肝疾患における血中免疫グロブリンの変動およびその機序に関する研究*

江 藤 澄 哉**

結 言

ある種の肝疾患にみられる高 γ -グロブリン血症は、従来、もっぱら濾紙電気泳動法による血清蛋白分画パターンという立場から観察されてきた¹⁻⁸⁾。しかし、免疫化学が進歩して免疫グロブリンの亜分画の測定が可能になった現在では、この新しい観点に立った再検討が必要であることはいうまでもない。

また、肝疾患において高 γ -グロブリン血症が出現する機序については不明の点が多く、急性肝炎の場合は急性ウイルス感染による抗ウイルス抗体の増加としても理解されるが、慢性肝炎、肝硬変となると遷延したウイルス感染⁹⁾、自己免疫機序など、いろいろのことが問題となってくる。しかし、いずれの考えに対しても確実な証拠に乏しい。

著者は以上のようなことを考え、まず、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変症について血中の免疫グロブリンの亜分画の測定を行い、さらに抗ウイルス抗体、リウマチ因子などの検査所見との比較検討を試みた。

他方、慢性肝疾患で免疫グロブリンが増加するのは慢性疾患患者個体における抗体産生能が増強しているためと推定し、慢性肝炎、肝硬変患者および実験的肝硬変シロネズミに対して抗原刺激を行い、それぞれの抗体産生能について検討した。

また肝傷害時に増加する血中免疫グロブリンが、どこで産生されるのかも問題であるので、これについて、実験的に肝硬変シロネズミの脾および肝の上清分画 γ -Gへの標識アミノ酸のとりこみをしらべたので、合わせて報告する。

臨床的研究

A. 測定法

1. 免疫グロブリンの測定

* 本論文の要旨は第3回世界消化器病学会(1966)、第2回日本肝臓学会シンポジウム「肝疾患と免疫グロブリン」(1966)、第16回日本アレルギー学会(1966)、第17回日本アレルギー学会(1967)において発表した。

** S. Eto: 東京大学第1内科(主任: 吉利和教授)。

γ -G および γ -M は Polley & Mollison の抗グロブリン抑制試験¹⁰⁾に準じて測定し、 γ -A は寒天層内二重拡散法により測定した。

1) 抗グロブリン抑制試験

材料: γ -G 系については抗 D 非定型抗体 (γ -G からなる), Rh(+) O 型血球, 抗ヒト γ -G ウサギ血清を用い、 γ -M 系については抗 Le^a 非定型抗体 (γ -M からなる), Le(a+) O 型血球, 抗ヒト γ -M ウサギ血清を用いた。抗 γ -G, 抗 γ -M ウサギ血清は Highland 社製抗血清をヒト赤血球で吸収して異種凝集素を除いたものを、抗 D, 抗 Le^a は東大病院輸血部より入手、Rh(+), Le(a+) O 型血球は、たまたま型の適合した著者自身の血球を用いた。

方法: a) γ -G の測定

i) 2%Rh(+)O 型血球生理食塩水浮遊液, 抗 D 非定型抗体(生理食塩水で4倍に希釈)を10:1の割合に加え、37°C 30分恒温槽で感作後、生理食塩水で3回洗浄し、再び2%血球浮遊液とする。

ii) 被検血清を1,000倍より30,000倍まで1,000倍間隔で希釈。

iii) 希釈被検血清1滴を小試験管にとり(1滴が0.05 ml となるピペットを用いる), これに抗 γ -G ウサギ血清を同じく1滴加え、室温で10分間放置。

iv) これに2%抗 D 感作 Rh(+)血球浮遊液を1滴加え、ただちに1,000回転1分間遠心する。

v) 振り上げ法で凝集の認められる最初の希釈倍数をもって抑制終価とした。

b) γ -M の測定

i) 抗 Le^a 非定型抗体($\times 1$), 5% EDTA, 10% Le(a+) O 型血球生理食塩水浮遊液を10:1:2の割合でこの順に加え、18°C 2時間恒温槽で感作後、生理食塩水で3回洗浄し、1%血球浮遊液とする。

ii) 被検血清を10倍より300倍まで10倍間隔で希釈。

iii, iv, v) 抗 γ -G ウサギ血清のかわりに抗 γ -M ウサギ血清を、2%抗 D 感作 Rh(+)O 型血球浮遊液のかわりに1%抗 Le^a 感作 Le(a+)O 型血球浮遊液を用

いるほかは、 γ -G の測定に同じ。

2) 寒天層内二重拡散法

材料: Difco 精製寒天, Highland 社製抗ヒト γ -A ウサギ血清。

方法: i) 1% 生理食塩水寒天溶液で形のごとく厚さ 2 mm の寒天板をつくり, 5 mm 間隔で直径 2 mm の正円孔 (Well) を直線上にあける。

ii) 被検血清を 40 倍より 1,000 倍まで 40 倍間隔で希釈し 1 列の Well に入れる。

iii) 対面列の Well に抗 γ -A ウサギ血清 (生理食塩水で 4 倍に希釈) を入れ, 湿潤箱内に室温で 24 時間放置。

iv) 沈降線のみられる最高の希釈倍数をもって抗体価とする。

3) 基準曲線の作製

γ -G に関してはヒト血清を DEAE-Cellulose column を通して精製したものを, γ -A, γ -M, に関しては Highland 社の既知濃度の血清を, 生理的範囲に希釈して, その抗体価を上述の方法で測定するとそれぞれ免疫グロブリンの絶対量と抗体価との間に, 各免疫グロブリンの生理的な濃度の範囲で直線関係が認められた。

4) 正常値

上述の方法で測定した正常者 (東大輸血部に来院した供血者でなんら異常疾患を有しないもの) 45 名の免疫グロブリン値を基準曲線により算出し, mg/dl で表わすと, 表 1 のとおりで, その値 (平均値 $\pm$ 標準偏差) は γ -G: $1,272 \pm 204$, γ -A: 249 ± 36 , γ -M: 98 ± 18 で正常範囲を平均値 $\pm$ 標準偏差 $\times 2$ とすると γ -G: 1, 680~866, γ -A: 321~177, γ -M: 134~62 であった。なお, これを同時に行った Highland 社製の Immunoplate の寒天層内一重拡散法による成績と比べると, 各免疫グロブリンとも両者は比較的良好一致した。

