

細胞性免疫からみた肝炎慢性化機序：
HBsAgと肝細胞表面膜をめぐる宿主の免疫反応

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/2297/8618

細胞性免疫からみた肝炎慢性化機序

HBAgと肝細胞表面膜をめぐる宿主の免疫反応

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)

野々村 昭 孝

(昭和51年2月2日受付)

本論文の要旨の一部は1973年第15回日本消化器病学会合同秋季大会, 1975年第3回日本臨床免疫学会総会シンポジウム—慢性肝炎と免疫—, 1975年第11回日本肝臓学会総会において発表した。

Mackay ら¹⁾により, ルポイド肝炎の提唱がなされ, 自己免疫性肝障害の発生が注目されて20年を経たが, 未だにその機序は明らかでない。現在, 肝疾患でよく出現する流血自己抗体の病因論的意義は否定的であり, とくに Meyer zum Büschenfelde により可溶性肝特異抗原の抽出²⁾と, 実験的肝炎の作成³⁾が報告されてからは, 肝特異成分に対する細胞性免疫が肝細胞崩壊の一つの機序として重要視されている。事実, *in vitro* の検索から, 慢性肝炎活動型やその他の肝疾患患者では, 肝粥⁴⁻⁶⁾や Meyer の抗原^{7,8)}に対して遅延型アレルギー状態にあることが報告されている。

一方, B型肝炎ウイルスである HBAg の発見以来, 肝炎の焦点は HBAg におかれ, HBAg をめぐる肝炎の発生および慢性化機序が次第に解明されつつある。とくに, HBAg それ自体には肝細胞障害性がないと考えられ, 宿主の HBAg に対する免疫反応や, 肝細胞表面膜をめぐる免疫性機序が, 肝炎の発生および慢性化には重要であろうと考えられ, Almeida ら⁹⁾の immune complex 説, Dudley ら¹⁰⁾の細胞性免疫説, Popper ら¹¹⁾や Eddleston ら¹²⁾の自己免疫説などの, 肝炎発生および慢性化に関する試論が提唱されるに至っている。

このように, 肝炎の発生および慢性化機序に関しては, 研究者により意見が異り, 統一した見解をみていない。そこで著者は, HBAg に肝炎発生の焦点を合わせ, 肝細胞崩壊が肝細胞表面膜での免疫反応の結果生ずるとしたら, 流血中に放出される可溶性肝抗原よりも, 肝細胞表面膜の構成成分として肝に固着して

いる不溶性肝抗原の方が, 肝細胞崩壊を考えるうえではより重要であろうと考え, 不溶性肝細胞表面膜を用いて, 種々の肝疾患患者で細胞性免疫を検討し, 同時に HBsAg に対する細胞性免疫やT細胞機能についても検討を加え, 相互の結果を比較検討し, HBAg をめぐる主に肝炎の慢性化機序に関して考察を加えた。著者のような不溶性肝細胞表面膜抗原を用いたこの種の研究報告は, まだ見あたらない。

研究対象および方法

I. 対 象

臨床病歴, 肝機能諸検査成績, 腹腔鏡所見および肝生検所見などから診断した急性肝炎26例, 慢性肝炎非活動型42例, 慢性肝炎活動型39例, 肝硬変59例, Asymptomatic HBAg Carrier¹³⁾ 11例および正常人対照34例の計211例を対象とした。

II. 方 法

1. PHA (phytohemagglutinin) に対する末梢血リンパ球芽球化反応の測定

1) リンパ球培養法: Hirschhorn ら¹⁴⁾の方法に準じて, 患者末梢血を heparin 加にて20ml 採血し, 37°C, 30°傾斜滅菌密栓試験管内に静置し, 上清を約20分間隔で2時間にわたり採取した。この上清 (leucocyte rich plasma) に37°Cに加温した TC Medium 199 (Difco 製) をpH7.2に調製して等量加えたのち, leucocyte rich plasma を角型培養びんに移し, 37°C, 1時間静置後上清を静かに採取し, ガラス面に付着した多核白血球を取り除いた。採取した上清を200g, 5分間遠心し, 沈渣を37°Cに加温し

Cell-mediated immunity in the evolution of chronic liver diseases. —lymphocyte response to purified HBsAg and insoluble liver cell surface membranes— Akitaka Nonomura, Department of Pathology(II), (Director: Prof. G. Ohta) School of Medicine, Kanazawa University.

た Hanks 液 (pH7.2, 1ml 当たり Penicillin G 100単位, Streptomycin 100 μ g を含む) で 3 回洗浄したのちに, 20%の割合に非働化仔牛血清 (阪大微生物研究会製) を含む TC Medium 199 (pH7.2, 1ml 当たり Penicillin G 100単位, Streptomycin 100 μ g を含む) でリンパ球数を100万/mlに調製し, スクリューキャップ付培養びんに 2ml ずつ分注し, Phytohemagglutinin-M (Difco 製) を0.04ml 添加し, 37 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ 傾斜, 5%CO₂, 95% air で72時間培養した。すべての操作は, 無菌的におこなった。

2) 培養リンパ球のDNA合成率の測定: Shtacher¹⁵⁾の方法にしたがって, 収穫の24時間前に, 一培養当たり0.06 μ Ciの thymidine-2-¹⁴C (第1化学製) を加え, 400g, 15分間遠心し, その沈渣を 4 $^{\circ}$ C 生理食塩水で3回洗浄して沈渣を dry ice acetone および37 $^{\circ}$ C water bath で10回凍結, 融解を繰り返して細胞を破壊した。これに 10% Trichloroacetic acid (TCA) を等量加えて細胞を浮遊させ, 4 $^{\circ}$ Cで12時間放置したのち, 1,600g, 10分間遠心し, 沈渣を 4 $^{\circ}$ Cの5% TCA で3回洗浄し, 最終浮遊液を glass fiber paper (GF/C) (Whatman 製) に吸着させ, 無水エタノールで洗浄後, 赤外線ランプで十分に乾燥させた。十分に乾燥した glass fiber paper を PPO-POPOP-トルエン液 (Beckman 製2.5 Diphenyloxazole (PPO) 2.5gと半井化学薬品製 Dimethyl-POPOP 1gを500mlのトルエンに溶かした溶液) 5mlのに入った測定用チューブに入れ, 液体シンチレーションカウンター (Unilax-11A, Nuclear-Chicago Corporation 製) で2分間 thymidine-2-¹⁴Cの取り込みを測定した。この際 Back Ground (B.G.)として, 未処置の glass fiber paper を PPO-POPOP-トルエン液に浸して count を測定し, 以下の式によりリンパ球の刺激率 Stimulation Index (S.I.) を算定した。

$$S.I. = \frac{\text{PHA 添加 cpm} - \text{B.G. cpm}}{\text{PHA 無添加 cpm} - \text{B.G. cpm}}$$

2. 末梢血の T cell population (T細胞分布) の測定

矢田, 橋¹⁶⁾の方法に準じ, heparin 加採血した末梢血 2ml に等量の生理食塩水を加えて混合後, 3ml の Lymphoprep (Nyegaard 社製) の上に静かに重層し, 400g, 30分間遠心してリンパ球を分離した。リンパ球を Hanks 液で3回洗浄後, リンパ球数 5×10^6 個/mlの割合に牛胎児血清 (Flow Laboratories 製) に浮遊した。同じく牛胎児血清に 1×10^8 個/

mlに浮遊したヒツジ赤血球浮遊液を作り, リンパ球浮遊液とヒツジ赤血球浮遊液を等量試験管内で混合し, 37 $^{\circ}$ C, 15分間静置後150g, 5分間遠心し, そのまま 4 $^{\circ}$ Cに2時間静置した。静置後細胞を軽く再浮遊させ, 血算盤にて顕微鏡下で観察し, ヒツジ赤血球 3個以上のロゼット形成細胞を指標として末梢血T細胞を算定した。

3. 抗原の調製

1) 不溶性肝細胞表面膜の調製

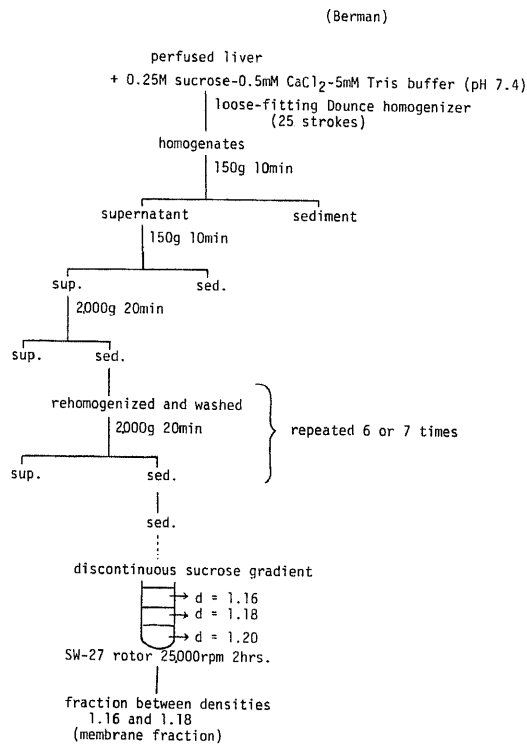
Berman¹⁷⁾の方法を改良し, 等張溶媒を用いてラット肝細胞より分離した (Table 1)。すなわち, 150g前後の Wistar 系ラットを断頭後, 大動脈より0.9%冷食塩水で灌流したのち肝を取り出し, ハサミで肝を細分し, その10倍量の0.25M sucrose-0.5M CaCl₂-5mM Tris buffer (pH7.4) を加えて, 40ml容量の Dounce homogenizer を使用し, ルーズな pestle A を用い, pestle を25回上下させて homogenates を作成した。homogenates に, 150g, 10分間遠心を2回繰り返して, 結合織や未破壊組織を沈渣として除去し, 2回目の上清を集め, 2,000g, 20分間遠心して沈渣を集め, 軽く粥化して2,000g, 20分間の遠心を7回繰り返す, ミクロゾームやミトコンドリアを洗浄して除去し, 最終沈渣を粗膜分画とした。これを, あらかじめ Beckman SW-27 用遠心管に, ショ糖濃度45% W/W (density=1.20), 41% W/W (density=1.18), 37% W/W (density=1.16) のショ糖溶液それぞれ10mlで作製した (0.5mM CaCl₂-5mM Tris buffer, pH7.4にて作製) ショ糖密度勾配液相の最上層に静かに液層を乱さないように重層し, SW-27ローターで25,000rpm, 2時間遠心後, density 1.18と1.16の界面に集まる膜成分を採取し, 約4倍量の蒸留水を加えて27,000g, 30分間遠心し得られた沈渣を1度生理食塩水で洗い, 最終沈渣を不溶性肝細胞表面膜とし, -20 $^{\circ}$ Cに保存した。

2) 不溶性肝細胞表面膜の同定と抗原性の吟味

i) 電顕的観察: 上記不溶性肝細胞表面膜を氷水中で冷却した2.5%グルタルアルデヒド (pH7.4) で1時間固定後, 同様に冷却した2%OsO₄で1時間固定し, エタノールで脱水して Epon 812 に包埋した。超薄切片は Ultratome (L.K.B 社) にて作製し, 型の如くウラニール・鉛二重染色を行い, 電顕 (日立 HU-11) にて観察した。

ii) 蛍光標識抗不溶性肝細胞表面膜抗体の作製と染色: 不溶性肝細胞表面膜を20k cycle/min., 1分間, 超音波で処理 (UR-150P, Tomy Warks Ltd.)

