

慢性活動性肝炎の肝細胞崩壊機序

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/2297/8694

慢性活動性肝炎の肝細胞崩壊機序

金沢大学大学院医学研究科病理学第二講座 (主任：太田五六教授)

新 谷 寿 久

(昭和52年12月28日受付)

はじめに

従来より、肝疾患の経過中、種々の免疫異常の出現をみることが知られている。1956年 Mackay ら¹⁾は“ルポイド肝炎”なる概念を提唱し、自己免疫性肝障害の発生という問題が注目されだした。1965年 Blumberg ら²⁾のHB抗原の発見とあいまって、HB抗原をめぐる肝炎の発生と肝疾患の慢性化機序について、再び肝の免疫学が注目を浴び、1972年 Almeida ら³⁾の immune complex 理論、1972年 Dadley ら⁴⁾の細胞性免疫説、1972年 Popper ら⁵⁾、1974年 Eddleston ら⁶⁾、1975年 Edgington ら⁷⁾の細胞性・液性の自己免疫説など、これらの諸問題に対して優れた仮説がうちだされてきた。同時に、Meyer zum Bütschenfelde ら⁸⁾⁹⁾による肝特異抗原 (LSP) の抽出と、それによる実験的慢性活動性肝炎の作成は、肝特異抗原に対する細胞性免疫による肝細胞崩壊を示唆した。当教室でも肝抗原の研究を1971年梶原¹⁰⁾、1971年津田¹¹⁾、1975年俵矢¹²⁾によりなされ、1976年野々村ら^{13)~15)}、太田ら¹⁶⁾¹⁷⁾はLSPとは異なった肝特異抗原を有する不溶性肝細胞膜抗原 (IHSM) の重要性を主張し、白血球遊走阻止試験の成績から、慢性肝疾患ではIHSMに対して遅延型アレルギー状態にあることを指摘した。このように、肝炎の活動化、慢性化機序については肝細胞膜をめぐる免疫の問題が最近急速に脚光を浴びている。しかし、まだ統一的な見解をみていない。そこで、本研究は、遅延型アレルギー状態にある慢性活動性肝炎の患者末梢血リンパ球が、直接あるいは患者血清を介して、培養肝細胞を障害する活性をもつかどうかを研究し、肝細胞崩壊をひきおこす effector cell はいかなる種類のリンパ球であるのか、またその免疫機序はどのようなメカニズムであるのかを追求した。

研究対象および方法

I. 対象

慢性肝疾患患者46例、内訳は慢性非活動性肝炎患者7例、慢性活動性肝炎患者32例、肝硬変患者7例と健康者12例を対象とした。慢性肝疾患患者の診断は血清生化学的検査、腹腔鏡あるいは肝生検で行ない、血中HBsAgの測定はRIA法又はRPHA法で行なった。

II. 方法

1. direct lymphocyte-mediated cytotoxicity (DLC)

1) 標的肝細胞

rat liver parenchymal cell : 1968年 Coon¹⁸⁾により株化された成熟ラット肝細胞株 (Coon cell と略) を用いた。培養液はグルタミン加 MEM (GIBCO, USA)、10%不活化牛胎児血清 (FCS : GIBCO, USA)、Pc100u/ml、SM100μg/ml を用いた。

2) リンパ球

i) whole lymphocytes の分離 : Böyum¹⁹⁾の方法に準じ、ヘパリン加末梢血を同量の Hanks BSS (HBSS と略) と混和し、Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemical, Sweden) に重層し、400g35分遠心してえた界面の細胞成分を分離採取した。

ii) E-rosette forming cell (E-RFC) と non E-rosette forming cell (non E-RFC) の分離 : Yata ら²⁰⁾の方法に準じ、whole lymphocytes 5×10^6 個/ml (FCS に浮遊) と等量の2%羊赤血球 (SRBC) 浮遊 FCS を加え 37°C 10分静置、300g5分、水中60分放置し、Ficoll-Paque に重層後 400g30分 4°C で遠心した。E-RFC は管底部に non E-RFC は界面に集まる。SRBC は 0.83% NH₄Cl、20mM triss buffer, pH 7.4 で完全溶血させて使用した。

iii) EA-rosette forming cell (EA-RFC) と non EA-rosette forming cell (non EA-RFC) の分

The mechanism of hepatocytic injury in patient with chronic active hepatitis. **Toshihisa Shintani**, Department of Pathology (II), (Director : Prof. G. Ohta) School of Medicine, Kanazawa University.

離：Parishら²¹⁾の方法に準じ、5% SRBC (HBSSに浮遊)と等量の7S anti SRBC antibodyとを37°C30分静置し、200g10分3回洗浄し、感作EAとする。whole lymphocytes 1×10^7 個/ml (培養液に浮遊)と等量の5%感作EAを加え、水平回転振盪器30回転/分で37°C15分接触させ、この浮遊液をFicoll-Paque比重遠心し、前述のごとく、EA-RFCとnon EA-RFCに分離した。

iii) EAC-rosette forming cell (EAC-RFC) と non EAC-rosette forming cell (non EAC-RFC) の分離：Parishら²¹⁾の方法に準じ、5% SRBC と等量の19S anti SRBC antibodyとを37°C20分静置し、200g10分3回洗浄した。この5%感作EA (HBSSに浮遊)と補体(C)として等量の 10^{-1} 希釈C3Hマウス血清を加え37°C20分静置し、200g10分3回洗浄し、感作EACとした。whole lymphocytes 3×10^6 個/mlと等量の1%感作EAC (培養液に浮遊)を加え、水平回転振盪器で37°C15分接触させ、この浮遊液をFicoll-Paque比重遠心し、前述のごとく、EAC-RFCとnon EAC-RFCを分離した。anti RBC antibodyは西岡²²⁾の方法により、SRBC 5×10^9 個をウサギ耳静脈に注射し作成した。このanti SRBC antibodyを50%飽和硫酸塩析法で粗グロブリン分画をえ、これをFlodinら²³⁾の方法に準じ、Sephadex G-200ゲル濾過法でfirst peakを19S anti SRBC antibodyとし、second peakを7S anti SRBC antibodyとした。至適抗体濃度は赤血球凝集反応で赤血球凝集をおこす最小希釈濃度の1/2とした。