表 1. 免疫グロブリンの測定法と正常値

免 疫 グ ロ ブ リ ン	抗グロブリン抑制試験		寒天平板一重拡散法	
	平均値 $\pm$ 標準偏差	正常範囲	平均値 $\pm$ 標準偏差	正常範囲
γ -G	1272 ± 204	1680~866	1224 ± 204	1638~816
γ -M	98 ± 18	134~62	88 ± 17	122~54
寒天平板二重拡散法				
γ -A	249 ± 36	321~177	245 ± 49	343~149

正常範囲: 平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差

2. 抗ウイルス抗体の検出

抗原: Bolin ら¹¹⁾ がプール黄疸血清被接種者の血清より分離後, ヒト胎児肺組織で継代培養したウイルスをラテックス粒子に吸着させたもの。

方法: i) 定性反応

被検血清を PBS (pH 7.2) で 5 倍希釈し, その 0.5 ml に上記のウイルス吸着ラテックス懸濁液 0.05 ml を加え, 37°C 30 分恒温槽で感作後, 3,000 回転 1 分間遠心し, 振り上げて凝集の有無を判定した。ほかに, ラテックスのみの対照 (PBS 0.5 ml + ラテックス懸濁液 0.05 ml), ウイルス吸着ラテックスのみの対照 (PBS 0.5 ml + ウイルス吸着ラテックス懸濁液 0.05 ml) をおいた。

ii) 定量反応

被検血清を 5 倍から 320 倍まで倍々希釈し, i) と同様の操作を行い, 凝集のみとめられる最高の希釈倍数をもって抗体価とした。

3. 破傷風トキシソイドによる免疫と抗毒素価の測定

抗原: 武田薬品工業製沈降破傷風トキシソイド

免疫方法: トキシソイド 0.5 ml を 6 週間隔で 2 回, 被検者に筋注した。

抗毒素価測定: 注射前および第 2 回目注射より 2 週後に採血し, 型のごとく血清を分離し, その抗毒素価をマウスを用いた中和反応による Score 法 (L+1,000 レベル)^{12,13)} で算定し, 血清 1 ml あたりの国際単位で表わした。

B. 成績

1. 肝疾患における血中免疫グロブリン値

対象は表 2 のとおり急性肝炎 33 例 (うち, 流行性肝炎 23 例, 血清肝炎 8 例, 激症型 2 例), 慢性肝炎 43 例, これを既往における急性発症の明らかなもの (I 型とよぶ) と, 明らかでないもの (II 型とよぶ) にわければ,

表 2. 症 例

急性肝炎	33 例
流行性	23 例
血清	8 例
激症	2 例
慢性肝炎	43 例
I 型	26 例
流行性	9 例
血清	17 例
II 型	17 例
肝硬変	32 例

図 1. 急性肝炎の免疫グロブリン

I型 26例, II型 17例であった。なおI型は, 急性発症後1年以上肝機能異常が遷延しているものを慢性肝炎としたが, その内訳は流行性肝炎9例, 血清肝炎17例であった。肝硬変32例, うち続発性胆汁性肝硬変1例, 脂肪性肝硬変のうたがい4例をのぞけば, ほとんど甲'ないし乙型肝炎に属する。

なお, 以上の症例の診断は臨床症状, 一般臨床検査成績によるほか, 二, 三の重症例を除いては全例肝生検を行い, その組織所見より最終的に診断した。

1) 急性肝炎

急性肝炎の血中免疫グロブリン値は図1のとおりで33例中 γ -Gは17例が正常範囲をこえた高値を示し, 正常範囲以下の値を示すものは1例もなかった。 γ -Aは幅広く分布するが12例が同じく高値を, 3例は著明な低下を示した。 γ -Mは12例で同じく高値を, 8例で正常以下の値を示した。いずれの免疫グロブリンでも, 流行性と血清との間に推計学的に有意の差は認めなかった。

発黄から経過を追って各時期に測定した免疫グロブリンの平均値は, 図2のとおりで γ -Gは2週目より軽度上昇傾向を示し, 以下6週目まではほぼ同様の値をつづける。 γ -Aは γ -Gよりおくれ6週目より上昇ははじめ, 2カ月目でさらに高くなる。 γ -Mは2週目に上昇, 第4週目で一旦正常値まで低下したのち, 6週目で再び上昇し, 2峰性の山をなした。経過良好の例では, γ -G, γ -Mは2カ月で, γ -Aは3カ月で正常値に復する。

しかし, 個々の例ではさまざまな変動を示した。以下代表例をあげると, 図3の症例は19才男子, 流行性肝炎で良好な経過を辿って治癒した患者であるが, γ -Mは

図 2. 急性肝炎の経過と免疫グロブリン

図 3. 急性肝炎症例
(T.F., 19才, 男, 流行性)

図 4. 急性肝炎症例
(S.M, 30 才, 女, 流行性)

図 5. 慢性肝炎の免疫グロブリン

1週で著明に高値を示したのち、急速に正常化した。γ-G, γ-A はこれにおくれて4週で高値を示すが、トランスアミナーゼの正常化とともに7週で正常化している。

図4の症例は30才、女子、流行性肝炎として発症し、肝機能検査は一時良好な経過をたどったがその後、増悪、改善を繰り返す、臨床的に慢性肝炎に移行した例である。γ-Mは3週、γ-Aは6週で、それぞれ著明な上昇を示し、14カ月後もなお高値をたもっている。

図 6. 肝硬変の免疫グロブリン

図 7. 肝疾患における免疫グロブリン

表 3. 各種肝疾患の免疫グロブリン

疾患名	No.	γ-G	γ-A	γ-M
		mg/dl	mg/dl	mg/dl
急性肝炎	33	1777	293	137
流行性	23	1729	288	141
血清	8	1916	334	137
急性	2	1765	195	75
慢性肝炎	43	1977	324	176
流行性	9	1772	273	219
血清	17	2292	346	182
II型	17	1772	330	147
肝硬変	32	2271	418	149
正常範囲	45	1680~866	321~177	134~62