Table 1. Preparation of insoluble liver cell surface membranes (ILSM).



し、等量の complete freund adjuvant とともに家兔に 1 回 3 mg ずつ、2 週間間隔で 3 ヶ月にわたり筋注して抗血清を作製した。こうして得られた抗血清を、1 ml 当り、Avrameas ら¹⁸⁾の方法により不溶化した正常ラット血清 100 mg、腎アセトン粉末 30 mg、脾アセトン粉末 5 mg で吸収し、ゲル内二重拡散法で肝以外の臓器との間に沈降線を形成しないことを確認したのちに、蛍光色素の標識を行った。蛍光色素の標識は、川村¹⁹⁾の方法にしたがい、F/P 1~2 の分画を column chromatography 法で分離し使用した。肝細胞浮遊液を Sheffield ら²⁰⁾の方法により作製し、蛍光抗体直接法により肝細胞膜蛍光を蛍光顕微鏡 (SUR-F, Nikon) 下で観察した。

3) 腎細胞表面膜の調製

Fitzpatrick ら²¹⁾の方法に準じて、不溶性腎細胞表面膜を分離した。すなわち、約 150 g の Wistar 系ラットを断頭後、胸部大動脈より生理食塩水で灌流し、腎を 3 倍量の 0.25 M sucrose-1 mM EDTA とともに、Potter homogenizer で粥化する。homogenates を 2 層のガーゼに通したのち、1.475 g、10

分間遠心し、最初の腎重量 1 g に対して 1 ml の割合に 2 M sucrose (density=1.252) を加えて沈渣を浮遊し、homogenizer で 3 回粥化した。その homogenates を 13,300 g、10 分間遠心して核と cell debris を沈渣として取り除き、上清に 7 倍量の冷蒸留水を加えて等張にしてから、さらに 35,000 g、15 分間遠心する。この沈渣は 2 層になっており、下層 (ミトコンドリア) の沈渣を乱さないように上層 (膜成分) を静かに攪拌して取り、2 回粥化してさらに 35,000 g、15 分間遠心し、先と同様に上層の沈渣を採取した。この操作を 3 回くり返して膜成分のみを洗浄して採取し、最終の沈渣を腎細胞表面膜として -20°C に保存した。

4) 精製 HBsAg

塩化セシウム溶液およびショ糖溶液による密度勾配法²²⁾により精製した HBsAg (Subtype ad γ +ad ω) を、Eisai Co. Ltd. より提供を受け、その 180 倍希釈液 (RIA 法で 1972 cpm, Cut-off 値 346 cpm) を精製 HBsAg とした。

4. 白血球遊走阻止試験 (L-MIT)

Sjoberg & Bendixen²³⁾の方法に準じ、すべて無菌操作で行った。heparin 加にて採血した末梢血20mlを、37°C、30°傾斜滅菌密栓試験管内に静置し、上清を約20分間隔で2時間にわたり採取した。この上清を200g、5分間遠心したのち、沈渣を1ml当り100単位の Penicillin G と 100 μ gの Streptomycin を含む Hanks 液 (pH7.2) で3回洗浄後、10%の割合に非働化牛胎児血清 (Flow Laboratories 製) と、1ml当り100単位の Penicillin G と 100 μ gの Streptomycin を含む TC Medium 199 (Difco 製) pH7.2で1回洗浄し、その沈渣を約10倍量の同質の培養液に再浮遊し、片方を盲端にした capillary tube (Sherwood 製) に水流吸引ポンプを利用してつめた。capillary tube 内につめられた細胞浮遊液を1.500g、10分間遠心して細胞を盲端側に

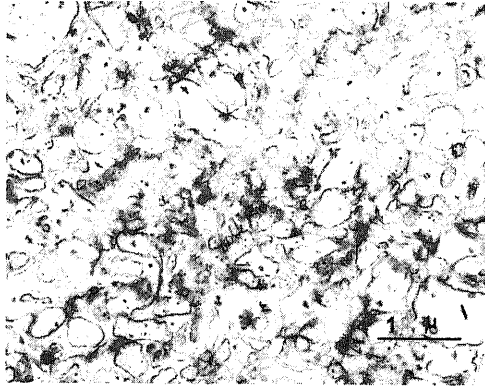


Fig. 1. Electron microscopic appearance of insoluble liver cell surface membranes.

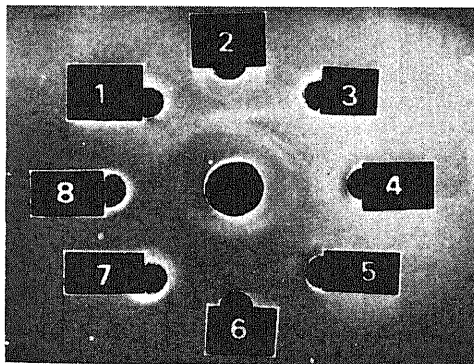


Fig. 2. Immunodiffusion pattern of unabsorbed rabbit antisera in a central large well with ultrasonic homogenates of insoluble liver cell surface membranes ①, liver ②, kidney ③, renal cell membranes ④, skeletal muscle ⑤, serum ⑥, heart ⑦ and spleen ⑧.

つめこみ、細胞層と上清との界面で capillary tube を切断して、小型 migration chamber 内にシリコングリスで固定し、同質の培養液とそれぞれの抗原を添加して、37°C、5%CO₂、95% air で18時間培養した。なお、1個の migration chamber には、2つの capillary tube を固定し、一抗原濃度について2個以上の migration chamber を用意した。18時間培養後、毛細管口より遊走した白血球の遊走面積を写真撮影して算出し、次式により遊走指数 migration index (M.I.) を算定し、M.I. が0.75以下を L-MIF (Leucocyte migration inhibition factor) 陽性と判定した。

$$M.I. = \frac{\text{average area of migration with antigen}}{\text{average area of migration without antigen}}$$

それぞれの膜抗原は1mg/mlの濃度に調製し、使用時に超音波処理 (20k cycle/min., 1分間) により可溶化し、培養液1ml当り、不溶性肝細胞表面膜、不溶性腎細胞表面膜については100 μ g添加し、精製 HBsAg については、先に述べた180倍希釈液を、培養液1ml当り0.1ml添加した。

5. 流血中 HBsAg, HBsAb および流血自己抗体の検出

HBsAg, HBsAb の検出はそれぞれ Solid Phase Radioimmunoassay (Dinabot Ausria II, Dinabot Ausab) にて行い、ごく一部の症例では HBsAg を交叉免疫電気泳動法にて検出した。流血自己抗体は、ラットの胃、肝、腎、顎下腺、腓を基質として、蛍光抗体間接法により検出した。

結 果

I. 不溶性肝細胞表面膜の抗原性の吟味

著者の分離した不溶性肝細胞表面膜の電顕写真を Fig. 1 に示した。ほとんど小水泡様の成分から成り、Berman ら¹⁷⁾の記載に一致する細胞膜所見であった。この不溶性肝細胞表面膜で家兎を免疫し、得られた抗血清と①不溶性肝細胞表面膜、②肝粥、③腎粥、④不溶性腎細胞表面膜、⑤骨格筋粥、⑥正常ラット血清、⑦心粥、⑧脾粥 (血清以外はすべて20k cycle/min., 1分間超音波で処理) とのゲル内二重拡散法の結果が Fig. 2 である。他臓器との間に少なくとも3本の共通抗原が検出され、この抗血清を正常ラット血清、腎アセトン粉末、脾アセトン粉末で吸収した後に、同様にゲル内二重拡散法を行った結果が Fig. 3 である。この吸収抗血清は不溶性肝細胞表面膜①と肝粥②との間にのみ2本の沈降線を形成し、他の臓器との間には沈降線がみられない。つまり著者の調製し

た不溶性肝細胞表面膜の中には、肝特異性の高い抗原を含んでいることがわかり、同時に他の臓器と共通な抗原を含んでいると判断された。また吸収抗血清に FITC を結合させ、膜免疫蛍光法により肝細胞を染色したのが Fig. 4 である。肝細胞表面膜が染色され、そのパターンは、先に Sheffield ら²⁰⁾や、Meyer ら²¹⁾が報告したものと類似していた。しかも、Meyer²¹⁾の分離した可溶性肝特異抗原 (LPG100I) との間で共通した抗原性は認められなかった (Fig. 5)。したがって、著者の調製した不溶性肝細胞表面膜の中には、肝細胞表面膜にあって、しかも肝特異性の

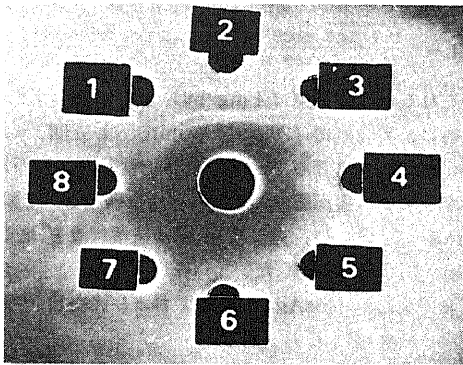


Fig. 3. Immunoprecipitation pattern of absorbed rabbit antisera in a central large well with ultrasonic homogenates of insoluble liver cell surface membranes (ILSM) ①, liver ②, kidney ③, renal cell membranes ④, skeletal muscle ⑤, serum ⑥, heart ⑦ and spleen ⑧. There are two precipitin lines between absorbed antisera and either ILSM ① or ultrasonic homogenates of liver ② but no reaction with the other organ homogenates (③ to ⑧).