3) micro-cytotoxicity assay 法

Takasugi-Klein²⁴⁾の方法に準じた。培養Coon cellを0.05%トリプシン(DIFCO, USA), 0.02% EDTAで処理し、洗浄し、マイクロプレート(Falcon, No.3034, USA)の小孔に100個づつ散布した。このCoon cellにリンパ球を1対300の比で加え、95% air, 5% CO₂, 37°Cで48時間培養した。リンパ球肝細胞障害値の測定はマイクロプレートを2時間倒立し、小孔をHBSSで3回洗浄し、エタノール固定後、ギムザ染色を施し、生着していた標的Coon cellを数え、無添加コントロールと比較し、減少率を%で求めた。

% cytotoxicity

$$= 100 - \frac{\text{リンパ球添加小孔の平均細胞数}}{\text{リンパ球無添加小孔の平均細胞数}} \times 100$$

4) DLCのblocking test

i) aggregated IgGによるblocking test：慢性活動性肝炎患者のnon E-RFCをaggregated IgG

100 μ g/mlで37°C45分前処理し、DLC testを行なった。aggregated IgGは健康者血清を50%飽和硫酸塩析1回、33%飽和硫酸塩析3回行いIgGをとり出し、これをHallberg²⁵⁾の方法にしたがい、63°C15分加熱変性してaggregated IgGとした。

ii) anti IgG-Fcによるblocking test：慢性活動性肝炎患者のnon E-RFCをeffector cellとして、DLC testを行う際、anti IgG-Fcを希釈して培地に添加した。anti IgG-Fcは市販ウサギ抗人IgG-Fc (Hoechst, No.2934, Germany)を105,000g30分遠心し、上清を用いた。

iii) LSPによるblocking test：慢性活動性肝炎患者のnon E-RFCをLSP 100 μ g/mlで37°C30分前処理し、DLC testを行なった。LSPはMeyer zum Büschenfeldeら⁸⁾の方法に準じ、ラット肝をmedium (0.25M sucrose, 0.5mM CaCl₂, 5mM triss buffer, pH 7.4)で灌流し、細切粥化し、150,000g60分遠心して上清をとり、それをSephadex G-100ゲル濾過し、first peakをSephadex G-200ゲル濾過し、Millerら²⁶⁾の報告にあるように、更にSephadex 6Bで精製分離した。LSPは調整後10日以内に使用した。

iv) IHSMによるblocking test：慢性活動性肝炎患者のnon E-RFCをIHSM 100 μ g/mlで37°C30分前処理し、DLC testを行なった。IHSMはBerman²⁷⁾の方法に準じ、ラット肝をmedium (0.25M sucrose, 0.5mM CaCl₂, 5mM triss buffer, pH 7.4)で灌流、細切し、Dounce homogenizerを用い粥化し、150g10分遠心し、上清を2,000g20分遠心し、さらに沈渣を2,000g20分7回洗浄し粗膜分画とした。これをmedium (0.5mM CaCl₂, 5mM triss buffer, pH 7.4)に再浮遊し、蔗糖勾配相に重層し、Beckman SW-27ローターで25,000rpm 2時間遠心した。IHSMはd = 1.160とd = 1.180の相に集まり、これを採取し4倍量の純水と混和し、27,000rpm30分遠心後の沈渣をえた。IHSMは使用時、超音波で破碎して用いた。

2. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)

1) 標的細胞は慢性活動性肝炎患者の56°C30分不活化血清でコートしたCoon cellを用いた。

2) リンパ球は健康人のnonimmune non E-RFCを用いた。

3) ADCCのmicro-cytotoxicity assay法はTakasugi-Klein²⁴⁾の方法に準じ、Coon cellをマイクロプレートの小孔に100個散布し、6時間培養生着させ、小孔の培養液を排除したあと、上記の 10^{-1} 希釈不活化血清を加え2時間作用させた。その後、小孔を

Table 1 % cytotoxicity in various chronic liver diseases and controls, using whole lymphocytes, E-RFC and non E-RFC

	whole lymphocytes	E-RFC	non E-RFC
chronic persistent hepatitis	6.4 ± 9.6 (n = 6) P < 0.1	- 7.2 ± 12.4 (n = 7) N. S.*	22.3 ± 21.8 (n = 7) N. S.*
chronic active hepatitis	24.2 ± 5.9 (n = 8) P < 0.001	- 1.2 ± 25.8 (n = 16) N. S.*	44.9 ± 15.6 (n = 28) P < 0.001
liver cirrhosis	1.0 ± 13.8 (n = 6) N. S.*	-12.8 ± 11.1 (n = 6) N. S.*	23.1 ± 27.4 (n = 7) N. S.*
controls	-11.8 ± 14.9 (n = 5)	- 8.4 ± 15.9 (n = 5)	16.8 ± 4.4 (n = 5)

* N. S.: statistically not significant.