2) 慢性肝炎

慢性肝炎の血中免疫グロブリンの値は図5に示すとおりで43例中 γ -Gは30例が、 γ -Aは22例が、 γ -Mは27例が正常範囲をこえる高値を示した。流行性、血清、急性発症のないII型のあいだで平均値を比較すると、 γ -Gは血清でより高く、 γ -Aは血清およびII型でより高く、 γ -MはII型でより低値を示した。なお、発病後の期間が長くなるにつれて免疫グロブリン値が増加するといった傾向はみられなかった。

3) 肝硬変

肝硬変の血中免疫グロブリンの値は図6に示すとおり、 γ -Gは32例中27例で正常範囲をこえる高値を示し、そのうち約半数は2.5 g/dl以上の著明な高値を示した。また γ -Aは26例で同じく高値を示し、うち11例で0.5 g/dl以上の著明な高値を示した。 γ -Mは21例が同じく高値を示した。

以上、肝疾患における血中免疫グロブリンの値を平均値でまとめると、図7、表3のとおりとなり、 γ -Gは急性肝炎では正常上限よりやや高く、肝硬変では著明に増加して、正常平均値の約1.8倍にも達し、慢性肝炎はその中間にある。 γ -Aは急性肝炎では正常範囲、慢性肝炎では正常の上限よりやや高値を示すにすぎないが、これに反し肝硬変では著明に増加して、正常平均値の約1.7倍に達している。 γ -Mは急性肝炎では正常上限よりや

表4. 特異的ラテックス・ウイルス抗体試験

疾 患	反 応	例 数	陽 性	
			例 数	%
急 性 肝 炎		24	12	50
慢 性 肝 炎		15	11	73
I 型		12	9	75
II 型		3	2	67
肝 硬 変		14	9	64
ウ イ ル ス { +		4	2	50
肝炎の既往 { -		10	7	70
腎 疾 患*		9	8	89
そ の 他 の 疾 患		25	9	36

* 慢性腎炎7例, 慢性腎盂腎炎2例

表5. RA-Test と γ -M との関係

疾 患	反 応				AR-T 陽性		γ -M上昇		計
	-	±	1+	2+	±以上	%	例数	%	
急性肝炎	28	4	5	0	9	24	11	29	37
慢性肝炎	10	2	9	4	15	60	17	68	25
肝 硬 変	7	4	10	8	22	76	19	66	29
合 計	45	10	24	12	46	56	47	52	91

図8. γ -M と RA Test, Bentonite 凝集反応の相関

や高く、肝硬変ではさらに高値を示すが、慢性肝炎でもっとも高値を示して正常平均値の約 1.8 倍にも達している。

2. 抗ウイルス抗体と血中免疫グロブリン値

Bolin の抗ウイルス抗体を測定した成績は表 4 のとおりで肝疾患の陽性率 61 % に対し、他の疾患 36 % であるが、腎疾患（慢性腎炎 7 例、腎盂腎炎 2 例）でも 89 % の陽性率を認めた。急性肝炎、肝硬変の陽性率はそれぞれ 50, 73, 64 % であり、その抗体価は 5 倍から 320 倍で、抗体価の強さは疾患によって特に有意の差を認めなかった。慢性肝炎、肝硬変で既往における急性発症の有無にしたがって比較してもとくに差を認めず、さらにこの抗体価の強さと各種免疫グロブリンとの関係を、急性、慢性肝炎で比較してみたが、いずれの肝炎のどの免疫グロブリンとも、なんらの相関を認めなかった。

3. リウマチ反応と γ -M

肝疾患における R-A Test の成績は表 5 のように、 $\pm$ 以上を陽性とすれば急性肝炎 24 %, 慢性肝炎 60 %, 肝硬変 76 % で陽性を示す。

γ -M の量と R-A Test の強さ、あるいは Bentonite 凝集反応の凝集価を比較した成績は図 8 のとおりで、肝硬変、慢性肝炎ではある程度の相関を示すが、急性肝炎では γ -M が高値を示す例においても、リウマチ反応陰性か弱陽性を示すものが多かった。

4. 慢性肝疾患患者に対する免疫効果

1) 破傷風抗毒素価の変動

対象は慢性肝炎 9 例、肝硬変 9 例、パンチ症候群 2 例、正常対照 14 例で、いずれも既往に破傷風に罹患しないし破傷風予防接種のないことを確めた。測定法 A-3 によって測定した抗毒素価は図 9 に示すように、正常対照の抗毒素価は低いものが多いのに対し、慢性肝疾患群では、なかに低値を示すものもあるが、一般に抗毒素価が高く、なかに異常高値を示すものが認められ、とくにパンチ症候群の 2 例はともかなりの高値を示した。

また、その平均値も正常対照の 0.055 国際単位/ml に対し慢性肝炎では 0.188 国際単位/ml と高く、明らかな差を認めた。

2) 破傷風抗毒素価と血中免疫グロブリン値との関係

破傷風トキソイド注射後の血中免疫グロブリン値の変動と抗毒素価との関係を比較すると、図 10 のようになり、左端の抗毒素価低い群でも、右端の高い群でも、また γ -G, γ -A, γ -M の各免疫グロブリンについてみても、その変動はさまざまであって、とくに破傷風トキソ

図 9. 慢性肝疾患の破傷風抗毒素価の変動

図 10. 破傷風抗毒素価と免疫グロブリン

イド投与後、免疫グロブリン値が上昇する傾向は認められなかった。

実験的研究

A. 対象および方法

a. 実験動物

四塩化炭素傷害肝硬変シロネズミは体重約 150 g の

シロネズミ全血清
抗シロネズミ全血清ウサギ血清
シロネズミ γ -G
抗シロネズミ γ -G ウサギ血清
シロネズミ全血清

図 11. シロネズミ γ -G, 抗シロネズミ γ -G の I.E.P.

