《原 著》

肝疾患患者末梢血リンパ球培養法による細胞性抗体に関する研究*

梶 原 光 令*

肝疾患の進行、慢性化に果たす自己免疫機転の役割に関して、多くの研究¹⁻⁴⁾があるにもかかわらず、現在なお疑問点が多い。その最大の理由は、病因性に乏しい流血抗体がもっぱら検出され、組織破壊作用があると考えられている遅延型免疫を肝疾患において検出する方法が、最近まで確立されていなかったためである。

1960年 Nowell⁵⁾により、マメ科科植物 *Phaseolus vulgaris* より抽出された *Phytohaemagglutinin* (PHA) が *in vitro* のリンパ球培養で *blastoid transformation* を起こすことが発見された。さらにツベルクリン反応陽性者の末梢血リンパ球を *in vitro* で培養し、その培地にツベルクリン精製蛋白を加えると、PHA 添加時と類似の芽球形成を示すことがわかり⁶⁻¹⁰⁾、これらの発見が端緒となって、リンパ球の有する細胞性抗体を検索する一つの手がかりが提供されることとなった。このリンパ球の幼若化現象を利用し、1967年 Schaffner ら¹¹⁾は、肝疾患患者末梢血リンパ球に肝抗原を添加して、リンパ球の幼若化を観察し、肝疾患における細胞性抗体の存在を検索しようと試み、現在まで数名の研究者¹²⁻¹⁶⁾によって同様の試みが報告されてきた。しかし現段階ではまだ症例数が少なく、このリンパ球反応が肝疾患の肝内で起こっている遅延型免疫反応をそのまま反映しているかどうかは、まだ確実ではない。そこで著者は、自己および同種肝抗原を培地に添加して、リンパ球培養を行い、その細胞性抗体を検索するとともに、抗肝抗体陽性あるいは陰性の自己血清と補体を前もって同種肝抗原に作用させて添加して、培養リンパ球の反応を観察し、その相互関係、および各種の流血抗体・肝内リンパ球浸潤との関係を検索し、若干の知見を得たので報告する。

対 象

金沢大学第1内科に入院した肝疾患患者と対照例 45

* 要旨は、昭和 45 年 11 月、日本内科学会東海・北陸合同地方シンポジウムで、一部は、昭和 44 年 7 月、第 5 回日本肝臓学会総会で発表。

**M. kajihara: 金沢大学医学研究科 (第1内科・医動物学)。

例について、肝組織、末梢血リンパ球、血清の 3 者をほとんど同時に採取し、材料とした。

肝抗原の作製

I. リンパ球培養に使用する肝抗原

1) 自己肝抗原: Vim Silverman 針で採取した約 1 mg の生検肝に滅菌生食水 0.1 ml を加え、無菌的に磨砕した。

2) 他人肝抗原: 無菌的操作で採取した新鮮なヒト剖検正常肝を滅菌生食水で磨砕し、肝 1 mg に生食水 0.05 ml となるように調整した。

II. 流血抗体検索に使用する肝抗原

1) 可溶性ヒト肝抗原: 新鮮なヒト剖検正常肝粥から、Sleeman の方法¹⁷⁾に従い調整した。105,000 g 上清のエタノール沈澱物を pH 7.3 0.15 M ベロナールバッファー生食水 (VBS) に溶解し、0.25 mg/ml の蛋白濃度とした。

2) 不溶性ヒト肝抗原: 同一肝粥を Smith らの方法¹⁸⁾に従って、0.16 M 塩化カリウムを主成分とする溶液 I で磨砕し、48,000 g 沈澱をとり、1 M 塩化カリウムを主成分とする溶液 II で再磨砕し、その 1,100 g と 48,000 g 沈澱を 0.4% Deoxycholic acid に融解し、さらにその 105,000 g 上清を VBS で透析し、0.36 mg/ml の蛋白濃度とした。

3) ヒト肝粥の超遠心分画: Asherson, Dumond の方法¹⁹⁾に従い、ヒト正常剖検肝より、ミトコンドリア分画、マイクロゾーム分画、105,000 g 上清を採取し、それぞれを VBS で透析して、0.24 mg/ml の蛋白濃度とした。

実験方法

I. 細胞性抗原検査

1) リンパ球培養法: Hirschhorn ら²⁰⁾の方法に準じて、患者末梢血 20 ml を heparin 採血して、30° 傾斜した密栓試験管内に 37°C 1~2 時間静置して、その上清の $\frac{3}{4}$ (lymphocyte rich plasma) を静かに採取した。