3回HBSSで充分洗浄した。この被検血清でコートした標的Coon cellに健常人のnonimmune non E-RFCを1対300の比で加え、95% air, 5% Co₂, 37°Cで48時間培養した。ADCC testによるリンパ球肝細胞障害値の測定は前述の方法によった。

4) ADCCの blocking test

i) aggregated IgGによる blocking test : 健常人のnonimmune non E-RFCをaggregated IgG 100μg/mlで37°C45分前処理し、上記のADCC testを行った。

ii) anti IgG-Fcによる blocking test : 上記ADCC testを行う際に、希釈したanti IgG-Fcを培地に添加した。

5) ウサギ抗Coon cell抗血清によるADCC test
慢性活動性肝炎患者血清の代りに、ウサギ抗Coon cell抗血清を漸次希釈してCoon cellを前処理し、健常人のnonimmune non E-RFCを用いてADCC testを行った。ウサギ抗Coon cell抗血清はPerlmannら²⁰⁾の方法に準じて、Coon cell 1×10^7 個と等量1mlのcomplete Freund's adjuvantと共にウサギ筋肉内注射し、3週後にCoon cell 1×10^7 個を耳静脈注射して作成した。この抗血清はOuchterlony法で8倍まで沈降線がえられ、使用時56°C30分不活化し、8倍に希釈したものを標準力価とした。

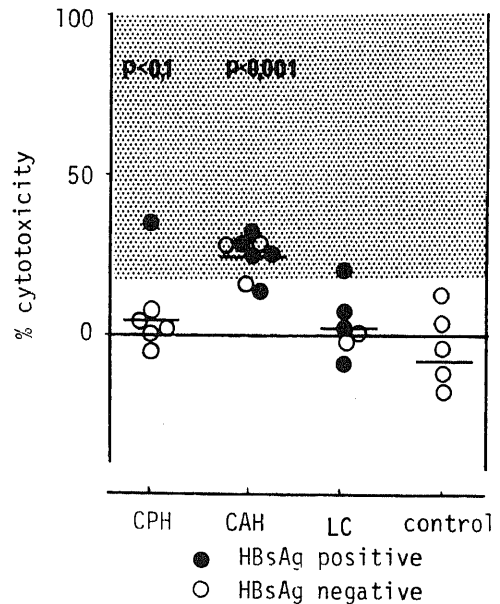


Fig.1 Direct lymphocyte-mediated cytotoxicity of whole lymphocytes from patients with chronic liver diseases and controls to Coon cells.

CPH : chronic persistent hepatitis.

CAH : chronic aitive hepatitis.

LC : liver cirrhosis.

結 果

1. DLC test

Table 1, Fig. 1 に示すように、慢性活動性肝炎患者の whole lymphocytes を effector cell に用いると、% cytotoxicity (mean \pm SD) は $24.2 \pm 5.9\%$ であり、健常者の $-11.8 \pm 14.9\%$ に比して明らかに高かった ($p < 0.001$)。慢性非活動性肝炎と肝硬変では健常者との間に有意の差がなかった。そこで Fig. 2 に示すように、E-RFC を effector cell に用いると、いずれの慢性肝疾患にも健常者との間に有意差をみなかった。これに対して、Fig. 3 に示すように、慢性活動性肝炎患者の non E-RFC を effector cell に用いると、% cytotoxicity は $44.9 \pm 15.6\%$ であり、健常者の $16.8 \pm 4.4\%$ に比して明らかに高かった ($p < 0.001$)。慢性非活動性肝炎と肝硬変では健常者との間に有意の差がなかった。また、Table 2, Fig. 4 に示すように、慢性活動性肝炎患者の EA-RFC を effector cell に用いると、% cytotoxicity は $53.6 \pm 19.3\%$ であり、健常者での $17.8 \pm 24.5\%$ に比して明らかに高かった ($p < 0.01$)。しかし、non EA-RFC, EAC-RFC.

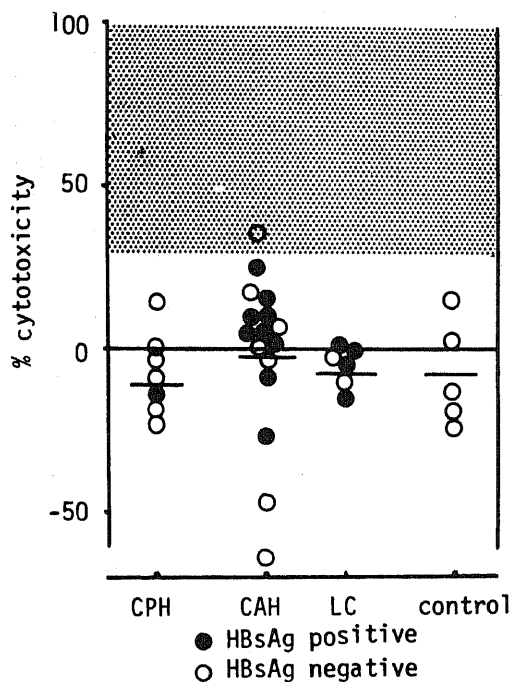


Fig. 2 Direct lymphocyte-mediated cytotoxicity of E-RFC from patients with chronic liver diseases and controls to Coon cells.

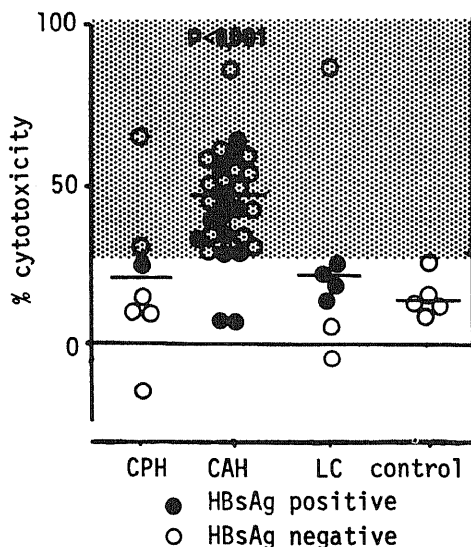


Fig. 3 Direct lymphocyte-mediated cytotoxicity of non E-RFC from patients with chronic liver diseases and controls to Coon cells.