Wistar 系雄シロネズミに四塩化炭素 0.1 ml を週 2 回あて、6 ヶ月腹腔内注射してつくった。

黄変米傷害肝硬変シロネズミは同じく体重約 150 g の Wistar 系雄シロネズミに "*Penicillium islandicum*" を繁殖させた黄変米粉と低蛋白食を 1:9 の割合に混合した餌で 4 ヶ月飼育してつくった。

組織学的検索は実験終了時に、ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン染色によって行った。

b. 実験方法

1. ヒツジ赤血球による免疫および溶血素価の測定

抗原: 0.25 % ヒツジ赤血球生理食塩水浮遊液。

免疫方法: 上記抗原 1 ml を尾静脈より 1 回注射。

溶血素価の測定: 注射後 1 週目に尾先端より採血し、型の如く血清分離して、溶血素価の測定を行った。

抗原: 2 % ヒツジ赤血球 Mg 生理食塩水浮遊液*。

補体: 10 倍希釈新鮮モルモット血清。

被検血清: 10 倍より倍々希釈。

希釈はすべて Mg 生理食塩水による。

手技: 希釈血清、補体、抗原を 0.25 ml あて、この順に小試験管にとり、よく混和後、37°C 30 分恒温槽で感作。

判定: 完全溶血を示す最高希釈倍数をもって溶血素価とする。

2. 肝、脾上清分画 γ -G への ^{14}C -ロイシンのとりこみ

1) 抗シロネズミ γ -G ウサギ血清の作製

i) シロネズミ γ -G の分離精製

硫酸分画法、DEAE-Cellulose column 法を組み合わせ、 γ -G の分離精製を行った。

すなわち、まずブルーシロネズミ血清 20 ml に $1/3$ 硫酸

分画法を 2 度行って得た粗 γ -グロブリン沈澱を約 5 ml の生理食塩水で十分溶解したのち、セロファン、チューブに入れ冷流水 2 昼夜透析で脱アンモン後、さらに column にかける際の buffer で十分透析した。DEAE-Cellulose column の条件は高さ 30 cm, 内径 2 cm, buffer は Na-Na 磷酸 buffer (pH 7.2, $\mu=0.015$) とした。得られた分画を型のごとくカーボワックスで濃縮、さらに生理食塩水で十分透析後、抗シロネズミ血清に対して免疫電気泳動を行うと、図 11 のとおり γ -G に相当する一本の沈降線を得た。

ii) 抗シロネズミ γ -G ウサギ血清の作製

i) で得た濃縮液 (γ -G 2 mg/ml) 1 ml と Freund の complete adjuvant 1 ml との emulsion をウサギの指趾尖 16 ヶ所および全身の皮内に分割注射し、1 週後に同量の皮内注射を行ったのち、さらに 1 週後に試験採血し、免疫電気泳動を行い、図 11 のとおり全シロネズミ血清に対し、1 本の γ -G に相当する沈降線を認め、ただちに全採血を行い、血清分離して抗シロネズミ γ -G ウサギ血清を得た。

2) 肝、脾上清分画 γ -G の分離

i) 肝、脾切片の培養と、その上清分画の分離。

エーテル麻酔して開腹、開胸、心臓穿刺で全採血、さらに肝の灌流を行ったのち、肝、脾を摘出。血液成分を洗い落してから slicer で作製した肝切片 500 mg, 脾切片 200 mg にそれぞれ ^{14}C -ロイシン 10 μC (蒸留水 1 ml に溶解), Krebs-Ringer 磷酸 buffer 5 ml を加え 37°C, 2 時間、空気相下でインキュベーションし、培養液とともに Potter-Elvehjem のガラス・ホモゲナイザーでホモゲナイズしたのち、15,000 g, 10 分間遠心し、その上清を得た。

ii) γ -G の分離

i) で得た上清 1 ml に 1)-ii) の抗シロネズミ γ -G ウ

* Mg 生理食塩水とは 1 l の生理食塩水に $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.167 g を溶かして Mg^{++} を 207/ml の濃度に加えたもの。

図 12. 定量的沈降反応による血清 γ -G の検量曲線

図 13. 肝硬変ラットにおけるヒツジ溶血素価の変動

サギ血清 1 ml を加え、37°C 2 時間、さらに 4°C 24 時間おいたのち、15,000 g、10 分間遠心して沈渣を得た。なお純粹のシロネズミ γ -G を適當の範囲に希釈して、この方法により沈降反応を行わしめて γ -G 量と沈降物生成量との関係を見ると図 12 のとおりで直線関係を示した。

3) ^{14}C の定量

2)-ii) で得られた沈渣を冷水、エタノール、エタノール：エーテル：クロロホルム(2:2:1)、エーテルで、この順に型のごとくそれぞれ 2 回ずつ洗ったのち、放置して乾燥。さらにハイアミン 0.5 ml にとかし、トルエ

図 14. 四塩化炭素傷害シロネズミの肝組織像 (偽小葉形成の著明な例)

図 15. 四塩化炭素傷害シロネズミの肝組織像 (肝線維化著明であるが、偽小葉形まで進行していない例)

ン系シンチレーター (PPO 4 g, DMPOPOP 0.1 g をトルエンで 1 l としたもの) 15 ml に分散し、米国バカード社製 TRI-CARB 3315 型液体シンチレーション・カウンターで測定を行った。

各試料は 20,000~600,000 cpm 程度であり、とりこみは cpm/mg/2 hrs で表現した。

B. 成績

1. 肝硬変シロネズミに対する免疫効果

1) ヒツジ赤血球溶血素価の変動

四塩化炭素、黄変米による肝傷害シロネズミそれぞれ 8, 9 匹、正常シロネズミ 22 匹のヒツジ赤血球による感作 1 週間後の溶血素価は図 13 のとおりで肝傷害シロネズミ群に高値を示すものが多く、各群の平均値をとっ