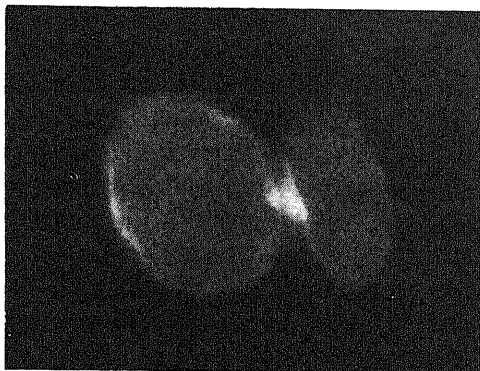


Fig. 4. Membrane fluorescence of isolated rat hepatocytes exposed FITC-labelled absorbed antisera. Specific fluorescence is seen on the surface membrane of isolated liver cells.

高い抗原を含み、かつ Meyer のいう肝特異抗原とは異なる抗原が含まれていると判断された。

II. 末梢血リンパ球の PHA に対する反応 (PHA 反応)

急性肝炎6例、慢性肝炎非活動型9例、慢性肝炎活動型14例、肝硬変18例、HBsAg Carrier 4例および正常人対照15例の PHA 反応の結果を Table 2 に示した。正常人対照の平均刺激率 (S.I.) は、 122.4 ± 37.1 ($M \pm S.D.$) であり、肝疾患ではそれぞれ、急性肝炎 64.8 ± 19.9 、慢性肝炎非活動型 86.4 ± 37.6 、慢性肝炎活動型 53.5 ± 23.2 、肝硬変 54.1 ± 38.7 、HBsAg Carrier 36.2 ± 18.3 であった。正常人対照に比べ、急性肝炎 ($p < 0.01$)、慢性肝炎非活動型 ($p < 0.05$)、慢性肝炎活動型 ($p < 0.001$)、肝硬変 ($p < 0.001$) および HBsAg Carrier ($p < 0.001$) は、推計学的に有意な PHA 反応の低下を示した。

正常人対照の Mean-2S.D. (S.I.=48.2) 以下の値を PHA 反応低下とみなすと (Fig. 6)、急性肝炎6例中1例 (16.7%)、慢性肝炎非活動型9例中2例 (22.2%)、慢性肝炎活動型14例中7例 (50.0%)、肝硬変18例中8例 (44.4%) および HBsAg Carrier 4例中3例 (75.0%) に PHA 反応の低下がみられた。また、肝硬変の中で、非代償性肝硬変5例の S.I. は 18.3 ± 10.9 、代償性肝硬変のそれは 67.9 ± 36.6 で、両者はともに正常人に比べて有意に低下しており ($p < 0.001$)、かつ非代償性5例と代償性13例の PHA 反応の間にも有意の差 ($p < 0.02$) がみられた。また非代償性の5例全例は、PHA に対する反応が低下していた。このように、慢性肝炎では非活動型より活動

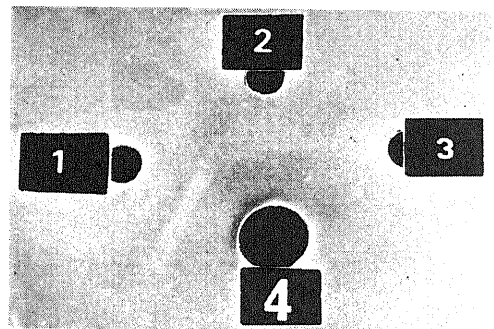


Fig. 5. Double diffusion precipitation reaction in agar gel of absorbed precipitation rabbit antisera ④ against ultrasonic homogenates of liver ①, insoluble liver cell membranes ② and liver specific lipoprotein (LPG100I) ③ prepared according to the method of Meyer zum Büschenfelde, K. H. et al. No line is found between LPG100I ③ and the antisera ④.

Table 2. Response to PHA in various liver diseases.

diseases	cases	PHA response (M±S. D.) S.I.	significant difference*
acute hepatitis	6	64.8±19.9	P<0.01
chronic hepatitis	persistent	86.4±37.6	66.3±33.8 P<0.05 P<0.001
	active	53.5±23.2	
cirrhosis	compensated	67.9±36.6	54.1±38.7 P<0.001 P<0.001
	decompensated	18.3±10.9	
HBsAg carrier	4	36.2±18.3	P<0.001
normal controls	15	122.4±37.1	

*significant difference from the value of normal controls

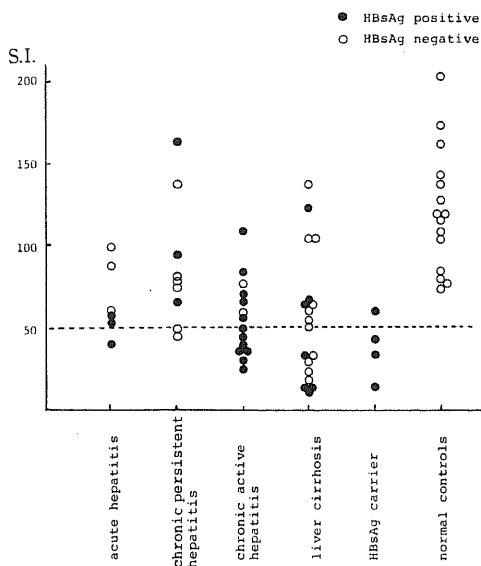


Fig. 6. Response to PHA in various liver diseases. The dotted line indicates the lower limit of normal value (Mean-2S.D.).

型、肝硬変では代償性より非代償性と、肝疾患の重症度に比例して PHA 反応が低下するようなパターンを示した。

流血中の HBsAg と PHA 反応との関係を見るために、HBsAg Carrier および肝疾患患者全例の計51例について血中 HBsAg 陽性群と陰性群にわけ、PHA 反応を比較したのが Table 3 である。すなわち、若干血中 HBsAg 陰性群に比べて陽性群に PHA 反応の低下傾向がみられたが、推計学的に有意の差があるとはいえなかった ($p<0.1$)。

Ⅲ. 末梢血の T cell population (T細胞分布)

Table 4 に示すように、対照12例のT細胞分布の平均は $59.3\pm 9.8\%$ (M±S.D.) で、急性肝炎 $51.9\pm 5.6\%$ 、慢性肝炎非活動型 $50.6\pm 11.4\%$ 、慢性肝炎活動型 $45.9\pm 9.7\%$ 、肝硬変 $42.8\pm 14.3\%$ 、HBsAg Carrier $39.4\pm 9.1\%$ であった。正常人対照のT細胞分布に比べて、慢性肝炎非活動型 ($p<0.05$)、慢性肝炎活動型 ($p<0.01$)、肝硬変 ($p<0.01$)、HBsAg Carrier ($p<0.001$) は、推計学的に有意なT細胞分布の低下をみた。しかし、急性肝炎では、正常対照と比べてT細胞分布の低下傾向はみられたが、推計学的には有意とはいえなかった ($p<0.1$)。肝硬変を非代償性と代償性にわけてみると、非代償性のT細胞分布は $35.5\pm 14.2\%$ 、代償性は $47.6\pm 12.1\%$ となり、両者とも正常人対照に比べて有意なT細胞分布の低下があり (それぞれ、 $p<0.02$, $p<0.001$)、かつ非代償性は代償性に比べて、有意にT細胞分布の低下をみた ($p<0.02$)。

正常人対照の Mean-2S.D. (37.9%) 以下の値をT細胞分布の低下とみなすと (Fig. 7)、急性肝炎では低下例をみとめないが、慢性肝炎非活動型18例中5例 (27.8%)、慢性肝炎活動型11例中3例 (27.3%)、肝硬変25例中10例 (40.0%) そのうち代償性肝硬変15例中3例 (20.0%)、非代償性肝硬変10例中7例 (70.0%) にT細胞分布の低下がみとめられ、HBsAg Carrier 7例中4例 (57.1%) にもT細胞分布の低下をみた。

また流血中の HBsAg の有無とT細胞分布の関係を見たのが Table 5 であり、PHA 反応と同様、HBsAg 陰性群に比べて HBsAg 陽性群にT細胞分布の低下傾向をみとめたのが、推計学的には有意といえな

った ($p < 0.1$).

IV. T cell population と PHA 反応との関係

両者を同時に測定した29例について、両者の相関を Fig. 8 に示した。個々の症例では、T細胞分布が正常で PHA 反応の低下を示した症例が3例、逆に PHA 反応は正常でT細胞分布が低下を示した症例1例の計4例 (13.8%) に、T細胞分布と PHA 反応の解離をみたが、全体としては推計学的に有意の正の相関を示した ($n=29$, $r=0.7875$, $p < 0.001$).

V. 不溶性肝細胞表面膜に対する白血球遊走阻止試験 (L-MIT)

Fig. 9 に示すように、急性肝炎13例中2例 (15.4%), 慢性肝炎非活動型19例中7例 (36.8%), 慢性肝炎活動型19例中9例 (47.4%), 肝硬変29例中13例 (44.8%) と正常人対照18例中1例が、不溶性肝細胞表面膜に対して L-MIF 陽性であった。HBsAg Carrier では、検索した2例とも陰性であった。慢性肝炎非活動型、慢性肝炎活動型、肝硬変においては、正常人対照と比べて、不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF 陽性頻度は推計学的に有意であった ($p < 0.05$). すな

Table 3. Response to PHA in HBsAg positive and HBsAg negative group.

HBsAg	cases	PHA response (M±S.D.) S.I.
HBsAg positive group	29	53.0 ± 34.4
HBsAg negative group	22	67.6 ± 32.9

$P < 0.1$

わち、慢性肝疾患では、不溶性肝細胞表面膜に対して細胞性抗体を有す頻度が高いことがわかった。

しかし、著者の調製した不溶性肝細胞表面膜の中には、肝特異抗原以外に他臓器との共通抗原が含まれているので、不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF が、他臓器との共通抗原に対する免疫反応の結果ではなく、肝特異抗原に対する免疫反応の結果生じたものであることを確かめる目的で、腎細胞表面膜を用いて L-MIT を行った。その結果を Fig. 10 に示した。急性肝炎6例、慢性肝炎非活動型7例、慢性肝炎活動

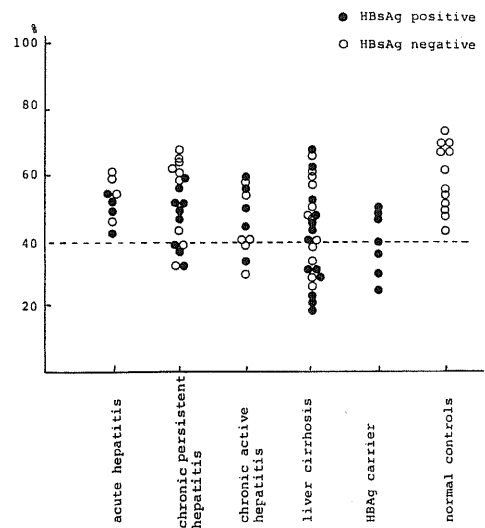


Fig. 7. T cell population in various liver diseases. The dotted line indicates the lower limit of normal value (Mean-2S.D.).