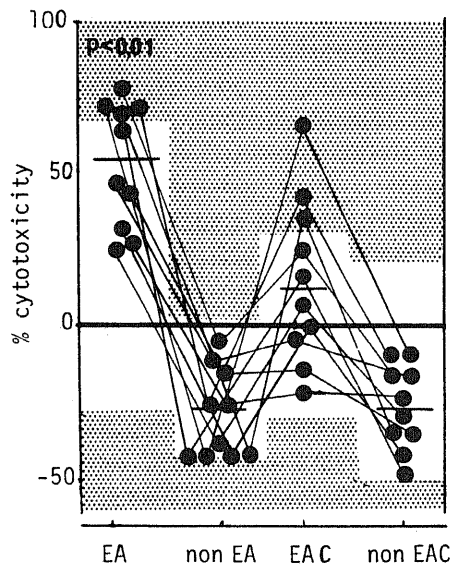


Fig. 4 Direct lymphocyte-mediated cytotoxicity of various lymphocyte fractions from patients with CAH to Coon cells.

Table 2 % cytotoxicity in patients with chronic active hepatitis and controls, using EA-RFC, non EA-RFC, EAC-RFC and non EAC-RFC.

	cases	EA-RFC	non EA-RFC	EAC-RFC	non EAC-RFC
chronic active hepatitis	10	53.6 ± 13.0 P < 0.01	-29.2 ± 13.5 N. S. *	15.3 ± 25.4 N. S. *	-26.2 ± 12.4 N. S. *
controls	7	17.8 ± 24.5	-20.6 ± 10.7	0.2 ± 14.9	-15.9 ± 18.7

* N.S. : statistically not significant.

Table 3 Positive cytotoxic activity of non E-RFC from patients with chronic liver diseases with or without HBsAg.

	HBsAg	cases	positive cases of cytotoxicity	positive %
chronic persistent hepatitis	(-)	6	1	17 %
	(+)	1	0	0 %
chronic active hepatitis	(-)	15	15	100 %
	(+)	13	11	85 %
liver cirrhosis	(-)	3	1	33 %
	(+)	4	0	0 %

non EAC-RFC を effector cell に用いると、慢性活動性肝炎患者と健常者との間に有意差をみださなかった。Table 3 に示すように、DLC テストにおける健常者の non E-RFC による % cytotoxicity の mean + 2SD 以上をリンパ球肝細胞障害能陽性例とすると、慢性活動性肝炎患者 28 例中 26 例の non E-RFC に陽性例がみられた ($p < 0.001$)。リンパ球肝細胞障害能陽性例と HBsAg 保有の有無について検討すると、両者の相関は見出さなかった。

2. 慢性活動性肝炎患者 non E-RFC による DLC の blocking test.

Fig.5 に示すように、aggregated IgG で non E-RFC を前処理すると、% cytotoxicity は 16.8 ± 4.4 % となり、無処理 non E-RFC の 62.9 ± 12.8 % に比して明らかに低下した ($p < 0.001$)。anti IgG-Fc を DLC 培地に添加しておくとも、% cytotoxicity は 32.8 ± 13.6 % と明らかに低下した ($p < 0.001$)。Fig.6 に示すように、LSP で non E-RFC を前処理すると、% cytotoxicity は 13.9 ± 23.0 % となり、無処理 non E-RFC の 50.5 ± 23.6 % に比して明らかに低下した

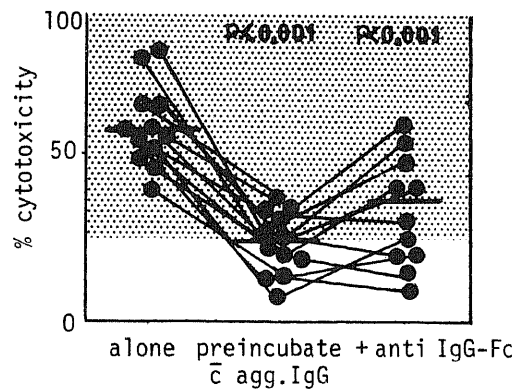


Fig.5 Blocking tests of DLC with aggregated IgG and anti IgG-Fc, using non E-RFC from patients with CAH.

($p < 0.01$). 同様、IHSM で前処理しても、% cytotoxicity は 25.5 ± 24.5 % と明らかに低下した ($p < 0.05$).

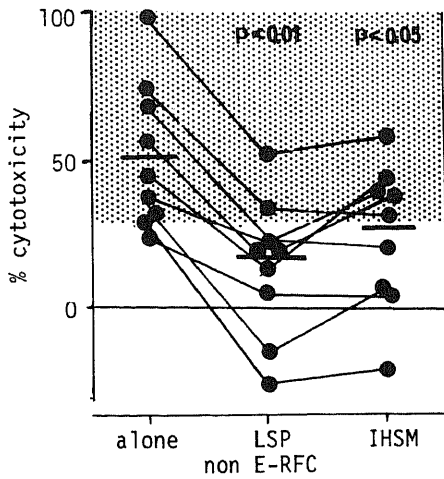


Fig.6 Blocking tests of DLC with LSP* and IHSM**, using non E-RFC from patients with CAH.

*LSP : liver specific lipoprotein.

**IHSM : insoluble hepatocyte-surface membrane.

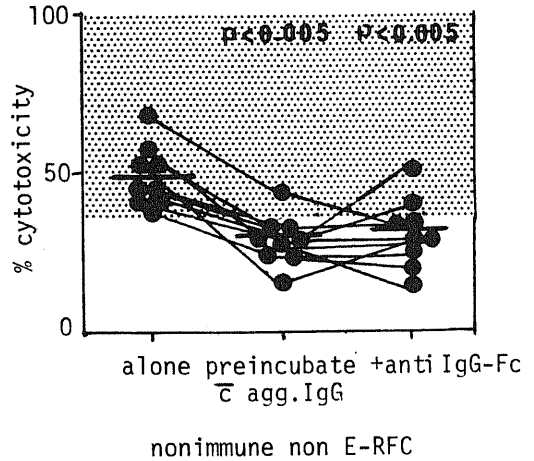


Fig.8 ADCC test and blocking tests to CAH sera-coated Coon cells before and after treated with aggregated IgG or anti IgG-Fc, using nonimmune non E-RFC from healthy volunteer.