この上清に同量の pH 7.2, TC Medium 199 (Difco 製) を 37°C に加温して加え、これを角型培養びんの平盤面に静置 (37°C 1 時間) して、多核白血球を平盤面に吸着させた。この上清 (95~98% 小型リンパ球) を静かに採取し、150~200 g 5 分間遠心し、沈渣 (リンパ球) を 37°C に加温した 10 ml の Hanks 液²¹⁾ で 3 回洗浄し、150~200 g 5 分間遠心して、沈渣 (リンパ球) を採取した。このリンパ球を 37°C に加温した培養液でリンパ球数 100 万/ml に調整し、スクリュウキャップ付培養びんに 2 ml ずつ分注して、抗原を加え、37°C 45° 傾斜、静置培養した。

2) 培養液調整法: Difco 製 TC Medium 199 を 1.4 % NaHCO₃ で pH 7.2 に調整して、20% の割に小牛血清 (千葉血清研究所製) を加え、1 ml 当たり Penicillin G (武田薬品工業) 100 単位、Streptomycin (武田薬品工業) 100 µg を加えた。

3) 添加抗原: 下記量の抗原をそれぞれ 1 培養当たり添加到した。

a) PHA: 同一ロット番号の Phytohaemagglutinin-M (Difco 製) を 0.04 ml 添加した。

b) 自己肝: 前記生検自己肝粥を 0.04 ml 添加した。

c) 他人肝: 前記剖検肝粥を滅菌生食水で 2 倍希釈して 0.04 ml 添加した。

d) 他人肝+自己血清+補体: 未希釈の前記剖検肝粥 0.02 ml に、56°C 30 分間非働化した自己血清 0.01 ml と補体として生食水で 3 倍希釈したモルモット血清 0.01 ml を加え、4°C 一晚放置して添加した。

e) 自己血清+補体: 前記量の自己血清と補体を滅菌生食水で 2 倍希釈して添加した。

f) 無添加: 上記添加抗原の代わりに、同容量 (0.04 ml) の滅菌生食水を添加した。

4) 培養リンパ球の芽球形成率測定法: 培養時間は、PHA 添加で 72 時間、肝抗原添加で 120 時間とし、収穫に際し、培養液を十分攪拌し、その一部 (0.5 ml) をとった。これを 150 g 5 分間遠心して、沈渣を Carnoy 固定液 (methanol 3 + 氷酢酸 1) に浮遊し、7 分間固定したのち、50 g 5 分間遠心して、沈渣の 1 滴をスライドガラス上に滴下し風乾した。これに 0.5% の割に orcein を含む 45% 酢酸を滴下し封入して、リンパ球 1,000 個を数え、芽球形成率を求めた。

5) 培養リンパ球 DNA 合成測定法: Shtucher ら²²⁾ の方法に準じて、収穫 24 時間前に、1 培養当たり 0.06 µCi の thymidine-2-¹⁴C (第 1 化学製) を加え、収穫時

に十分攪拌して芽球形成率測定用の一部を取り、残りを 370 g 15 分間遠心した。その沈渣を 4°C 生食水で 3 回洗浄して、沈渣を dry ice acrtone および 37°C water bath で 10 回凍結、融解を繰り返し、細胞を破壊した。これに 15% Trichloroacetic acid (TCA) 2 ml を加え suspend して、4°C 12 時間放置し、蛋白、DNA を凝集させた。これを 1,600 g 10 分間遠心し、沈渣を 4°C TCA で一度洗浄して再遠心、沈渣を水流吸引ポンプで Whatman 製 glass fiber paper (GF/C) に吸着させ、最後に 100% methanol を滴下して洗浄した。これを赤外線ランプで十分乾燥させたのち、toluene 500 ml に Beckman 製 2,5-Diphenyloxazole (PPO) 2.5 g を加えた溶液 10 ml のはいった測定用チューブに入れ、Beckman LS 200 B 液体シンチレーションカウンターで 5 分間 thymidine-2-¹⁴C のとり込みを測定した。この際 back ground として、未処置の glass fiber paper を PPO-toluene に浸し、カウントを測定して、この back ground をし差引いた値を thymidine uptake 値とした。