Table 4. T cell population in various liver diseases.

diseases	cases	T-cell (M±S.D.) %	significant difference*	
acute hepatitis	8	51.9 ± 5.6	$P < 0.1$	
chronic hepatitis	persistent	18	50.6 ± 11.4	$P < 0.05$
	active	11	45.9 ± 9.7	
cirrhosis	compensated	15	47.6 ± 12.1	$P < 0.02$
	decompensated	10	35.5 ± 14.2	
HBsAg carrier	7	39.4 ± 9.1	$P < 0.001$	
normal controls	12	59.3 ± 9.8		

*significant difference from the value of normal controls

型7例, 肝硬変16例, 正常人7例の計43例について L-MIT を行ったが全例陰性であった. したがって, 不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIT 陽性反応は, 不溶性肝細胞表面膜の中の肝特異抗原とリンパ球が反応した結果生じたものと判断され, 慢性肝炎患では, 肝特異抗原に対して自己免疫状態にあるものと推定された.

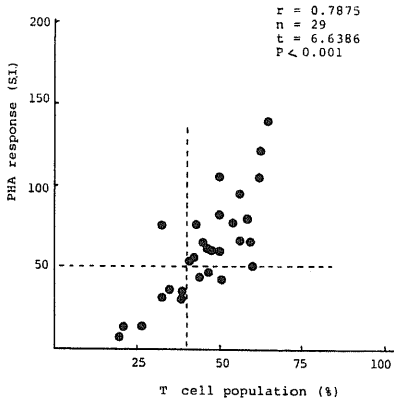


Fig. 8. Correlation of PHA response and T cell population. The dotted lines indicate the lower limit of normal value (Mean-2S.D.).

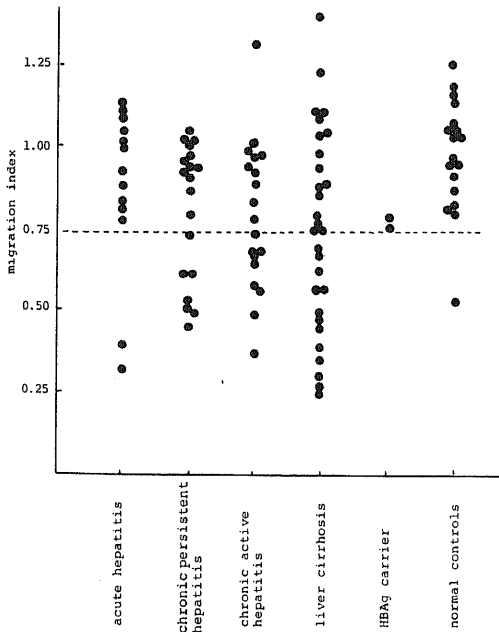


Fig. 9. Leucocyte migration test with insoluble liver cell membranes in various liver diseases and control.

VI. HBsAg に対する細胞性抗体 (cellular HBs Ab), HBsAg および HBsAb

精製 HBsAg に対する L-MIT の結果を Fig. 11 に示した. 発症後6週間以内の急性肝炎11例および HBsAg Carrier の3例は, 全例が HBsAg に対する細胞性抗体 (L-MIF) は陰性であった. しかるに, 慢性肝炎非活動型19例中8例 (42.1%), 慢性肝炎活動型19例中6例 (31.6%), 肝硬変29例中10例 (34.5%) および正常人対照14例中1例 (医師) (7.1%) に HBs Ag に対する細胞性抗体が検出された. また, cellular HBsAb, 流血中 HBsAg および HBsAb の陽性率を Table 6 にまとめて示した. 正常人対照の1例 (看護婦) に HBsAb が検出された.

HBsAg, HBsAb, cellular HBsAb のどれか1つ以上陽性を示す症例を HBsAg 感染者, そうでない症

Table 5. T cell population in HBsAg positive and HBsAg negative group.

HBsAg	cases	T cell population (M±S.D.) %
HBsAg positive group	38	43.4 ± 11.8
HBsAg negative group	31	49.2 ± 12.3

P < 0.1

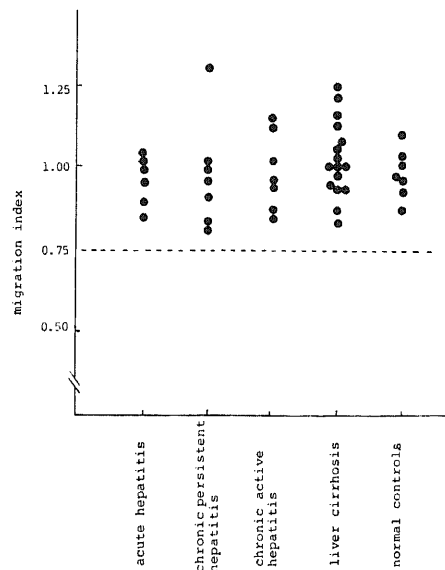


Fig. 10. Leucocyte migration test with renal cell membranes in various liver diseases and control.

Table 6. Number of HBsAg-infected patients in various liver diseases.

diseases	HBsAg	HBsAb	cellular HBsAb	No. of HBsAg-infected patients ※		
acute hepatitis	5 / 11 (45.5%)	3 / 11 (27.3%)	0 / 11 (0%)	8 / 11** (72.7%)		
chronic hepatitis	persistent	1 / 19 (5.3%)	4 / 19 (21.1%)	8 / 19 (42.1%)	10 / 19* (52.6%)	46 / 67*** (68.7%)
	active	7 / 19 (36.8%)	5 / 19 (26.3%)	6 / 19 (21.6%)	14 / 19*** (73.7%)	
cirrhosis	13 / 29 (44.8%)	7 / 29 (24.1%)	10 / 29 (34.5%)	22 / 29*** (75.9%)		
HBsAg carrier	3 / 3 (100%)	0 / 3 (0%)	0 / 3 (0%)	3 / 3 (100%)		
normal controls	0 / 14 (0%)	1 / 14 (7.1%)	1 / 14 (7.1%)	2 / 14 (14.3%)		

※ significant difference from the value of normal controls. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

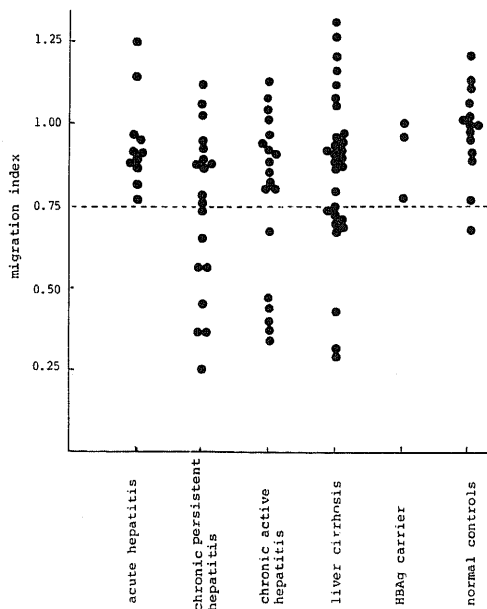


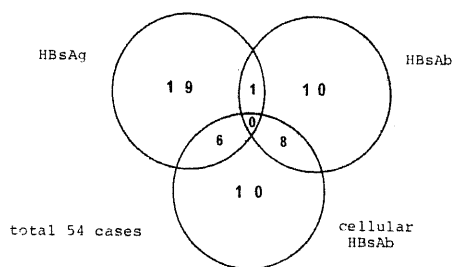
Fig. 11. Leucocyte migration test with purified HBsAg in various liver diseases and control.

例を HBsAg 非感染者とすると、急性肝炎11例中8例(72.7%)、慢性肝炎非活動型19例中10例(52.6%)、慢性肝炎活動型19例中14例(73.7%)、肝硬変29例中22例(75.9%)、HBsAg Carrier 3例中3例(100%)、正常人14例中2例(14.3%)が HBsAg 感染者であった。そして、肝疾患全体の約70%が HBsAg に関連していることがわかった。

HBsAg Carrier を除く HBsAg 関連肝疾患54例について、HBsAg、HBsAb および cellular HBsAb の出現パターンをみたのが Fig. 12 である。HBsAg 単独で出現した症例が19例、HBsAb および cellular HBsAb 単独出現例がそれぞれ10例、HBsAb+cellular HBsAb 出現例が8例あった。一方抗原と抗体の共存例は全体としては少なく、HBsAg+cellular HBsAb 出現例は6例、HBsAg+HBsAb 出現例は1例で、HBsAg+HBsAb+cellular HBsAb 出現例はみられなかった。これら出現率を Dunnett の片側検定法により検討してみると、HBsAg+HBsAb 出現例と HBsAg+HBsAb+cellular HBsAb 出現例はともに、他の群に比べて出現率が少ないといえた ($p < 0.05$)。しかし、HBsAg+cellular HBsAb の出現例は、HBsAg 単独出現群と比べてのみ、その出現率が低いといえた ($p < 0.05$)。したがって、流血中の HBsAg 除去という点に関しては、HBsAb がより重要な役割を果していると考えられた。

VII. HBsAg 感染と不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIT

慢性肝炎における、HBsAg 感染者と非感染者との間の、不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF 陽性率を比較したのが Table 7 である。慢性肝炎38例(非活動型19例、活動型19例)のうち、HBsAg 感染者は24例。そのうちの13例(54.2%)が同時に不溶性肝細胞表面膜に対して L-MIF 陽性であった。一方、HBsAg 非感染者14例については、不溶性肝細胞表面膜に対して L-MIF 陽性を呈した症例は3例(21.4%)にすぎず、HBsAg 感染者は非感染者に比べて、不溶性



	HBsAg	HBsAb	cellular HBsAb	HBsAg. HBsAb	HBsAg. cellular HBsAb	HBsAb. cellular HBsAb	HBsAg. HBsAb. cellular HBsAb
%	25.2 %	18.5 %	18.5 %	1.9 %	11.1 %	14.8 %	0 %
angles corresponding to %	36.29	25.48	25.48	7.92	19.46	22.63	0
n	54	54	54	54	54	54	54

Fig. 12. Correlation of HBsAg, HBsAb and cellular HBsAb in HBsAg-infected patients.

Table 7. % of positive MIF activity to insoluble liver cell membranes in each of HBsAg-infected and HBsAg-non-infected patients with chronic hepatitis.