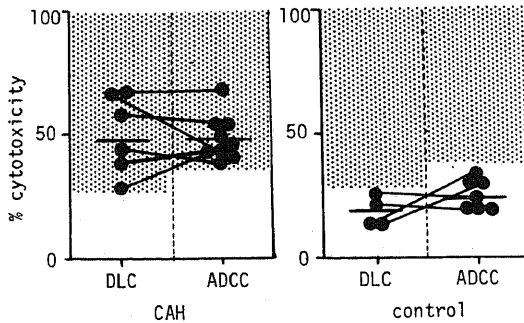


Fig.7 Comparison with direct lymphocyte-mediated cytotoxicity of non E-RFC and ADCC of nonimmune non E-RFC to sera-coated Coon cells (left : CAH, right : controls).

3. 慢性活動性肝炎患者血清を用いた ADCC test.

Fig.7 の各々の左側に示すように、慢性活動性肝炎患者血清でコートした Coon cell を標的細胞とし、健康者から分離した nonimmune non E-RFC を effector cell として、ADCC を測定すると、% cytotoxicity は $48.4 \pm 9.0\%$ であり、健康者血清コ

ADCC by anti Coon serum

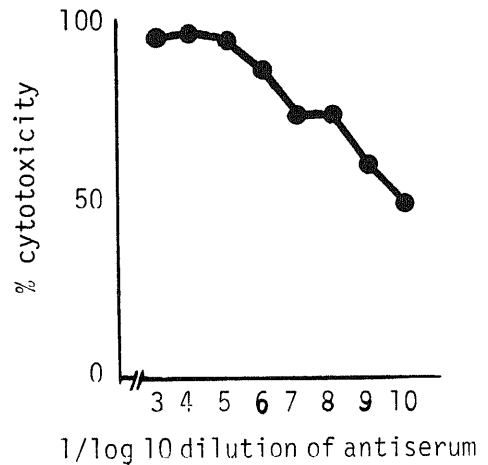


Fig.9 ADCC by preincubation of rabbit anti Coon cell antisera to Coon cell, using nonimmune non E-RFC from healthy volunteer.

ート標的 Coon cell を用いたときの $26.0 \pm 5.0\%$ に比して明らかにリンパ球肝細胞障害能がみられた ($p < 0.001$). ADCC テストを行なった慢性活動性肝炎患者 9 例中 7 例の DLC テストにみられる % cytotoxicity は $47.9 \pm 15.9\%$ であり、健康者 4 例の DLC テストの % cytotoxicity は $20.3 \pm 3.5\%$ であ

った。また ADCC テストにおける健常者血清コート標的 Coon cell を用いた control 群の % cytotoxicity の mean + 2SD 以上をリンパ球肝細胞障害陽性例とすると、慢性活動性肝炎患者 9 例中全例陽性となった ($p < 0.001$)。

4. ADCC の blocking test.

Fig. 8 に示すように、aggregated IgG で健常人 nonimmune non E-REC を前処理し、慢性活動性肝炎患者血清コート Coon cell に対する % cytotoxicity を測定すると、 $31.1 \pm 10.5\%$ となり、無処理群の $48.4 \pm 9.0\%$ に比して明らかに低下した ($p < 0.005$)。anti-IgG-Fc を培地に添加して ADCC テストを行なうと、同様 $32.5 \pm 8.5\%$ と明らかに低下した ($p < 0.005$)。

5. ウサギ抗 Coon cell 抗血清を用いた ADCC test.

Fig. 9 に示すように、標準力価をもつウサギ抗 Coon cell 抗血清を $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 希釈して、Coon cell を前処理し、ADCC テストを行うと、100% 近くの % cytotoxicity が出現し、このシステムでも ADCC が成立した。抗血清濃度を漸次希釈して Coon cell を前処理していくと、% cytotoxicity も低下し、抗血清の 10^{-10} 希釈濃度では ADCC がみられなくなった。これを逆にいえば、 10^{-9} まで希釈した抗血清を用いて Coon cell を前処理しても、健常者 nonimmune non E-REC の ADCC が陽性となることが知られた。

考 案

慢性活動性肝炎の組織像は、グリソン鞘内のリンパ球浸潤とその部位に接着した小葉辺縁の持続する肝細胞崩壊に特徴づけられる。この機序の一つは免疫的なものと考えられ、液性免疫と細胞性免疫の両面からの追求がなされてきた。ごく最近では、慢性活動性肝炎患者のリンパ球と肝細胞とを、in vitro で、培養し、肝細胞崩壊をみる研究が試みられており、1974 年 Thomson ら²⁹⁾、1975 年 Paronetto ら³⁰⁾、Wands ら³¹⁾、1976 年 Cochrane ら³²⁾、Geubel ら³³⁾、1977 年 Kakumu ら³⁴⁾、原ら³⁵⁾は標的肝細胞にそれぞれ、ウサギ培養肝細胞、自己肝細胞、人肝由来の Chang cell などを用い、DLC テストを行っている。そして、慢性活動性肝炎患者の末梢血リンパ球にそれらの標的細胞を障害する活性のあることを指摘している。本実験では、標的細胞にラット成熟肝実質細胞由来の Coon cell を用い、各種の慢性肝疾患患者の末梢血リンパ球の肝細胞障害能 (DLC) をしらべた。まず、患者の whole lymphocytes を effector cell に用いると、慢性活動