図 16. 肝硬変ラットにおけるヒツジ溶血素価の変動と組織学的変化との相関

てみても、四塩化炭素傷害群 4,200 倍、黄変米傷害群 2,791 倍で、正常群の 704 倍に比し、明らかな高値を示した。四塩化炭素傷害群と黄変米傷害群とは、その溶血素価は試験管にして一本以内の差で、有意の差があるとは認められない。

2) ヒツジ赤血球溶血素価と組織像との関係

肝傷害シロネズミの組織所見を示すと、図 14 は偽小葉形成の著明なもの、図 15 は肝線維化は著明であるが偽小葉形成にまで進行していないものである。

これらの組織学的変化と溶血素価との相関をみると、図 16 のとおり偽小葉形成、線維化ともに高度のものは、溶血素価 320 倍、1,280 倍とかえって低目であり、偽小葉形成のほとんどみられないか、あるいは軽度であるが、肝線維化の著明なものは、ほぼ全例が 2,560 倍から 10,240 倍ととむしろ高値を示した。しかし例外的に、肝線維化のみ著明で抗体価 160 倍と低値を示すものを 1 例認めた。

2. ヒツジ赤血球による感作前後の肝硬変シロネズミ肝、脾上清分画 γ -G への 14 C-ロイシンのとりこみ

ヒツジ赤血球による感作前後で、肝硬変シロネズミ肝および脾上清分画 γ -G への 14 C-ロイシンのとりこみを測定した成績は図 17 のとおりである。なお肝硬変シロネズミはすべて黄変米傷害群を用いた。

まず、肝についてみると、感作前、正常肝の 33.4 ± 9.6 cpm/mg/2 hrs に比べ、硬変肝では 57.4 ± 14.8 cpm

図 17. ヒツジ赤血球感作前後における肝、脾上清分画 γ -G への 14 C-leucine のとりこみ

図 18. 肝上清 γ -G と脾上清 γ -G への 14 C-leucine とりこみ値の相関

/mg/2 hrs と明らかにとりこみは増加し、この差は推計学的に有意であった。

感作後、正常肝では感作前に比べ、ほとんど変動を示さないのに反し、硬変肝では感作によってある程度とりこみが増加した。

次に、脾についてみると、感作前、正常群の脾の 133.5 ± 21.5 cpm/mg/2 hrs に比べ、肝硬変群の脾では 339.1 ± 243.9 cpm/mg/2 hrs と分散は大きい平均で約 2.6 倍の著明なとりこみの増加を示し、この差は推計学的に有意であった。

感作後は、正常群脾でも、肝の場合と異なり、 251.1 ± 62.9 cpm/mg/2 hrs と、とりこみは 2 倍近くの増加を示し、肝硬変群脾でも、感作後 428 ± 145.1 cpm/mg/2 hrs と、かなりの増加を示した。

最後に、肝硬変シロネズミについて、肝と脾へのとりこみの相関をみると、図 18 のとおりで両者は正の相関を示した。

考 案

従来、肝疾患の血中 γ -グロブリンの変動に関する研究はもっぱら濾紙電気泳動による蛋白分画パターンによって行われており、免疫グロブリンの各亜分画を定量した報告は著者のものが、ほとんど初めてといつてよからう¹⁴⁾。

急性肝炎の濾紙電気泳動法による γ -グロブリンの変動に関する従来の報告によると、発黄初期に中等度の上昇をきたし、その増加の程度は肝炎の重症度とほぼ平行するが、経過良好なものは2~3ヵ月で正常に復するとされている¹⁻³⁾。

急性肝炎の発黄の日を第1病日とし、以後1~2週ごとに経過をおって各免疫グロブリンを測定した著者の成績では、個々の症例によって異なっているが、各時期の平均値で抗体曲線を描かせると、 γ -M は第2週に上昇、第4週で一旦正常値まで低下したのち、第6週で上昇する。 γ -G は第2週で上昇傾向を示し、第6週までその上昇を持続する。 γ -A は γ -G よりおくれて第6週より上昇しはじめ第2ヵ月ではさらに高値を示す。しかし経過良好のものは、いずれの免疫グロブリンも2~3ヵ月で正常に復し、経過が遅延し、慢性肝炎に移行するものでは正常より高い値を持続した。

前に述べたごとく、各種肝疾患の免疫グロブリンの変動を検討した報告は著者の発表¹⁴⁾以前にはほとんどみられないが、以後に発表された成績も含め比較すると、Lee¹⁵⁾も発病当初まず γ -M が上昇、ついで急速に低下するが、そのころより γ -G が上昇し相当期間高値を持続すると述べており、著者の成績とはほぼ一致する。しかし、彼の報告の γ -A はごく軽度の上昇を示したのみであった。なお初期の γ -M の上昇は Gliemann ら¹⁶⁾の報告でも強調されている。著者の成績でトランスアミラーゼがほぼ正常化してくる5~6週目に γ -M の上昇するタイプがしばしばみられ、 γ -M の抗体曲線が2峰性を示したのはこのためと思われるが、Logrippe ら¹⁷⁾も発病第1ヵ月後で γ -M がピークに達するグループのあることを指摘している。

しかし、なかには安齊¹⁸⁾のように γ -G, γ -M の変動は必ずしもこのような一定の順序に従わなかったとするものもある。

いつれにしても急性肝炎でみられる上述の如き免疫グロブリンの変動、すなわち発病初期に急激な γ -M の上昇があり、その下行する時期から γ -G の上昇がおこり、一定期間高値をとる現象は、細菌あるいはウイルスの実験的感染症にみられる免疫グロブリンの変動¹⁹⁻²¹⁾に類似しており、ヒトの感染症にみられる変化とも一致している。したがって、急性肝炎でみられる免疫グロブリンの変動は抗ウイルス抗体による可能性が強いと思われる。