II. 流血抗体の検索

1) 補体結合反応 (CFT): 非働化血清を 4 単位のモルモット補体で、50% 法²³⁾ に従い反応を行い、完全な溶血阻止でもって陽性とした。

2) タンニン酸処理羊赤血球凝集反応 (TRAT): passive haemoagglutination の Stavitsky 変法²⁴⁾ で行った。

3) 螢光抗体法: Behring Werke 製の螢光標識抗血清 (IgG, IgM, IgA 抗血清) を 5 倍希釈し、使用直前にマウス肝粉末で吸収したものをを用い、ラット諸臓器クリオスタット切片、およびラット胸腺 smear により、間接法で抗胃粘膜壁細胞質因子、抗平滑筋因子、抗顎下腺因子、抗甲状腺因子、抗核因子などを検索した。なおそれぞれの染色では、対照として blocking test を行った。

結 果

I. PHA 添加リンパ球培養

患者末梢血リンパ球に PHA-M を添加して培養すると、図 1 のように、正常人、慢性肝炎、肝硬変ともに、培養 1 日目から blastoid transformation が起こり、ほぼ培養 72 時間で芽球形成率は最高値に達し、thymidine uptake もほぼ芽球形成率に比例している。慢性肝炎・肝硬変は、正常人に比べ、やや芽球形成率の上昇カーブでゆるやかである。

図1. *in vitro* PHA-M 添加リンパ球培養における blastoid transformation と培養時間

図2. *in vitro* リンパ球培養における PHA-M 添加による blastoid transformation

図2は PHA によるリンパ球の芽球形成率が最高となる培養 72 時間目の成績を示し、正常人では、培養リンパ球の 62~90% が芽球様細胞(図3)に変形していた。また急性肝炎、亜急性肝炎、慢性肝炎活動型、慢性肝炎非活動型、肝硬変、脂肪肝炎などの通常の肝疾患でも、ほぼ正常人と同様の反応を示し、58~93% の芽球形成率であった。しかし、ルポイド肝炎と一次性胆汁性肝硬変(PBC)および PBC 類似の免疫反応と組織像を呈した薬剤性肝炎の3例では、PHA 反応の抑制がみられ、15~43% の芽球形成率にとどまっていた。矢印は2回目、3回目の培養成績を示し、正常人の芽球形成率に接近している。このように PHA 反応の抑制が認められた3症例の流血抗体の推移を検索してみると、表1のごとくで

図3. 芽球様細胞

図4. *in vitro* PHA-M 添加リンパ球培養における blastoid transformation と培養時間

ある。ルポイド肝炎では芽球形成率が 20.3% と著明な PHA 反応の抑制が認められた時点では、抗肝抗体が陽性であり、芽球形成率 42.6% とかなり改善された第2回目培養時には、抗肝抗体が陰性化していた。PBC においても、芽球形成率 16.7% と著明な抑制がみられた第1回目培養時(第2回目生検時)では、高力価の抗ミトコンドリア抗体を認め、芽球形成率 43.0% とかなり改善された時期(第3回目採血時)でも抗ミトコンドリア抗体は陽性であったが、芽球形成率 60.7% とほぼ改善された時期(第4回目採血時)では、抗ミトコンドリア抗体も陰性化していた。同様に PBC 類似の薬剤性肝炎でも、PHA 反応の抑制された時期には、抗ミトコンドリア抗体が陽性であるが、PHA 反応が改善された時期には、抗ミトコンドリア抗体も陰性化していた。これら患者の臨床症状もほぼ抗肝抗体の消長に一致し、したがって臨床症状の寛解に伴い PHA 反応も改善されていた。

表 1. PHA 反応抑制症例の流血抗体

		ルポイド肝炎		P B C				薬剤性肝炎 (疑似 PBC)		
		第培 1 養 回 目 時	第培 2 養 回 目 時	第生 1 検 回 目 時	第生 2 検 回 目 時	第探 3 血 回 目 時	第探 4 血 回 目 時	第生 1 検 回 目 時	第生 2 検 回 目 時	第生 3 検 回 目 時
補 体 結 合 反 応	ミトコンドリア	0	0	80	40	20	0	0	0	0
	マイクロゾーム	0	0					0	0	0
	105.000 g 上清	40	0	20	20	20		0	0	0
タ 赤 血 球 凝 集 反 應	ミトコンドリア	0	0	8×10 ⁶	0	1×10 ⁵		2×10 ⁵	0	0
	マイクロゾーム	0	0	16	0			0	0	0
	105.000 g 上清	0	0	512	0	32		0	0	0