性肝炎患者にリンパ球肝細胞障害能がみられ、慢性非活動性肝炎や肝硬変にはみられず、諸家の成績に一致した。そこで、whole lymphocytes のいかなるリンパ球が肝細胞崩壊をひきおこす活性をもつのかをみるために、リンパ球の各種の subpopulation を分離検討してみた。羊赤血球とロゼット形成能をもつ E-REC (T-cell) には肝細胞障害の活性がなく、羊赤血球とロゼット形成能のない non E-REC に肝細胞障害の活性がみられ、とりわけ慢性活動性肝炎患者 non E-REC には 93% の高率に肝細胞障害陽性例がみられた。この non E-RFC は多種の subpopulation を含む分画なので、慢性活動性肝炎患者の non E-RFC の中で、どのような surface marker をもつ subpopulation が同活性をもつかをしらべた。慢性活動性肝炎患者リンパ球を Fc-receptor を有する subpopulation (EA-RFC) と C3-receptor を有する subpopulation (EAC-RFC) とに分け検討すると、Fc-receptor を有する EA-RFC に肝細胞障害の活性をみとめたが、C3-receptor を有する EAC-RFC には健常者に比して、同活性の統計上の有意差をみとめなかった。また、Fc-receptor をブロックする aggregated IgG で non E-RFC を前処理すると、同活性はほぼ完全に消失し、anti IgG-Fc を DLC テストの培地に添加すると、同活性は同様消失をみることから、DLC 活性は慢性活動性肝炎患者リンパ球の non E-RFC に含まれるリンパ球の中でも Fc-receptor を有するリンパ球だと考えた。Cochrane ら³²⁾はウサギ培養肝細胞を標的細胞に用いた DLC テストで、慢性活動性肝炎患者のリンパ球中、DLC の活性をもつのは、B-cell rich fraction (non E-RFC と同義) であり、T-cell rich fraction (non EAC-RFC) でないとし、このような活性をもつリンパ球は Perlmann ら²⁸⁾のいう C3-receptor をもつ killer lymphocyte ("K-cell") であろうとしている。原ら³⁵⁾は Chang cell を標的細胞に用い、non E-RFC をさらに anti-Fab Sephadex column を用いて surface immunoglobulin をもつ B-cell と surface immunoglobulin をもたない null cell とに分け、慢性活動性肝炎患者の DLC 活性をしらべると、null cell が DLC 活性をもつリンパ球であるとしている。このように、慢性活動性肝炎患者末梢血リンパ球を用い、肝細胞障害の活性を DLC テストで検索すると、同活性をもつリンパ球は、羊赤血球とロゼット形成能をもたないことでは一致しているが、Fc-receptor を有するリンパ球なのか、C3-receptor を有するリンパ球なのか、surface immunoglobulin をもたない null cell なのか、一定の見解に達していない。このことは、用

いた標的肝細胞の種類、リンパ球分離法の相違によることも考えられる。しかし、Fc-receptor をもつ subpopulation は C3-receptor をもつ subpopulation や null cell 分画と、それぞれオーバーラップする部分があり、effector cell の同定は今後の重要な課題である。

著者の標的細胞として用いたラット肝実質細胞由来の Coon cell は、野々村¹³⁾¹⁴⁾、太田ら¹⁶⁾¹⁷⁾の主張するラット IHSM 抗原をもつことを前報³⁶⁾で報告した。このことは株化以来 10 年を経た Coon cell が株化当時とは異なり、肝細胞としての多くの特性を消失しているであろうが、肝膜特異性をもちつづけているのではないかと考える。しかし、Coon cell の細胞膜には、Meyer zum Büschenfelde ら⁸⁾⁹⁾の主張する LSP 抗原を蛍光抗体法上みだしえなかった(未発表)。ところが、ラット LSP とラット IHSM で慢性活動性肝炎患者の non E-RFC を前処理してから、標的 Coon cell で DLC テストを検すると、共に明らかに肝細胞崩壊の活性が低下した。このような DLC 反応の阻止現象は、これまでの発表にない全く未知の免疫現象による阻止反応である。そして、LSP を含んでいないと思われる Coon cell であっても、検出不能の微量の LSP を膜表面に有しておれば、IHSM と同様、LSP のリンパ球前処理によって阻止反応がおこってもよいように思われる。Thomson ら²⁹⁾は人 LSP と共通抗原をもつウサギ培養肝細胞³⁷⁾を用い、慢性活動性肝炎患者末梢血リンパ球との DLC テスト培地に LSP を添加して、DLC が 55.6% から 5.3% へと低下したことから、慢性活動性肝炎では LSP で感作された状態にあり、この感作リンパ球が肝細胞崩壊の活性を発揮するのであるとしている。著者の実験では、LSP のみならず IHSM でも慢性活動性肝炎患者リンパ球が感作されており、野々村ら^{13)~15)}、太田ら¹⁶⁾¹⁷⁾の MIF テストでの成績を裏付けた。つぎに、本実験の DLC がいかなる機序で肝細胞崩壊をひきおこすのかを考えてみると、DLC の阻止反応の実験で述べたように、aggregated IgG、anti IgG-Fc で同活性の阻止がみられることから、Fc-receptor をもつ感作 EA-RFC が、肝細胞膜と in vitro で反応している不明の IgG 抗体の Fc portion と結合し、肝細胞崩壊をひきおこすと考えるのが妥当であろう。このことは Cochrane ら³²⁾の推定と一致し、一般的な考え方となりつつあるようである。つまり、本実験の DLC に働いているメカニズムは antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity の機序によるものとする。しかし、本実験の DLC テストには抗体の特別の添加がなされておらず、抗体の由来については不