	HBsAg-infected group	HBsAg-non-infected group
positive MIF activity to insoluble liver cell membranes	54.2% (13 / 24)	21.4% (3 / 14)

$P < 0.05$

Table 8. % of patients with positive MIF activity to insoluble liver cell membranes in each of cellular HBsAb-positive and cellular HBsAb-negative patients with chronic hepatitis.

	cellular HBsAb positive group	cellular HBsAb negative group
positive MIF activity to insoluble liver cell membranes	64.3% (9 / 14)	29.2% (7 / 24)

$P < 0.05$

肝細胞表面膜に対して L-MIF 陽性を呈す例が有意に多かった ($p < 0.05$). また、肝硬変29例についても、同様に HBsAg 感染者と非感染者にわけて、不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF 陽性率を比較したが、両者に差はみられなかった。

また、HBsAg に対する細胞性抗体陽性者群と陰性者群で、不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF 陽性率を比較したのが Table 8 である。慢性肝炎38例中 HBsAg に対する細胞性抗体陽性例は14例で、そのうち9例 (64.3%) が同時に不溶性肝細胞表面膜に対して L-MIF 陽性であった。一方、HBsAg に対する細胞性抗体陰性の慢性肝炎24例のうち、同時に不溶性肝細胞表面膜に対して L-MIF 陽性を呈したのは7例 (29.2%) にすぎず、両者の陽性率には推計学的に有意の差をみた ($p < 0.05$)。一方、肝硬変については、HBsAg に対する細胞性抗体陽性者群と陰性者群とで、不溶性肝細胞表面膜に対する反応に差をみなかった。また逆に、慢性肝炎を不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF 陽性群と陰性群にわけて、HBsAg に対する L-MIF 陽性率を比較すると (Table 9), 不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF 陽性群の方が、HBsAg

に対する L-MIF 陽性率が高かった ($p < 0.05$)。すなわち、HBsAg に対する細胞性抗体と不溶性肝細胞表面膜に対する細胞性抗体は、平行して出現する例が多かった。

つぎに、不溶性肝細胞表面膜に対して L-MIF 陽性を呈した症例のみについて、その中で何%の症例が HBsAg 感染者であるかをみたのが Table 10 である。慢性肝炎では、不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF 陽性の16例中13例 (81.3%)、同じく肝硬変では13例中10例 (76.9%) が HBsAg 感染者であり、不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF 陽性の慢性肝疾患の79.3%は HBsAg 関連肝疾患であった。すなわち、不溶性肝細胞表面膜に対する細胞性抗体の出現は、HBsAg 感染と密接な関連を有していることが示唆された。

さらにこの問題を検討するために、慢性肝疾患における HBsAg に対する遊走指数 (M.I.) と不溶性肝細胞表面膜に対する M.I. の値をそのままプロットしてみたのが Fig. 13 と Fig. 14 である。Fig. 13 は HBsAg 感染慢性肝疾患について、Fig. 14 は HBsAg 非感染慢性肝疾患についてのものである。まず、

Table 9. % of patients with positive MIF activity to purified HBsAg in each of cellular antibody to ILSM* positive and cellular antibody to ILSM negative group with chronic hepatitis.

	cellular antibody to ILSM positive group	cellular antibody to ILSM negative group
positive MIF activity to HBsAg	56.3% (9 / 16)	22.7% (5 / 22)

* insoluble liver cell surface membranes

$P < 0.05$

Table 10. Number of HBsAg-infected patients with positive MIF activity to insoluble liver cell membranes in chronic liver diseases.

diseases		No. of patients with HBsAg	No. of patients with HBsAb	No. of patients with cellular HBsAb	No. of HBsAg-infected patients*	
chronic hepatitis	persistent	0/7 (0%)	2/7 (28.6%)	5/7 (71.4%)	6/7** (85.7%)	13/16*** (81.3%)
	active	4/9 (44.4%)	2/9 (22.2%)	4/9 (44.4%)	7/9** (77.8%)	
cirrhosis		4/13 (30.8%)	4/13 (30.8%)	5/13 (38.5%)	10/13** (76.9%)	

* significant difference from the value of normal controls. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

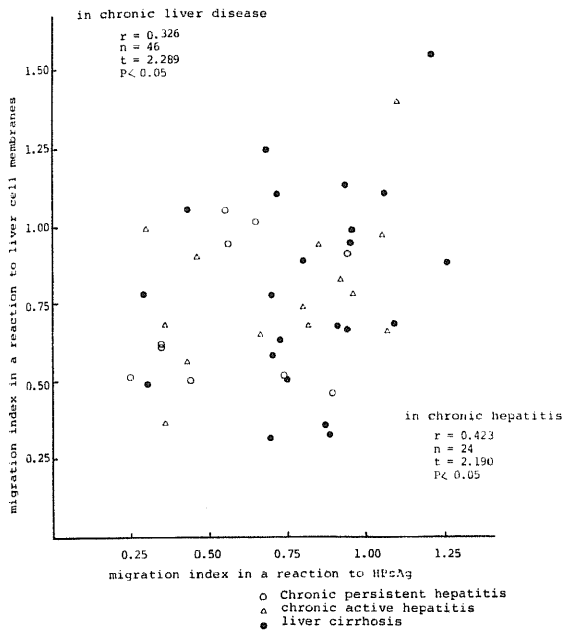


Fig. 13. Correlation of migration indices between to purified HBsAg and to insoluble liver cell membranes in HBAg-infected patients with chronic liver diseases.

HBAg 感染者において、HBsAg と不溶性肝細胞表面膜に対する M.I. との相関を調べてみると、慢性肝疾患全体（計46例）についても、また慢性肝炎のみ（計24例）についても、Fig. 13 に示すように両者の M.I. の間には推計学的に有意な正の相関関係がみられた ($p < 0.05$)。一方 Fig. 14 に示すように、HB Ag 非感染者においては、HBsAg に対する M.I. と不溶性肝細胞表面膜に対する M.I. との間には相関はみとめられなかった。したがって、これらの所見より、慢性肝疾患における不溶性肝細胞表面膜に対する細胞性抗体の出現は、HBAg 感染と深い関連があり、かつ HBsAg に対する細胞性抗体の出現とも深い関連を有することが推測された。

Ⅷ. 流血自己抗体と不溶性肝細胞表面膜に対する細胞性抗体

慢性肝炎非活動型11例、慢性肝炎活動型14例、肝硬変17例の計42例について流血自己抗体を測定した結果が Table 11 である。これら流血自己抗体のどれか1つ以上陽性例を流血自己抗体陽性者群とし、流血自己抗体をもたない例を流血自己抗体陰性者群として分類し、不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF 陽性率を

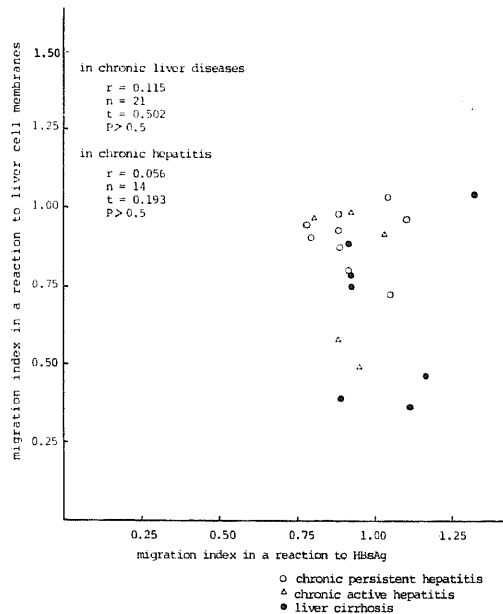


Fig. 14. Correlation of migration indices between to purified HBsAg and to insoluble liver cell membranes in HBAg-non-infected patients with chronic liver diseases.

比較したのが Table 12 である。すなわち、流血自己抗体陰性者群に不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF 陽性率が高い傾向をみたが、推計学的に有意ではなかった ($p < 0.1$)。したがって、不溶性肝細胞表面膜に対する細胞性抗体と流血自己抗体の出現は平行しないと考えられた。

考 案

慢性肝疾患患者では、高 γ -グロブリン血症、自己抗体の出現を伴い、蛍光抗体法で肝組織内にグロブリンの沈着が証明され、組織像では障害部位に lymphoid cell が浸潤し、副腎皮質ホルモンが有効な症例が存在する。これらの項目は、Mackay と Burnet²⁵⁾ が自己免疫疾患の条件として挙げている項目であり、慢性肝疾患の中には、自己免疫状態と考えられる症例が存在するのは事実であろう。しかし、流血および細胞性自己抗体が高頻度に検出されても、それに対応する抗原の抽出純化が困難であり、それら抗原によって実験的に人間と同じ病変を動物に作り出すことができず、Witebsky ら²⁶⁾ の自己免疫の定義を満足するには至らなかった。しかるに、Meyer zum Büsche-

Table 11. Humoral autoantibodies in chronic liver diseases.

	anti-nuclear antibody	anti-smooth muscle antibody	anti-mitochondrial antibody	anti-glomerular antibody	humoral auto-antibody positive patients
chronic persistent hepatitis	0% (0/11)	18.2% (2/11)	18.2% (2/11)	0% (0/11)	27.3% (3/11)
chronic active hepatitis	0% (0/14)	21.4% (3/14)	14.3% (2/14)	7.1% (1/14)	35.7% (5/14)
cirrhosis	0% (0/17)	29.4% (5/17)	11.8% (2/17)	0% (0/17)	29.4% (5/17)
total	0% (0/42)	23.8% (10/42)	14.3% (6/42)	2.4% (1/42)	31.0% (13/42)

Table 12. % of patients with positive MIF activity to insoluble liver cell membranes in each of circulating antibody-positive and negative group.

	circulating antibodies positive group	circulating antibodies negative group
positive MIF activity to insoluble liver cell membranes	23.1% (3/13)	51.7% (15/29)

P < 0.1

nfelde ら³⁾は、人肝より可溶性肝特異抗原を抽出し、家兎に免疫して実験的に人間と同じ慢性肝炎活動型を作ることに成功したと報告し、肝炎の慢性化に自己免疫機序の関与することを強く示唆し、これが広く認められるに至った。

HBAg がB型肝炎ウイルスであることが確証された現在、肝炎の発生および慢性化には一般のウイルス感染と同様に、当然宿主側の条件としてウイルスに対する感受性(免疫環境)が問題となり、さらに HBAg 自体の病原性、毒性、感染量、感染経路や感染年齢などが問題となる。しかし、何ら肝障害を呈さないで、血中にも肝組織内にも高力価に HBAg が証明される HBAg Carrier の存在が明らかとなり、HBAg による直接の肝障害はないであろうと考えられている。そこで肝炎の発生・慢性化には、まず宿主側の条件、すなわち免疫学的な条件がより重要であると考えられてきた。