さらにこの抑制現象を追求するため、培養開始後経時的に芽球形成率と thymidine uptake を測定すると、図 4 のごとく、ルポイド肝炎、PBC、PBC 類似の薬剤性肝炎の 3 例では、芽球形成率、thymidine uptake とともに培養 48 時間目で最高となり、ほぼ正常人の培養 78 時間目の値に等しかった。さらに PBC 類似の薬剤性肝炎では、免疫状態、臨床症状の改善に伴い、芽球形成率、thymidine uptake のピークが 48 時間目より 72 時間目に移行し、正常人とはほぼ同様の pattern にもどっていた。

II. 肝抗原添加リンパ球培養

肝疾患における遅延型免疫の関与を知るため、患者末梢血リンパ球培養時に、抗原として PHA の代わりに自己肝粥、他人肝粥、他人肝+自己血清+補体の 3 種の抗原を添加し、それぞれの芽球形成率、thymidine uptake を検索した結果が表 2 である。自己肝粥および他人肝粥添加培養に対する control として、無添加培養を行い、他人肝+自己血清+補体添加培養に対する control として、自己血清+補体添加培養を行った。両 control 培養の間には、芽球形成率、thymidine uptake とともにほとんど差は認められず、自己血清と補体のみでは、培養リンパ球に対する刺激作用は認められなかった。なお表 2 に示す control 培養の成績は、無添加培養と自己血清+補体添加培養を行って、この両者の間に多少とも芽球形成率、thymidine uptake に差が認められた場合は、その高値を control 成績として示した。また肝抗原添加培養時の thymidine uptake は、control 培養の thymidine uptake で割り、thymidine uptake 増加率で示した。

1) 自己肝添加培養

自己肝添加培養において第 1 の問題は、正常人対照として、正常人のリンパ球と同時に、そのヒトの肝を得ることが困難なことにある。著者の実験でも、このため多少の脂肪浸潤を有す症例も含めて、正常人培養例は 4 例にすぎない。そのうち 3 例は、無添加 control 培養に比べ、自己肝添加培養時の芽球形成率、thymidine uptake とともに、ほとんど差は認められなかった。しかし 1 例で自己肝添加培養の thymidine uptake が無添加 control 培養に比べ 1.7 倍となっていた。そこで著者は自己肝添加培養で芽球形成率、thymidine uptake とともに、control 培養時の 2.5 倍以上となったものを自己肝添加による培養リンパ球反応が陽性であると判定してみた。なお他人肝および他人肝+自己血清+補体添加においても、培養リンパ球反応陽性の criteria として、芽球形成率、thymidine uptake とともに control 培養の 2.5 倍以上とした。

この criteria を適応すると、自己肝添加培養では、36 例中 9 例、すなわちルポイド肝炎、PBC、PBC 類似の薬剤性肝炎と肝硬変、慢性肝炎の一部、亜急性肝炎の 1 例が培養リンパ球反応陽性であった。このうち最高芽球形成率は、亜急性肝炎の 8.2% であり、最高 thymidine uptake 増加率は、慢性肝炎非活動型の 7.4 倍であった。

2) 他人肝添加培養

同様の criteria を適応すると、他人肝添加培養リンパ球反応の陽性例は、31 例中 4 例であり、自己肝添加培養に比べ、やや陽性率が低く、PBC、PBC 類似の薬剤性肝炎と肝硬変、慢性肝炎活動型の 1 例のみが陽性であり、