明である。そこで、別の実験として確実な ADCC システムをつくり、抗体の由来を検討した。ここに用いた ADCC システムは抗体のソースとして慢性活動性肝炎患者血清を用い、この血清でコートした Coon cell を標的細胞とし、健常者の一定の nonimmune non E-RFC を effector cell とし、DLC のメカニズムを考える上で有用で、より純な姿での ADCC システムと考える。この結果、慢性活動性肝炎患者血清 9 例中全例に ADCC を陽性化する因子の出現をみとめた。そして、この反応は DLC テストと同様、aggregated IgG や anti IgG-Fc で明らかに阻止された。Kawanishi³⁸⁾は慢性活動性肝炎患者血清でコートした Chang cell を標的細胞に健常者の nonimmune lymphocytes を effector cell に用い、ADCC テストを行ない、anti IgG、anti IgG-Fc でこの反応が阻止されたが、anti IgA、anti IgM、anti IgG-Fab では阻止されなかったとしている。又、この慢性活動性肝炎患者血清中には Chang cell と反応する肝細胞表面膜結合性 IgG を証明し、Hopf ら³⁹⁾⁴⁰⁾の自己肝細胞やウサギ培養肝細胞を用いた成績を支持している。著者らも Coon cell 表面膜結合性 IgG を慢性活動性肝炎患者 ADCC 陽性血清 9 例を 6 例に証明し、すでに報告した^{41)~43)}。この ADCC システムで、患者血清の代りに、ウサギ抗 Coon cell 抗血清を用いて検すると、 10^{-9} 希釈濃度の抗血清が ADCC 成立の最低線であり、 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 希釈濃度抗血清で ADCC がほぼ 100% 近くとなり、ごく微量の抗血清でもこの反応が成立することを知った。これらのことから、慢性活動性肝炎患者血清中にみられる ADCC を陽性化する因子は恐らく IgG 膜抗体そのものであり、そのごく微量の存在下で ADCC が起ることを示唆している。

さて、慢性活動性肝炎患者のリンパ球が DLC 活性をもつのは ADCC と同一の免疫メカニズムによるであろうかと推定するには、どうしても DLC テストの培地中に IgG 膜抗体の存在を証明しなければならない。その抗体の由来について、第 1 にリンパ球により培地中で産生される、第 2 にリンパ球により培地に遊離あるいは複合体の姿で持ちこまれる、とする 2 つの考え方が出来る。著者は後者の持ち込み説を支持する。というのは、慢性活動性肝炎患者の DLC 活性を有する non E-RFC を 48 時間培養してから、Coon cell 培地に添加して DLC テストを試みると、肝細胞障害の活性は完全に消失する(未発表)。このことは、リンパ球表面膜に持ち込まれていた IgG 膜抗体あるいはその複合体が最初のリンパ球の培養中に放出され、そのようなリンパ球を DLC テストの培地に加えても DLC が発

現しなないと考えた。これについては目下さらに詳細な検討を試みている。

結 語

慢性肝炎患者の末梢血リンパ球が、培養肝細胞を障害する活性を有するか否かを direct lymphocyte-mediated cytotoxicity test で検し、また慢性活動性肝炎患者血清でコートした標的肝細胞と健常人の nonimmune non E-RFC と用いた antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity test で調べ、以下の結論をえた。

1) DLC テストでは慢性活動性肝炎患者 28 例中 26 例 ($p < 0.001$)、慢性非活動性肝炎患者 7 例中 1 例、肝硬変患者 7 例中 1 例にリンパ球肝細胞障害陽性例をみとめた。

2) このリンパ球肝細胞障害陽性例と血中 HBsAg の有無とは相関をみいださなかった。

3) DLC テストで肝細胞障害をひきおこす effector cell は non E-RFC 分画 ($p < 0.001$)、EA-RFC 分画 ($p < 0.01$) にみとめられたので、Fc-receptor cell をもつリンパ球であろうと考えた。

4) DLC テストで慢性活動性肝炎患者の non E-RFC による肝細胞障害の活性は aggregated IgG, anti IgG-Fc で処理すると共に低下した ($p < 0.001$)。また、この non E-RFC を LSP や IHSM で前処理すると活性は共に低下した ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。

5) 慢性活動性肝炎患者血清中には、ADCC テストを陽性化する因子が全例にみられ、健常人血清中にはみられなかった ($p < 0.001$)。

6) この ADCC の反応は、aggregated IgG や anti IgG-Fc で共に阻止された ($p < 0.005$)。

7) 抗 Coon cell 抗血清を用いて ADCC テストを行なうと、ごく微量の抗血清 (10^{-9} で標的肝細胞をコートしても ADCC 陽性であった。

以上の in vitro の cytotoxicity テストの結果から、慢性活動性肝炎患者の遷延する肝細胞崩壊は肝内で肝細胞膜を反応の場とする anti body-dependent cell-mediated cytotoxicity が持続している結果であろうと考えられる。