一方、慢性肝疾患の多数例で血中に HBAg が検出されることや、HBAg 陽性急性肝炎112例の観察で、13週以上 HBAg が持続した11例のうち肝生検を施行

した10例中8例が chronic aggressive hepatitis、2例が chronic persistent hepatitis に移行したとの Nielsen ら²⁾の報告からみて、HBAg の持続と肝炎の慢性化との間にはかなりの関連性があると考えられ、しかも HBAg 自体には cytopathic な効果がありそうもないことから、宿主の免疫反応が同時に重要視されている。さらに、本実験で示したように、血中 HBsAg 陰性の慢性肝疾患の多くにも、流血中の HBsAb または HBsAg に対する細胞性抗体のいずれかが検出されており、immune complex の形で HBAg が体内に存在している症例もあろうが、必ずしも体内に HBAg が持続することが肝炎慢性化の必要条件ではなく、HBAg 感染に端を発した HBAg をめぐる免疫反応の持続が肝炎慢性化に重要であると考えられる。

一般に、感染因子に対する宿主の免疫反応には、体液性と細胞性の二つが考えられる。ところが、細胞内寄生性細菌や多くのウイルス感染に対する生体の防御機構には細胞性免疫が重要な役割を果しているといわれる。事実、抗体産生系異常の Bruton 型 agam-

maglobulinemia では、ウイルス感染に対して正常人なみの経過をとることが知られ、逆に胸腺發育不全のみられる Di George 症候群では、流血抗体が産生され得るのに悪い経過をとることが知られている。また成熟動物で胸腺摘出や抗胸腺細胞血清を投与することにより、ウイルスに対する抵抗性が低下することもよく知られている。HBAg はウイルスであり、しかも直接の肝細胞障害性はないと考えられている。したがって、肝細胞内の HBAg を除去するためには、HBAg 感染肝細胞を非自己と認識して肝細胞を破壊し、ウイルスの増殖を阻止する免疫機構が必要であり、これには一般的に移植免疫と同様な機序が想定される。一方血中に放出された HBAg は、中和抗体により不活化されるものと考えられよう。

もし、HBAg 感染肝細胞崩壊が免疫学的機構によって起るとすれば、流血抗体産生のない agammaglobulinemia の患者²⁹⁾で、急性肝炎や慢性肝炎が発生するのは、体液性免疫よりもむしろT細胞を中心とした細胞性免疫によってであろうと考えるのが適当だと思われる。

そこで著者はまず、phytohemagglutinin (PHA) に対するリンパ球の反応 (PHA 反応) と T cell population (T細胞分布) を測定し、T細胞機能の一般的状態をしらべてみたところ、急性肝炎では PHA 反応の低下と T細胞分布の低下傾向を、HBAg Carrier では PHA 反応およびT細胞分布の低下を認めた。また慢性肝疾患では、ある程度肝疾患の重症度と平行する傾向で、PHA 反応とT細胞分布が低下し、諸家^{29)~32)}の報告にだいたい一致した結果がえられた。また、血中 HBsAg 陽性群に PHA 反応およびT細胞分布の低下傾向がうかがわれたが、血中 HBsAg 陰性群にも低下傾向があり、両者の間に明確な差はみられなかった。

このような非特異的T細胞機能や数的分布の低下に対して、遺伝的な免疫機構の欠陥を主張する見解があるが、一般的には病気の結果と考えたほうがよいように思われる。その理由として、1) 慢性肝炎や肝硬変の半数は正常人と同じT細胞機能を有し、同一疾患内でのばらつきが大きいこと、2) 著者ら³³⁾が既に報告したように、治療による臨床症状の改善とともに、T細胞機能が回復すること、3) 後に回復する急性肝炎にもT細胞機能の一時的低下がみられること、などをあげることができる。このようなT細胞機能の低下に関して、血清中に抑制因子が存在するとの報告^{34)~36)}があり、肝疾患についても同様な抑制因子が報告されている^{31)37)~39)}。

このような抑制因子の存在により、T細胞機能の低下が生じ、免疫監視機構の乱れの結果、HBAg の持続や自己免疫性機序が発現され、Circulus Vitiosus となって肝細胞崩壊が遷延する可能性は容易に想像されよう。

このようなT細胞機能の低下とともに、慢性肝疾患では、高頻度に流血自己抗体や細胞性自己抗体が検出される。Tobias ら⁴⁾は、PBC の50%、慢性肝炎活動型の50%に、自己肝粥添加によるリンパ球のプラスト化を報告しており、同様な成績が、PBC、ルポイド肝炎、慢性肝炎および肝硬変でもみられることを教室の梶原³⁾が報告した。Smith ら⁵⁾も、L-MIT を用いて、PBC の64%、慢性肝炎活動型の53%、肝硬変の29%が肝粥に対して L-MIF 陽性であると報告している。一方、流血中の抗肝抗体に関しては、太田ら⁴⁰⁾の報告があり、慢性肝疾患の約40%に補体結合性抗肝抗体を検出し、それら抗体が肝不溶性分画と肝可溶性分画とに別々に反応する点から、両抗原性に差のあることを推測していた。また小西⁴¹⁾は、不溶性肝特異抗原を抽出し、肝硬変の72%、慢性肝炎の38%にその抗原に対する流血抗体を検出し、不溶性肝特異抗原の存在を主張している⁴²⁾。同様に Emmelot ら⁴³⁾も不溶性肝特異抗原の存在を報告している。

一方、Meyer の可溶性肝特異抗原に対する流血抗体は、慢性肝炎活動型の19%に検出されたにすぎなかった³⁾が、その後同抗原を用いて Miller ら⁷⁾は、PBC の50%、慢性肝炎活動型の69%に L-MIF 陽性であることを報告し、Meyer zum Büschenfelde ら⁸⁾も慢性肝炎活動型の85%、肝硬変の42%に L-MIF 陽性であることを報告している。また最近では、*in vitro* の cytotoxicity test を用いて、慢性肝炎活動型やその他の肝疾患患者リンパ球が、肝細胞に対して直接的な細胞障害作用を有しているとの報告^{43)~45)}がなされている。このようなことから、慢性肝疾患では、肝成分に対して液性・細胞性の自己免疫亢進状態にあることが推測される。

著者の用いた不溶性肝細胞表面膜は、本質的には Emmelot ら²⁰⁾の不溶性肝抗原と同じと考えられ、膜免疫蛍光法のパターンでは、彼らの報告したものに類似して肝細胞表面膜のみ特異蛍光があり、オクタロニンによる検索では、Meyer 抗原³⁾とは異なった肝特異抗原を含むことが確認された。この不溶性肝細胞表面膜を用いて L-MIT を行くと、急性肝炎の15%、慢性肝炎の42%、肝硬変の45%に L-MIF が検出され、肝障害のない HBAg Carrier では検出されなかった。しかも、腎細胞膜添加では、1例も L-MIF

が検出されず、今回用いた不溶性肝細胞表面膜は臓器共通抗原を含んでいるにもかかわらず、おそらく不溶性肝細胞表面膜に含まれている肝特異抗原とリンパ球が反応し、L-MIF を産生したのであろうと考えている。したがって、著者の成績でも、諸家の報告と同じように、慢性肝炎患では、肝成分に対して免疫亢進状態にあることが観察され、また非特異的T細胞機能は、逆に多くの例で低下していることが見出された。このような immunological imbalance を Mackay ら⁴⁶⁾も慢性肝炎活動型でみとめ、自己免疫と免疫不全が同時に存在することに注目している。このような現象は、自己免疫の代表である SLE でもみとめられ⁴⁷⁾、人自己免疫疾患のモデルとして研究対象になっている NZB あるいは NZB×NZWF₁ マウスにおいても、自己免疫の発現とT細胞免疫不全現象がともに出現することが知られ⁴⁸⁾、自己免疫発現阻止におけるT細胞機能の重要性がうかがわれる。

また、ここで一言いっておかなくてはならないことは、急性肝炎でも、少数例で不溶性肝細胞表面膜に対するL-MIF が検出されることである。現在健康な急性肝炎既往者について、不溶性肝細胞表面膜に対するL-MIT を施行してもL-MIF が検出されない所から、不溶性肝細胞表面膜に対する細胞性免疫が持続することこそ、肝炎慢性化と関連するのではないかと考えられる。Knolle ら⁴⁹⁾も、Meyer 抗原を用いて、急性肝炎の28%がL-MIF 陽性であると報告している。

最近、自己免疫の成立機序に関してウィルス感染がかなり重要視されている^{50)~52)}。HBAg はウィルスであり、その形態から外側を envelope という外套でおおわれた envelope 型ウィルスであろうと一般的に考えられている。しかし、HBAg に関しては、未だに発芽 (budding) の型式で Dane 粒子が形成される電顕像の報告はみられないので問題は残るが、一般的に envelope 型ウィルスの envelope は宿主細胞膜が修飾されてできてきたものといわれている。HBAg の envelope である HBsAg についても、宿主成分が構成成分になっている可能性があり⁵³⁾⁵⁴⁾、しかもHBsAg のその複雑な抗原性は、ウィルス genome により単一的に支配されてきた envelope との考えに不都合な所見である。

以上のようなことから、自己免疫性肝障害の発生とHBAg との関連がより明瞭になってくる。そこで、HBsAg に対する宿主の免疫反応が問題となってくる。HBsAg に対する細胞性抗体は、それぞれの肝疾患で種々の程度に検出される。急性肝炎では、回復期あるいは急性肝炎既往者に証明されるとする報告が

多く^{27)55)~58)}。肝炎回復後数年間は持続し、なかには6年後でもHBsAg に対するL-MIF 陽性例が報告されている⁵⁸⁾。しかし、回復期に一過性に出現するのみ⁵⁹⁾とか、急性期にのみ出現する^{60)~62)} という報告もあり、急性肝炎では、HBsAg に対する細胞性抗体の出現に対して意見の一致がみられない。著者は、発症後6週以内の急性肝炎を対象として、HBsAg に対するL-MIT を検索したが、1例もL-MIF を検出することはできなかった。したがって、急性肝炎の急性期には、HBsAg に対するL-MIF が、末梢血リンパ球では検出しにくいものと考えられ、Erard⁵⁷⁾ や Tong ら⁵⁸⁾、稲垣ら³²⁾の報告に一致した。しかもこの結果は、Dudley ら¹⁰⁾の仮説に合致しない所見のように思われた。一方、慢性肝炎患では、諸家²⁷⁾⁵³⁾と同様、慢性肝炎の37%、肝硬変の35%にHBsAg に対するL-MIF が検出された。また血中のHBsAg 陽性慢性肝炎患者21例中6例(29%)にHBsAg に対する細胞性抗体が検出されたことは、HBsAg とHBsAb が血中で同時に検出されにくいのに比べて注目に値する。このことは、血中のHBsAg 除去という点では、HBsAg に対する細胞性抗体よりも、HBsAb がより重要であると解釈される。また、HBAg Carrier では、HBsAg に対する細胞性抗体もHBsAg も検出されず、HBsAg に対して寛容状態だと解釈できるが、HBcAb は全例に検出されるとの報告があり⁶³⁾、HBAg Carrier についてはさらに検討が必要であろう。