急性肝炎の病因についてはウイルス説が有力であるにもかかわらず、肝炎ウイルスの検出にはまだ成功していない。また従来、急性肝炎患者血清のヒツジ赤血球²²⁾、ニワトリ胎仔赤血球²³⁻²⁶⁾、アカゲザル赤血球²⁷⁻²⁹⁾に対する異好抗体、さらに最近の O'connell & Nolan³⁰⁾による肝組織中のアカゲザル赤血球に対する異好抗体の陽性率が、いずれも対照に比べて高いことが報告され、これらはウイルス感染の証拠の一つとされているが、あくまで間接的なものである。

したがって現在広く承認されている肝炎ウイルス抗体の検出法はないが、著者は Bolin らのいわゆるウイルス・ラテックス抗原¹¹⁾を用い、肝疾患における陽性率を検討してみた。

その陽性率は急性肝炎 50 %、慢性肝炎 73 %、肝硬変 64 %であって対照(肝以外の各種疾患)の 36 %に比べて高値を示し、その抗体価は5ないし320倍であった。しかし肝疾患の中では陽性率と既往における急性発症の有無に関係がなく、また肝以外の疾患中腎疾患が 89 %と高い陽性率を示し、急、慢性肝炎の免疫グロブリン値と Bolin 抗体価との間にも相関はみられなかった。

Bolin ら³¹⁾の最近の報告によれば、その陽性率は流行性、血清肝炎はほぼ100 %、健康対照 10~30 %であるが、その出現は一過性で、抗体価は一般に低く、高いもので320倍くらいである。したがって比較的特異的とみられるが、健康対照の陽性率は地域による変動が大きく、なかには 80~90 %のところもある。

以上の成績を説明する理由として、肝以外の各種疾患々者または健康者が肝炎ウイルスを Carrier の形で持っていること、抗原が特異肝炎ウイルスでなく ECHO あるいは adenovirus などを混じていること、培養に用いた組織の抗原に対する抗体が患者血清に含まれていることなどの可能性が考えられるが、いずれにせよ急性肝炎あるいは慢性肝炎で上昇している免疫グロブリンが抗ウイルス抗体によるという証拠は得られなかった。

つぎに、慢性肝炎の血中免疫グロブリンはいずれの亜

分画も急性肝炎に比べて高く、とくに γ -M の上昇は特微的で、肝硬変のそれよりもさらに高値を示した。これらの各免疫グロブリンの値は急性発症の既往を有するものと有しないものである程度の差を認めたが、各群の例数少なく、その意義を明らかにするに至らず、また急性発症からの経過の長短でもとくに有意の差を認めない。

肝硬変の各免疫グロブリンも急性肝炎に比べて高く、とくに γ -G, γ -A で著しい上昇がみられたが、 γ -M は中等度の増加にとどまるものが多かった。 γ -G, γ -A の上昇は Leel¹⁵⁾, Gleichmann ら³²⁾, 平山³³⁾の報告でもみられているが、なかに安齊¹⁸⁾のように γ -G, γ -M の増加が著しく、 γ -A はそれほどでないとするものもある。したがって肝硬変では一般に γ -G と γ -A が著増すると考えてよからう。

従来の濾紙電気泳動法を用いた報告では一般に β から γ にかけて巾広く増大するものが多く、これを β - γ -bridging とよぶものもいるが^{7,8)}、このような所見は β 領域に増加する γ -A によると考えられる。

なお、Lee⁸⁾, Gleichmann³²⁾ の γ -A 上昇をきたした例はほぼ全例がアルコール性肝硬変であり、われわれもアルコールismにみられた肝硬変で γ -A の著明な増加を認めた。したがって、著者の症例の大部分をしめる甲ないし乙型肝炎とアルコール性肝硬変とで免疫グロブリンの変動に差異があるか否かは興味あるところであるが、アルコール性肝硬変の症例がなお少なく、 γ -A の上昇が肝硬変に共通の所見であるのか、アルコール性肝硬変でより高値を示すものなのかを十分に確かめることはできなかった。この点将来の課題であろう。

リウマチ因子が肝疾患で高頻度に認められるという報告は多い^{34,35)}。リウマチ因子は大部分 γ -M に属するといわれているが、最近では γ -G, γ -A に属するものもあるという。いづれにしても肝疾患のリウマチ因子と各免疫グロブリンの相関を検討した報告は少ない。著者の成績ではリウマチ因子の陽性率は急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変の順に高く、とくに肝硬変の陽性率は著しく高値を示した。

またリウマチ因子と、 γ -M の濃度とは慢性肝炎、肝硬変ではある程度、正の相関を示すが、急性肝炎では γ -M が高値を示すにかかわらず、リウマチ因子を認めないものが多くみられた。したがって急性肝炎で増加する γ -M と、慢性肝炎、肝硬変で増加する γ -M はその内容を異にすると考えられるが、その点はあとのべる。

以上のように慢性肝炎、肝硬変では血中免疫グロブリン

値の著しい上昇がみられるが、その機序についてはなおよく判っていない。

まず第1に考えられることは、Good & Page⁹⁾のいうように、長期にわたり肝内に存在し続けるウイルスに対する抗体によるということであるが、著者の成績ではこのような証拠は得られなかった。

第2に肝組織に対する自己免疫によるという可能性も考えられる。著者はヒト正常肝ホモジネートの生理食塩水抽出液を抗原とし、補体結合抗体の検出を試みたが、陽性率、抗体価とも低く、免疫グロブリンとの相関を検討するに至らなかった。肝疾患の抗肝抗体に関する報告は多いが、抗肝抗体と血中免疫グロブリンとの関連をみた報告は少なく、ただ上田ら³⁶⁾は補体結合性抗肝抗体と濾紙電気泳動による γ -グロブリン値の間に有意の相関を認めなかったとしている。

そこで、第3の可能性として慢性肝炎、肝硬変患者では正常に比べ、個体の側の各種抗原刺激に対する反応性の増大が考えられる。

著者は、慢性肝疾患患者に破傷風トキソイドを注射し、抗毒素価の上昇を健康者と比較したのであるが、慢性肝疾患では一般に高値を示す例が多く、平均でも、健康者の 0.055 国際単位/ml に対し、慢性肝疾患では 0.188 国際単位/ml と高く、明らかな差を認めることができた。

