 11) Vilagut L, Vila J, Vinas O, Pares A, Gines A, Jimenez de Anta MT, Rodes J. Cross-reactivity of anti-Mycobacterium gordonae antibodies with the major mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 21: 673-677, 1994.
- 12) Butler P, Hamilton Miller JM, McIntyre N, Burroughs AK. Natural history of bacteriuria in women with primary biliary cirrhosis and the effect of antimicrobial therapy in symptomatic and asymptomatic groups. *Gut* 36: 931-934, 1995.
- 13) Hiramatsu K, Harada K, Tsuneyama K, Sasaki M, Fujita S, Hashimoto T, Kaneko S, Kobayashi K, Nakanuma Y. Amplification and sequence analysis of partial bacterial 16S ribosomal RNA gene in gallbladder bile from patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 33: 9-18, 2000.
- 14) Scheuer PJ, and Lefkowitz JH. *Liver biopsy interpretation*. 6th ed. p79-87, W.B.Saunders, London, 2000.
- 15) Carlson I, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Brown LF. Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology. *Lab Invest* 77: 103-108, 1997.
- 16) O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol* 162: 1024-1031, 1999.
- 17) Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97: 889-901, 1999.
- 18) Nieda M, Nicol A, Koezuka Y, Kikuchi A, Takahashi T, Nakamura H, Furukawa H, Yabe T, Ishikawa Y, Tadokoro K, Juji T. Activation of human Valpha24NKT cells by alpha-glycosylceramide in a CD1d-restricted and Valpha24TCR-mediated manner. *Hum Immunol* 60: 10-19, 1999.
- 19) Jullien D, Stenger S, Ernst WA, Modlin RL. CD1 presentation of microbial nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* 99: 2071-2074, 1997.
- 20) Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-748, 1991.
- 21) Relman DA. Universal bacterial 16S rRNA amplification and sequencing. *In* Persing DH (ed), *Diagnostic molecular microbiology*, 1st ed, p489-495, ASM Press, Washington D.C., 1993.
- 22) Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y. Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. *Lancet* 354: 120-123, 1999.
- 23) Lee RG, Epstein O, Jauregui H, Sherlock S, Scheuer PJ. Granulomas in primary biliary cirrhosis: a prognostic feature. *Gastroenterology* 81: 983-986, 1981.
- 24) Demetris AJ, Sever C, Kakizoe S, Oguma S, Starzl TE, Jaffe R. S100 protein positive dendritic cells in primary biliary cirrhosis and other chronic inflammatory liver diseases. Relevance to

pathogenesis? Am J Pathol 134: 741-747, 1989.

25) Nakanuma Y, Kono N. Expression of HLA-DR antigens on interlobular bile ducts in primary biliary cirrhosis and other hepatobiliary diseases: an immunohistochemical study. Hum Pathol 22: 431-436, 1991.

26) Nau GJ, Guilfoile P, Chupp GL, Berman JS, Kim SJ, Kornfeld H, Young RA. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 6414-6419, 1997.

27) Fussey SP, Ali ST, Guest JR, James OF, Bassendine MF, Yeaman SJ. Reactivity of primary biliary cirrhosis sera with *Escherichia coli* dihydrolipoamide acetyltransferase (E2p):

characterization of the main immunogenic region. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 3987-3991, 1990.

28) Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Hayashida K, Niho Y. HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases. J Exp Med 181: 1835-1845, 1995.

29) Yamamoto K, Akbar SM, Masumoto T, Onji M. Increased nitric oxide (NO) production by antigen-presenting dendritic cells is responsible for low allogeneic mixed leucocyte reaction (MLR) in primary biliary cirrhosis (PBC). Clin Exp Immunol 114: 94-101, 1998.

Pathologic and Immunopathologic Significance of Epithelioid Cell Granulomas in Primary Biliary Cirrhosis with an Emphasis on the Participation of Bacterial Components Yoshiko Sudo, Department of Human Pathology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 111, 121 — 129 (2002)

Key words primary biliary cirrhosis, epithelioid cell granuloma, bacterial gene, chronic non-suppurative destructive cholangitis

Abstract

The pathogenesis and immunologic significance of epithelioid cell granuloma in primary biliary cirrhosis (PBC) were examined histologically, immunohistochemically and molecular biologically. A total of 355 PBC livers were examined histologically. HLA-DR, CD1d, S-100, and osteopontin in the liver tissue, particularly in epithelioid granulomas, was investigated immunohistochemically. In addition, we detected and identified for bacterial genes by molecular biological methods such as PCR detection of bacterial 16S rRNA. Briefly, taking liver sections from the patients with PBC and control livers, granuloma in portal tracts, portal tracts without granuloma and adjacent hepatic parenchyma, these were selectively microdissected from sections, and then DNA was extracted from them. Partial bacterial genes were amplified by PCR from the DNA samples, and the amplicons were cloned and sequenced for the identification of bacterial species. Next, a *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*)-specific PCR was also performed. Epithelioid granulomas were found in 40.8% of PBC livers. They were particularly frequent in the vicinity of damaged interlobular bile ducts, and their occurrence was closely related to the degree of cholangitis and portal inflammation. Granulomas were positive for HLA-DR and CD1d, and were surrounded by osteopontin-positive mononuclear cells and S-100-positive cells showing morphologically dendritic cells. In granuloma, portal tracts, and periportal parenchyma, a number of bacterial genes were detected and the majority of them originated from enterobacterial species. Among them, *P.acnes* was detected in 20 of 50 sequenced clones from granuloma of PBC. By the *P.acnes*-specific PCR, distinct PCR products were identified in epithelioid granuloma in all PBC cases, but the detection rate of *P.acnes* was low in those cloned from adjacent hepatic parenchyma of PBC and from portal tracts and hepatic parenchyma of controls. The pathogenesis of granuloma in PBC is suggested to be associated with various immune responses and several possible roles of enterobacteria in the etiopathogenesis were raised. In liver tissue, a number of bacterial genes were detected and the majority of them originated from enterobacterial species. Moreover, the result that *P. acnes* DNA is present as a major clone in granulomas of PBC, suggests that *P. acnes* may be involved in the pathogenesis of granuloma in PBC.