これら流血中のHBsAb およびHBsAg に対する細胞性抗体の検出から、血中HBsAg 陰性の症例の中にもHBAg 関連肝疾患が多く存在することが明らかとなり、著者の対象とした慢性肝炎患の約70%はHBAg 関連肝疾患であった。さらに、HBcAg の検出やHBcAg に対する抗体系の検出により、その数は増える可能性がある。

それでは、Popper ら¹¹⁾や Eddleston ら¹²⁾のいうように、肝成分に対する細胞性自己抗体の出現が、HBAg 感染と関連があるか否かが問題となる。先に著者ら⁶³⁾は、肝硬変を含めた慢性肝疾患の検討で、HBsAg に対する細胞性抗体産生と不溶性肝細胞表面膜に対する細胞性抗体産生との間に多少とも関連があることを報告した。著者は今回さらに検討を進め、1)慢性肝炎では、HBAg 感染者群の方が、非感染者群に比べて、不溶性肝細胞表面膜に対するL-MIF 陽性率が高いこと、2)不溶性肝細胞表面膜に対するL-MIF 陽性慢性肝炎の83%、同様に肝硬変を含むL-MIF 陽性慢性肝疾患の79%が、HBAg 関連肝疾患であるこ

と、3)慢性肝炎では、HBsAg に対する L-MIF 陽性群の方が、L-MIF 陰性群に比べて、不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF 陽性率が高いこと、4)不溶性肝細胞表面膜に対する L-MIF 陽性慢性肝炎群の方が、L-MIF 陰性群に比べ、HBsAg に対する L-MIF 陽性率が高いこと、5) HBAg 感染慢性肝炎および

肝硬変を含めた HBAg感染慢性肝疾患では、HBsAg に対する M.I. と不溶性肝細胞表面膜に対する M.I. との間に、正の相関関係がみられること、などを新たにみつけた。著者ら⁶⁶⁾⁶⁷⁾は先に、慢性肝疾患でミトコンドリアに対する細胞性抗体が高頻度に検出されることを報告したが、HBAg 感染者、非感染者につ

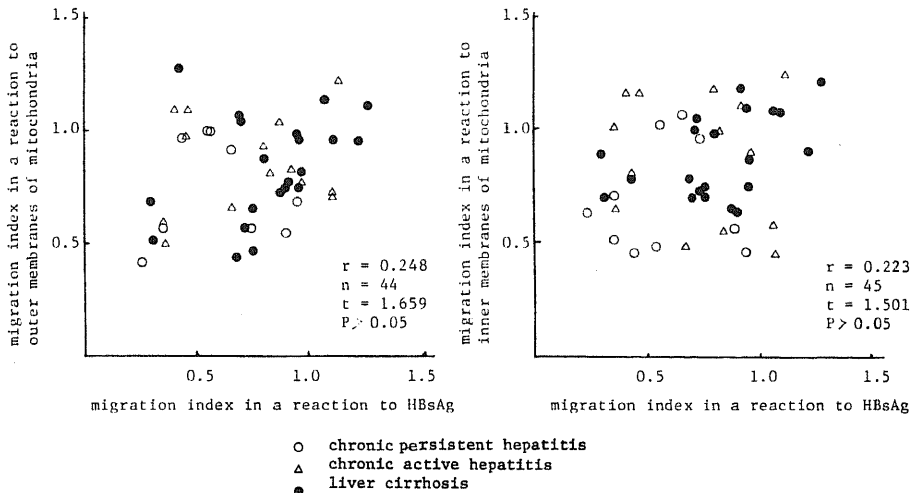


Fig. 15. Correlation of migration indices between to purified HBsAg and to outer membranes of mitochondria, and to purified HBsAg and to inner membranes of mitochondria in HBAg-infected patients with chronic liver diseases.

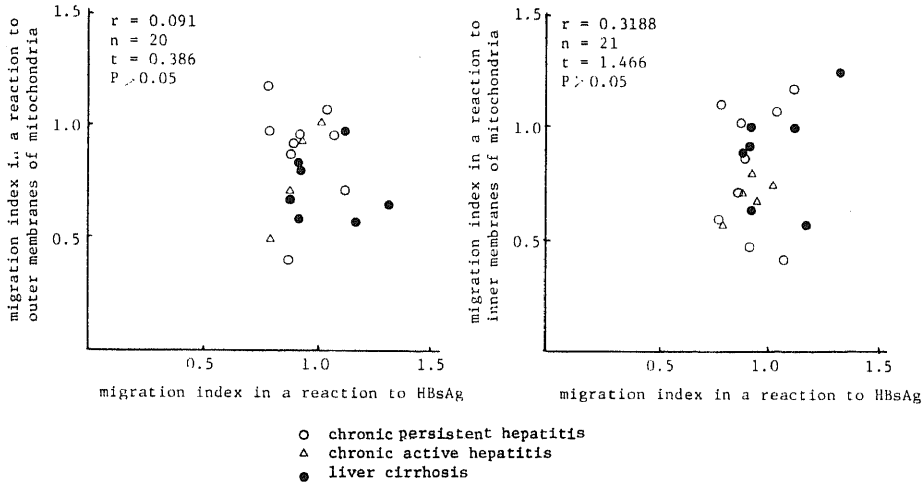


Fig. 16. Correlation of migration indices between to purified HBsAg and to outer membranes of mitochondria, and to purified HBsAg and to inner membranes of mitochondria in HBAg-non-infected patients with chronic liver diseases.

いて、HBsAg に対する M.I. とミトコンドリア内膜あるいは外膜に対する M.I. との間に、とくに相関をみとめず (Fig. 15, Fig. 16), HBsAg とミトコンドリア膜分画に対する両 L-MIF が平行して出現する傾向はみられなかった。したがって、これらミトコンドリア膜分画に対する細胞性抗体の出現は、肝細胞障害の原因ではなくて、結果ではないかと考えており、肝細胞崩壊の発生には、肝細胞表面膜をめぐる免疫反応が最も重要であろうと考えられる。

このような著者の成績は、アルコールやその他原因の明らかな HBAg 以外の慢性肝疾患を除けば、大多数の慢性肝疾患は HBAg 感染と関連しており—もちろん HBAg 以外のウィルス感染 (A型あるいはC型⁶⁸) 肝炎ウィルスなど) や薬剤性肝炎でも、肝炎の慢性化はおこるであろうし、また肝細胞膜の変化をとまなつて自己免疫機序により病像が進行する症例の存在は考えられるが—肝炎の慢性化を論ずる場合には、HBAg 感染後の HBAg と肝細胞表面膜とをめぐる宿主の免疫反応が最も重要な課題であることを示している。また、HBsAg に対する細胞性抗体と不溶性肝細胞表面膜に対する細胞性抗体がよく平行して出現することは、HBsAg と肝細胞表面膜との間の交叉アレルギー状態を間接的にとらえている可能性を示すものかも知れない。とくに、HBsAg と宿主蛋白との共通抗原性が問題とされている折から^{52,54}、HBsAg と肝細胞表面膜との間に analogous な抗原が存在する可能性も当然考えられよう。また、種々の細菌やウィルスで、人蛋白との間に cross-reacting antigen が発見され、その存在と自己免疫疾患発生との関連が論じられている⁶⁹。

また、ウィルス感染に際しては、ウィルスに対する宿主の遺伝的性格が問題とされている。このようなことは、NZB マウスの自己免疫疾患モデルについても明らかであり、慢性肝疾患についても、ある疾患群で特定の HLA の検出頻度が高いという報告がある^{70,71}。したがって、immune response-gene の間接的表現である HLA の検索も、肝炎慢性化機序における一つのステップを明らかにするものであり、今後のデータの集積がのぞまれる。

結 論

肝炎の慢性化は、感染因子側の問題や宿主の免疫担当細胞を中心とした多くの因子が、複雑にからみあった総和として解釈でき、ある特定の一つの因子のみによって慢性化を説明するのは困難であろう。著者は、肝炎の慢性化が、とくに宿主の免疫環境を中心とした

自己免疫現象によるものではないかとの仮定のもとに、HBsAg と肝細胞表面膜との関連を重要視し、主に細胞性免疫を中心に検討を加え、以下の結果を得た。

- 1) 非特異的T細胞機能は、肝疾患の重症度に比例する傾向で低下している。
- 2) 慢性肝疾患の70%は、HBAg 関連肝疾患である。
- 3) 不溶性肝細胞表面膜に対する細胞性抗体陽性の慢性肝疾患の80%は、HBAg 関連肝疾患である。
- 4) HBsAg に対する細胞性抗体の出現と不溶性肝細胞表面膜に対する細胞性抗体の出現とはよく平行して出現し、かつ両者の M.I. には正の相関がある。

このようなことから、慢性肝疾患の多くは、HBAg 感染に続発しておこり、HBAg 排除という宿主にとって有利と思われる免疫反応が起る一方において、宿主にとって不利な自己免疫現象—不溶性肝細胞表面膜に対する細胞性免疫—が持続的に発現し、肝炎慢性化の一病因として作用することが示唆された。そしてこの両免疫現象の発生機転についての考察を加えた。

稿を終るに臨み、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ともに、御協力をいただいた第二病理学教室の諸先生方、貴重な臨床材料を提供して下さい第1内科服部信教授、小林健一講師、国立金沢病院内科杉岡五郎博士の諸先生方から感謝致します。

また、本研究の一部は昭和49年度文部省科学研究費補助金(課題番号948083)の援助および昭和50年度厚生省特定疾患調査研究分担研究費(難治性の肝炎・肝内胆汁うっ滞症研究班)の援助によりなされた。記して感謝の意を表す。

文 献

- 1) Mackay, I. R., Taft, L. I. & Cowling, D. C. : Lancet, II, 1323 (1956).
- 2) Meyer zum Büschenfelde, K. H. : Ztschr. ges. exp. Med., 148, 131 (1968).
- 3) Meyer zum Büschenfelde, K. H. & Kössling, F. K. : Immunology of the liver (ed. by Smith, M. & Williams, R.), p. 169, London, William Heinemann Medical Books Ltd., 1971.
- 4) Tobias, H., Safran, A. P. & Schaffner, F. : Lancet, I, 193 (1967).
- 5) 梶原光令 : 肝臓, 12, 328 (1971).
- 6) Smith, M. G. M., Golding, P. L., Eddleston, A. L. W. F., Mitchell, C. G., Kemp, A. & Williams, R. : Brit. med. J., 1, 527 (1972).