ただ、抗原注射前後の免疫グロブリンの変動をみると、注射後とくにその値が上昇するといった傾向はなかったが、免疫グロブリンはあらゆる抗原刺激に対する抗体の集積であるから、単一の抗原刺激に対して生成された抗体が必ずしも免疫グロブリンの総量に影響するとは考えられず、当然のことと思われる。

同様の事実は四塩化炭素ないし黄変米カビによる肝硬変シロネズミにヒツジ赤血球を注射し溶血素価を測定した成績でも認められ、正常群に比べ、明らかに高度の抗体価の上昇がみられた。

これを組織学的所見と比較検討してみると、偽小葉形成、線維化ともに高度な例に比べ、偽小葉形成がほとんどみられないか、ないしは軽度であって、肝線維化のみが著明な群に、より著しい抗体価の上昇を認めた。

したがって肝硬変の完成した段階よりむしろ偽小葉形成に進行しつつある活動期の段階で抗体産生の増強がより高度であるとする成績が得られた。このことはヒトの肝硬変の重篤なものに免疫グロブリンがかえって低く、逆に慢性肝炎に著しく高値を示すものがある事実と対応する所見と考えられる。

以上の成績はヒトおよび動物の慢性肝疾患では抗原刺激に対する反応が増大しており、内因性、外因性の各種抗原刺激に対する抗体産生が過剰に起こり、その集積が血中免疫グロブリンの増大となって現われることを示すものと考えられ、さきに述べた慢性肝疾患にリウマチ因子の頻度が増大しているという所見も、遷延感作でリウマチ因子が高率にみられるという事実と考えあわせれば、興味深い。

最後に実際に慢性肝疾患患者では免疫グロブリン産生が増強しているのか、また増強しているとすればどの臓器で増大しているかという点が問題になる。

黄変米カビによる実験的肝硬変シロネズミの脾上清分画 γ -G への ^{14}C ロイシンのとりこみをみたところ、その値は $339.1 \pm 243 \text{ cpm/mg/2 hrs}$ で正常の $133.5 \pm 21.5 \text{ cpm/mg/2 hrs}$ に比べ約 2.6 倍の増大を示した。このとりこみはヒツジ赤血球による感作後さらに増大している。

また硬変肝における値は $57.4 \pm 14.8 \text{ cpm/mg/2 hrs}$ で正常肝の $33.4 \pm 9.6 \text{ cpm/mg}$ に比べ明らかに増大していた。ヒツジ赤血球による感作後のとりこみは、正常肝ではまったく増加しないのに反し、肝硬変ではさらにある程度の増大を認めた。

なお、個々の肝硬変シロネズミで肝と脾におけるとりこみの関係は正の相関を示している。

したがって慢性肝疾患では免疫グロブリンの産生が増大しており、その産生の増大には脾など肝以外の間葉系組織が重要な役割を果たすと同時に、肝自体これに関与しており、両者は免疫グロブリン産生に際しては平行した態度をとるものと思われる。さらに肝傷害時には僅かな外来性抗原刺激に対して、脾が反応し、抗体産生が一層増大するのは当然のこととして、傷害肝でも軽度ながら同様の反応を示す可能性が考えられる。

肝傷害時の脾上清免疫グロブリンへの標識アミノ酸のとりこみをみた報告はなく、肝自体に関する報告も少ないが、中島³⁷⁾は四塩化炭素傷害シロネズミ肝で、肝上清 γ -グロブリンへの ^{14}C ロイシンのとりこみが著増した 1 例のあることを報告し、平山³⁸⁾は同じく四塩化炭素傷害シロネズミ肝で γ -グロブリン生成の増加した例を *net-production* から認めているが、これらはいずれも精製免疫グロブリンと、これに対する特異抗血清を用いたものではない。平山、福田³⁹⁾は慢性疾患のヒト生検材料を用い特異抗血清によって、肝上清免疫グロブリンへのとりこみをみており、はっきりしたとりこみの増加がみ

られないと報告したが、最近やはりとりこみの増加を確認したと報告している⁴⁰⁾。肝生検による場合、材料が少量なため、とりこみ実験には技術的な困難さが伴い、一定の成績がでにくい場合もあると思われる。

一方、慢性肝炎、肝硬変において肝組織内の免疫グロブリンの局在を蛍光抗体法で確かめた報告は多く⁴¹⁻⁴³⁾、Popper⁴¹⁾はこれが肝内で産生されたものであろうとしている。

以上著者は、慢性肝傷害時、実際に脾、肝における免疫グロブリン産生の増大を確認し、慢性疾患における個体の側の抗体産生能の増大を証明したが、このような抗体産生能の増大が、いかなる理由でおこってくるかはなお不明といわざるを得ない。

総括および結論

1) 肝疾患患者の血中免疫グロブリンの値をみると、 γ -G は急性肝炎で正常上限よりやや高く、肝硬変では著明に増加し、慢性肝炎はその中間にある。 γ -A は急性肝炎では正常範囲、慢性肝炎では正常の上限よりやや高値を示すにすぎないが、肝硬変では著明に増加している。 γ -M は急性肝炎で正常上限よりやや高く、慢性肝炎、肝硬変はより高値を示し、とくに慢性肝炎の高値が目立つ。

2) 急性肝炎で経過を追うと、 γ -M は第 2 週で上昇したのち、一旦正常化し、第 6 週で再び上昇する。 γ -G は第 2 週より上昇して、その値をつづけ、 γ -A は第 6 週で上昇しはじめ 2 ヶ月でさらに高値を示すが、経過良好のものはいつれの免疫グロブリンも 2～3 ヶ月で正常に復した。

3) Bolin 抗原により測定した抗ウイルス抗体は急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変でそれぞれ 50, 73, 64 %の陽性率で肝疾患以外の対照の 36 %に比べ高値を示したが、腎疾患でも 89 %の陽性率を示した。また抗体価と各免疫グロブリン値との間に相関がなかった。