なお本論文の要旨の一部は 1977 年第 13 回日本肝臓学会、1977 年第 19 回日本消化器病合同秋季大会において発表した。

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました。恩師太田五六教授に深く感謝の意を表すると共に、

研究に御協力いただいた第二病理野々村昭孝講師および諸先生方、貴重な臨床材料を快よく提供して下さった金沢大一内科服部信教授、小林健一講師、加登康洋博士、国立金沢病院内科杉岡五郎博士の諸先生方に心から深謝致します。なお本研究の一部は昭和 52 年度文部省科学研究費課題番号 248146 の援助を受け、記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Mackay, I. R., Taft, L. I. & Cowling, D. C. : Lancet, II, 1323 (1956).
- 2) Blumberg, B. S., Alter, H. J. & Visniah. : JAMA, 191, 541 (1965).
- 3) Almeida, J. D. & Waterson, A. P. : Lancet, II, 983 (1969).
- 4) Dudley, F. J., Fox, R. A. & Sherlock, S. : Lancet, I, 723 (1972).
- 5) Popper, H. & Mackay, I. R. : Lancet, I, 1161 (1972).
- 6) Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R. : Lancet, II, 1543 (1974).
- 7) Edgington, T. S. & Chisari, F. V. : Amer. J. Med. Sci., 270, 213 (1975).
- 8) Meyer zum Büschenfelde, K. H. : Ztschr. ges. exp. Med., 148, 131 (1968).
- 9) Meyer zum Büschenfelde, K. H. & Hopf, u. : Br. J. exp. Path., 55, 498 (1974).
- 10) 梶原光令 : 肝臓, 12, 328 (1971).
- 11) 津田功雄 : 十全医会誌, 80, 349 (1971).
- 12) 俵矢勝二 : 十全医会誌, 84, 253 (1975).
- 13) 野々村昭孝 : 臨床免疫, 7, 1125 (1975).
- 14) 野々村昭孝 : 十全医会誌, 85, 272 (1976).
- 15) 野々村昭孝・新谷寿久・吉沢浩司・太田五六・西村 功・杉岡五郎 : 日消誌, 73, 1349 (1976).
- 16) 太田五六・野々村昭孝・西村 功・杉岡五郎・加登康洋・小林健一 : 肝臓, 17, 21 (1976).
- 17) Ohta, G., Nonomura, A. & Nishimura, I. : Clin. exp. Immunol., 26, 491 (1976).
- 18) Coon, H. G. : J. Cell Biol., 39, 29a (1968).
- 19) Bøyem, A. : Scand. J. Clin. & Lab. Invest., 21, Supp. 97 (1968).
- 20) Yata, J., Desgranges, C., Tachibana, J. & Jhé, G. : Biomedicine [Express], 19, 475 (1973).
- 21) Parish, C. R. & Hayward, S. A. : Proc. R. Soc. Lond. B., 187, 47 (1974).
- 22) 西岡久壽彌 : 蛋白質核酸酵素, 11, 1485 (1966).

- 23) Flodin, E. & Killander, J. : Biochem. Biophys. Acta, 63, 403 (1962).
- 24) Takasugi, M. & Klein, E. : Transplantation, 9, 219 (1970).
- 25) Hallberg, T. : Scand. J. Immunol., 3, 117 (1974).
- 26) Miller, J., Smith, M. G. M., Mitchell, C. G., Reed, W. D., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R. : Lancet, II, 296 (1972).
- 27) Berman, H. M., Gram, W. & Spirtes, M. A. : Biochim. Biophys. Acta, 183, 10 (1969).
- 28) Parlmann, P., Parlmann, H. & Wigzell, H. : Transplant. Rev., 13, 91 (1972).
- 29) Thomson, A. D., Cochrane, M. A. G., Mcfarlane, I. G., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R. : Nature, 252, 721 (1974).
- 30) Paronetto, F. & Vernace, S. : Clin. exp. Immunol., 19, 99 (1975).
- 31) Wands, J. R. & Isslbacher, K. J. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1301 (1975).
- 32) Cochrane, A. M. G., Moussouros, A., Thomson, A. D., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R. : Lancet, I, 441 (1976).
- 33) Geubel, A. P., Keller, R. H., Summerskill, W. H. J., Dickson, E. R., Tomasai, J. B. & Shorter, R. G. : Gastroenterology, 72, 450 (1977).
- 34) Kakumu, S. & Leevy, C. : Gastroenterology, 72, 594 (1977).
- 35) 原 建樹・各務伸一・郷治広達・篠田知生・奥山澄彦・坂本信夫・服部 武・加藤陽一郎 : 肝臓, 18, 289 (1977).
- 36) 新谷寿久・野々村昭孝・太田五六・加登康洋・小林健一・杉岡五郎 : 日消誌, 75, 48 (1978).
- 37) Hopf, U., Meyer zum Büschenfelde, K. H. & Frewdenberg, J. : Clin. exp. Immunol., 16, 117 (1974).
- 38) Kawanishi, H. : Gastroenterology, 73, 549 (1977).
- 39) Hopf, U., Arnold, W., Meyer zum Büschenfelde, K. H., Foster, E. & Bolte, J. P. : Clin. exp. Immunol., 22, 1 (1975).
- 40) Hopf, U., Meyer zum Büschenfelde, K. H. & Arnold, W. : New Engl. J. Med., 294, 578 (1976).
- 41) 新谷寿久・野々村昭孝・太田五六 : 肝臓 (印刷中).
- 42) 野々村昭孝・新谷寿久・太田五六 : 医学のあゆみ (印刷中).

A b s t r a c t

Direct lymphocyte-mediated cytotoxicity (DLC) test was investigated to see patients with chronic liver diseases and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) test was applied to the liver parenchymal cell, coated with heat-inactivated sera from patients with chronic active hepatitis (CAH), using non E-RFC from healthy volunteers.

Results were as follows. 1) DLC was significantly found in 26 of 28 patients with CAH ($P < 0.001$) and not significantly in patients with both chronic persistent hepatitis and liver cirrhosis. 2) DLC was not correlative with the presence of HBsAg or with its absence. 3) DLC was significantly found in non E-RFC ($p < 0.001$) and EA-RFC ($p < 0.01$) from patients with CAH. Therefore, the effector cell may be a Fc-receptor bearing cell. 4) DLC activity of non E-RFC from patients with CAH was reduced by either treatment of non E-RFC with aggregated IgG or addition of anti IgG-Fc ($p < 0.001$), similarly reduced by treatment of non E-RFC with LSP and IHSM ($p < 0.01$, $p < 0.05$). 5) ADCC was significantly found in all of CAH sera-coated target cell group ($p < 0.01$) and non of control sera-coated target cell group, using non-immune non E-RFC. 6) APCC activity was reduced by treatment of nonimmune non E-RFC with aggregated IgG and addition of anti IgG-Fc ($p < 0.005$). 7) ADCC was apparent in the dilution of anti liver cell antisera as high as 10^{-9} and maximal $10^{-3} \sim 10^{-5}$.

These results of "in vitro" cytotoxicity suggest that ADCC mechanism may play "in vivo" a main role of progressive destruction of hepatocytes and development of cirrhosis in CAH.