- 7) Miller, J., Smith, M. G. M., Mitchell, C. G., Reed, W. D., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R. : *Lancet*, II, 296 (1972).
- 8) Meyer zum Büschenfelde, K. H., Knolle, J. & Berger, J. : *Klin. Wschr.*, 52, 246 (1974).
- 9) Almeida, J. D. & Waterson, A. P. : *Lancet*, II, 983 (1969).
- 10) Dudley, F. J., Fox, R. A. & Sherlock, S. : *Lancet*, I, 723 (1972).
- 11) Popper, H. & Mackay, I. R. : *Lancet*, I, 1161 (1972).
- 12) Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R. : *Lancet*, II, 1543 (1974).
- 13) Report of a WHO Scientific Group : *Wld. Hlth. Org. Jech. Rep. Ser.*, No. 512, p. 19 (1973).
- 14) Ripps, C. S. & Hirschhorn, K. : *Clin. exp. Immunol.*, 2, 377 (1967).
- 15) Shtacher, N. B., Hirschhorn, K. & Uhr, W. : *Clin. exp. Immunol.*, 3, 889 (1968).
- 16) 矢田純一, 橘武彦 : 免疫実験操作法, 日本免疫学会編, 473頁, 1972.
- 17) Berman, H. M., Gram, W. & Spirtes, M. A. : *Biochim. Biophys. Acta*, 183, 10 (1969).
- 18) Avrameas, S. & Ternynck, T. : *Immunochemistry*, 6, 53 (1969).
- 19) 川村明義 : 免疫学・アレルギー学実験法 (進藤宙二監修), 第1版, 553頁, 東京, 文光堂, 1971.
- 20) Sheffield, J. B. & Emmelot, P. : *Exptl Cell Res.* 71, 97 (1972).
- 21) Fitzpatrick, D. F., Davenport, G. R., Forte, L. & London, E. J. : *J. Biol. Chem.*, 244, 3561 (1969).
- 22) Gerin, J. L., Holland, P. V. & Purcell, R. H. : *J. Virol.*, 7, 569 (1971).
- 23) Sjöborg, M. & Bendixen, G. : *Acta Med. Scand.*, 181, 247 (1967).
- 24) Hopf, U., Meyer zum Büschenfelde, K. H. & Freudenberg, J. : *Clin. exp. Immunol.*, 16, 117 (1974).
- 25) Mackay, I. R. & Burnet, F. M. : *Autoimmune Diseases*, p. 16, Springfield, Charles C Thomas Publisher, 1963.
- 26) Witebsky, E., Rose, N. R., Terplan, K., Paine, J. R. & Egan, R. W. : *J. A. M. A.*, 164, 1439 (1957).
- 27) Nielsen, J. O., Dietrichson, O., Elling, P. & Christofferson, P. : *N. Engl. J. Med.*, 285, 1157 (1971).
- 28) Good, R. A. & Page, A. R. : *Am. J. Med.*, 29, 804 (1960).
- 29) Giustino, V., Dudley, F. J. & Sherlock, S. : *Lancet*, II, 850 (1972).
- 30) 中川潤, 伊藤憲一, 深瀬政市 : 臨床免疫, 5, 943 (1973).
- 31) 中尾昌弘, 溝口靖紘, 門奈丈之, 山本祐夫, 森沢成司 : 肝臓, 16, 45 (1975).
- 32) 稲垣威彦, 篠崎弘一, 長山正四郎, 歌川享一, 渡辺省三, 戸枝一明, 市田文弘 : 総合臨床, 24, 2365 (1975).
- 33) 加登康洋, 杉本立甫, 鈴木邦彦, 西邨啓吾, 小林健一, 杉岡五郎, 武内重五郎, 野々村昭孝, 森谷修三, 太田五六 : 肝臓, 15, 369 (1974).
- 34) Cooperband, S. R., Bondevik, H., Schmid, K. & Mannick, J. A. : *Science*, 159, 1243 (1968).
- 35) Davis, R. C., Cooperband, S. R. & Mannick, J. A. : *J. Immunol.*, 106, 755 (1971).
- 36) Menzoian, J. O., Glasgow, A. H., Nimberg, R. D., Cooperband, S. R., Schmid, K., Saporoschetz, I. & Mannick, J. A. : *J. Immunol.*, 113, 266 (1974).
- 37) Macsween, R. M. N. & Thomas, M. A. : *Clin. exp. Immunol.*, 15, 523 (1973).
- 38) Newberry, W. M., Shorey, J. W., Sanford, J. P. & Combes, B. : *Cell. Immunol.*, 6, 87 (1973).
- 39) Newble, D. I., Holmes, K. T., Wangel, A. G. & Forbes, I. J. : *Clin. exp. Immunol.*, 20, 17 (1975).
- 40) 太田五六, 若月寿之助 : 医学のあゆみ, 62, 843 (1967).
- 41) 小西奎子 : 臨床免疫, 2, 103 (1970).
- 42) 小西奎子 : 臨床免疫, 3, 395 (1971).
- 43) Thomson, A. D., Cochrane, M. A. G., McFarlane, I. G., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R. : *Nature*, 252, 721 (1974).
- 44) Paronetto, F. & Vernace, S. : *Clin. exp. Immunol.*, 19, 99 (1975).
- 45) Wands, J. R. & Isselbacher, K. J. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 1301 (1975).
- 46) Toh, B. H., Roberts-Thomson, I. C., Matthews, J. D., Whittingham, S. & Mackay, I. R.

- : Clin. exp. Immunol., 14, 193 (1973).
- 47) 安倍 達, 本間光夫 : 臨床科学, 10, 367 (1974).
- 48) 白井俊一 : 最新医学, 29, 1608 (1974).
- 49) Knolle, J., Meyer zum Büschenfelde, K. H., Bolte, J. p. & Berger, J. : Klin. Wschr., 51, 1972 (1973).
- 50) Ziff, M. : Ann. Intern. Med., 75, 951 (1971).
- 51) Allison, A. C., Denman, A. M. & Barnes, R. D. : Lancet, II, 135 (1971).
- 52) Fudenberg, H. H. : Immunobiology : Current Knowledge of Basic Concepts in Immunobiology and their Clinical Applications. (ed. by Good, R. A. & Fisher, D. W.) p. 175, Stamford, Sinaver Associates Inc., 1972.
- 53) Neurath, A. R., Prince, A. M. & Lippin, A. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 2663 (1974).
- 54) Zuckerman, A. J. : Nature, 255, 104 (1975).
- 55) Laiwah, A. A. C. Y., Chaudhuri, A. K. R. & Anderson, J. R. : Clin. exp. Immunol., 15, 27 (1973).
- 56) De Gast, G. C., Houwen, B. & Nieweg, H. O. : Brit. med. J., 4, 707 (1973).
- 57) Erard, P. : Clin. exp. Immunol., 18, 439 (1974).
- 58) Tong, M. J., Wallace, A. M., Peters, R. L. & Reynolds, T. B. : N. Engl. J. Med., 293, 318 (1975).
- 59) Ibrahim, A. B., Vyas, G. N. & Perkins, H. A. : Infect. Immun., 11, 137 (1975).
- 60) Dudley, F. J., Giustino, V. & Sherlock, S. : Brit. med. J., 4, 754 (1972).
- 61) Irwin, G. R., Hierholzer, W. J., Cimis, R. & McCollum, R. W. : J. Infect. Dis., 130, 580 (1974).
- 62) De Moura, M. C., Vernace, S. J. & Paronetto, F. : Gastroenterology, 69, 310 (1975).
- 63) 川合弘毅, 中尾昌弘 : 臨床免疫, 7, 497 (1975).
- 64) Hoofnagle, J. H., Gerety, R. J. & Barker, L. F. : N. Engl. J. Med., 290, 1336 (1974).
- 65) 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).
- 66) 野々村昭孝 : 臨床免疫, 7, 1125 (1975).
- 67) 太田五六, 野々村昭孝, 西村 功, 杉岡五郎 : 肝臓, 17, 29 (1976).
- 68) Prince, A. M., Brotman, B., Grady, G. F., Kuhns, W. J., Hazzi, C., Levine, R. W. & Millian, S. J. : Lancet, II, 241 (1974).
- 69) Lyampert, I. M. & Danilova, T. A. : Progr. Allergy, 18, 423 (1975).
- 70) Mackay, I. R. & Morris, P. J. : Lancet, II, 793 (1972).
- 71) Galbraith, R. M., Eddleston, A. L. W. F., Smith, M. G. M., Williams, R., McSween, R. N. M., Watkinson, G., Dick, H., Kennedy, L. A. & Batchelor, J. R. : Brit. med. J., 3, 604 (1974).

Abstract

Increasing attention has been paid to the role of cell-mediated immune response in a pathogenesis of liver diseases with or without HBsAg infection.

Lymphocytes from peripheral blood of normal subjects and patients with various liver diseases were studied to determine the percent population of T cell, the response to PHA, delayed hypersensitivity to insoluble liver cell surface membranes (ILSM) prepared from rat and purified HBsAg. The PHA responsiveness was reduced in acute hepatitis, chronic hepatitis, liver cirrhosis and asymptomatic HBsAg carrier with statistical significance compared to normal subjects ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$ respectively). The percent population of T cell was also reduced in chronic hepatitis, liver cirrhosis and asymptomatic HBsAg carrier compared to normal subjects ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ respectively).

The ILSM were found to contain liver-specific component which differed serologically from the soluble lipoprotein of Meyer zum Buschenfelde type from the surface membrane. Delayed hypersensitivity to the ILSM was found in 15% of patients with acute hepatitis, 42% of those with chronic hepatitis and 45% of those with liver cirrhosis. None of the patients, however, showed positive migration inhibition with renal cell surface membranes prepared from rat kidney. The incidence of the positive reaction in chronic hepatitis and liver cirrhosis was statistically significant ($P < 0.01$).

There seemed to some correlation between the degree and incidence of the cellular immune response to purified HBsAg and that to the ILSM in chronic liver diseases, particularly in chronic hepatitis. Its significance was discussed.