4) リウマチ因子の強さと γ -M 値との相関をみると、慢性肝炎、肝硬変では並行的関係がみられたが、急性肝炎では γ -M が高値を示すにもかかわらずリウマチ因子陰性のものが多かった。

5) 慢性肝炎、肝硬変患者では破傷風沈降トキシイド注射後の抗毒素価の上昇が健常対照に比べて、より高値を示した。

6) 四塩化炭素ならびに黄変米カビ傷害肝硬変シロネズミでは、ヒツジ赤血球注射後の溶血素価の上昇が正常

対照に比べて、より高値を示し、この傾向は偽小葉形成の途上にある活動期のものに、より一層強かった。

7) 黄変米カビ傷害肝硬変シロネズミでは、脾、肝いづれにおいても上清分画 γ -G への¹⁴C ロイシンのとりこみは正常に比べて増大し、抗原刺激によっておのおの、さらに増大を示した。

以上の成績から次のように結論したい。

1) 急性肝炎にみられる血中免疫グロブリンの変動は実験的、臨床的感染症の場合に類似しており、抗ウイルス抗体によるものと思われる。

2) 慢性肝炎、肝硬変にみられる免疫グロブリンの変動は、個体の側の、抗体産生能の増大に由来する可能性が強く、実際に脾、肝における免疫グロブリンの生成が亢進するものと推定される。

稿を終わるに臨み、終始、実際に手を取りご指導下さった吉利内科鈴木秀郎先生に心から感謝の意を表します。さらに恩師吉利和教授、織田敏次助教授のご指導、ご校閲を深謝します。

- 文 献 1) Popper, H., W. B., de la Hueraga, J., Franklin, M., Tsumagari, Y., Reuth, J. I. & Steiger, F. : *Gastroenterology* 17 : 138, 1951. 2) Satoskar, R. S., Lewis, R. A. & Gaitonde, B. B. : *J. Lab. Clin. Med.* 44 : 349, 1954. 3) Havens, W. P. Jr. : *Amer. J. Med.* 32 : 665, 1962. 4) Serling, K. Ricketts, W. E., Kirsner, J. B. & Palmer, W. L. : *J. Clin. Invest.* 28 : 1236, 1949. 5) Jencks, W. P., Smith, E. R. B. & Durrum, E. L. : *Amer. J. Med.* 21 : 387, 1956. 6) Zieve, L. : *Ann. Intern. Med.* 48 : 471, 1954. 7) Sunderman, F. W. Jr. : *Amer. J. Clin. Path.* 42 : 1, 1964. 8) 河合忠 : *臨床病理* 13 : 502, 1965. 9) Good, R. A. & Page, A. R. : *Amer. J. Med.* 29 : 804, 1960. 10) Polley, M. J. & Mollison, P. L. : *Brit. J. Haemat.* 8 : 149, 1962. 11) Bolin, V. S., Alsver, J. B., Barger, J. D. & Jarvis, J. B. : *Transfusion*, 1 : 360, 1961 ; *Transfusion* 3 : 455, 1963. 12) 村田良介ほか : *日細菌誌* 11 : 797, 1956. 13) 村田良介ほか : *日細菌誌* 15 : 1275,

1960. 14) 織田敏次, 鈴木秀郎, 江藤登哉 : *日本臨床* 24 : 34, 1966. 15) Lee, F. L. : *Lancet* II : 1043, 1965. 16) E. Gleichmann, H. Deicher : *Klin. Wschr.* 46 : 171, 1968. 17) Logrippe, G. A., Sharpless, N. S. & Hayashi, H. : *Henry Ford Hosp. Med. Bull.* 14 : 411, 1966. 18) 安斉哲郎 : *肝臓* 8 : 17, 1967. 19) Uhr, J. W. & Finkelstein, M. S. : *J. Exp. Med.* 117 : 457, 1967. 20) Berlin, B. S. : *Immunology.* 93 : 315, 1964. 21) Berlin, B. S. : *Immunology.* 96 : 424, 1965. 22) Eaton, M. D., Murphy, W. D. & Hanford, V. L. : *J. Exp. Med.* 79 : 539, 1944. 23) Havens, W. P. Jr. : *New Engl. J. Med.* 259 : 1202, 1958. 24) Havens, W. P. Jr. : *Arch. Int. Med.* 106 : 327, 1960. 25) Turner, P., Jha, V. N., Crowley, N. & Sherlock, S. : *J. Clin. Path.* 15 : 491, 1962. 26) McCollum, R. W., Bech, V., Isacson, P. & Riordan, J. T. : *Amer. J. Med.* 27 : 703, 1957. 27) Hoyt, R. E. & Mollison, L. M. : *proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 93 : 547, 1956. 28) Mollison, L. M. & Hoyt, R. E. : *J. Lab. Clin. Med.* 49 : 774, 1957. 29) Jennings, E. R. & Hindmarch, C. : *J. Lab. Clin. Med.* 55 : 519, 1960. 30) O'Connell, C. J. & Nolan, J. P. : *J. Lab. Clin. Med.* 67 : 994, 1966. 31) Bolin, V. S., Chase, B. S. & Alsver, J. B. : *Amer. J. Clin. Path.* 635 : 49, 1968. 32) E. Gleichmann & H. Deicher : *Klin. Wschr.* 46 : 793, 1968. 33) 平山千里 : *化学療法* 50 : 10, 1967. 34) Dresner, E. & Trombly, P. : *New Engl. J. Med.* 261 : 981, 1959. 35) 延永正 : *九大研紀要* 15 : 102, 1962. 36) 上田英雄ほか : *最新医学* 17 : 2636, 1962. 37) 中島明 : *日消会誌* 56 : 475, 1959. 38) 平山千里ほか : *生化学* 30 : 1049, 1959. 39) 平山千里, 福田勉 : *第 54 回日消会シンポ* 1968. 40) 平山千里ほか : *第 55 回日消会示説*, 1969. 41) Popper, H. : *肝臓* 3 : 78, 1961. 42) Popper, H. : *Aktuelle Problem der Hepatologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1962. 43) 森亘ほか : *肝臓* 8 : 10, 1967.