表 2. (その1) *in vitro* 培養リンパ球の芽球形成率と thymidine 摂取増加率

	芽球形成率(%)	自己肝添加培養		他人肝添加培養		他人肝+自己血清+補体添加培養	
		芽球形成率(%)	チミジン摂取増加率(倍)	芽球形成率(%)	チミジン摂取増加率(倍)	芽球形成率(%)	チミジン摂取増加率(倍)
急性肝炎	0.4	0.4	1.0	0.3	0.9		
亜急性肝炎	1.4	8.2	4.5	1.9	1.3	2.3	1.3
慢性肝炎活動型	症例 1	0.4	1.5	2.1	0.4	1.0	2.4
	2	0.9	0.4	0.7			
	3	0.7	2.4	1.9	0.4	0.7	3.2
	4	1.2	1.3				
	5	0.2				0.1	1.0
	6	0.2	1.8	5.3	0.2	1.1	1.2
	7	1.6	3.0	1.5			5.7
	8	0.4	0.9	2.4			
	9	1.6	0.9	0.7			
	10	1.2	6.4	5.9	0.1	0.1	
	11	1.1			0.8	0.6	
	12	1.7	1.5	0.8	1.5	0.8	
	13	0.4	0.4	1.0	0.3	1.0	
	14	0.5	0.3	1.0	1.0	2.0	
	15	0.3	0.5	1.0	0.2	0.8	
	16	0.3	0.7	1.9	0.9	2.9	
	17	0.6	6.5	3.7			
	18	1.0	1.3	1.1	0.5	0.7	
慢性肝炎活動型	症例 1	0.2	0.8	7.4			
	2	0.2	0.3	1.1	0.2	0.7	0.4
	3	0.6	0.7	1.4			

その最高芽球形成率, 最高 thymidine uptake 増加率も自己肝添加培養に比べ低く, PBC 類似の薬剤性肝炎の芽球形成率, 4.6%, thymidine uptake 増加率 4.5 倍が最高であった。またこの培養では, control 培養に比べ, 芽球形成率, thymidine uptake とともに, かえって低い症例が多く, ルポイド肝炎でさえ control 培養に比べ低値を示していた。

3) 他人肝+自己血清+補体添加培養

他人肝粥に前もって自己血清と補体を作用させて, その混合物を添加した培養では, 23 例中 7 例が著者の criteria で陽性であった。すなわち, PBC, PBC 類似の

表 2. (その2) *in vitro* 培養リンパ球の芽球形成率と thymidine 摂取増加率

	芽球形成率(%)	自己肝添加培養		他人肝添加培養		他人肝+自己血清+補体添加培養	
		芽球形成率(%)	チミジン摂取増加率(倍)	芽球形成率(%)	チミジン摂取増加率(倍)	芽球形成率(%)	チミジン摂取増加率(倍)
慢性肝炎活動型	症例 1	4.1	2.2%		0.1%		0.4%
	2	50.7	0.2%	0.5倍	0.3	0.5倍	
	3	64.8	0.3	0.1	0.4	0.1	
慢性肝炎活動型	症例 1	1.9	0.7	0.6	0.8	0.6	1.4
	2	22.4	4.2	1.2	0.6		2.4
	3	30.6		0.6	0.6	1.0	1.2
	4	40.4		0.6	1.6	0.4	0.9
	5	50.6	0.9	1.4	1.4	1.8	1.4
	6	62.4	5.4	2.5			8.1
	7	73.1			5.8	1.9	1.4
	8	81.0			2.6	2.5	2.7
	9	90.3					0.9
	10	101.0	1.9	2.0			
	11	112.4	0.5	0.4	0.9	0.6	
ルポイド肝炎		1.6	7.1	6.0	0.3	0.9	1.3
PBC		1.4	6.4	3.1	3.2	3.5	6.5
薬剤性肝炎		1.0	3.4	2.7	4.6	4.5	5.0
正常人	症例 1	1.2	0.9	1.0	0.5	0.7	1.0
	2	22.0	2.4	1.1	2.3	1.2	1.8
	3	30.3	0.4	1.0			
	4	40.0	0.2	1.7			
5		51.4			0.8		1.5

薬剤性肝炎と肝硬変, 慢性肝炎活動型の一部が陽性で, その最高芽球形成率は肝硬変の 8.2%, 最高 thymidine uptake 増加率は PBC 類似の薬剤性肝炎の 5.4 倍であり, 他人肝単独添加培養に比べ, 陽性率, 最高芽球形成率, 最高 thymidine uptake 増加率はともに高値を示し, むしろ自己肝添加培養に近い値を示した。

図 5 は, これら 3 種の肝抗原添加培養時の培養リンパ球反応陽性率を疾患別にまとめたグラフである。

4) 三種肝抗原添加培養リンパ球反応の相互関係

自己肝, 他人肝, 他人肝+自己血清+補体の 3 種の肝抗原を添加して, その培養リンパ球反応の相互関係を示

図 5. 添加抗原と培養リンパ球反応

表 3. 3 種肝抗原添加培養リンパ球反応の相互関係

	他人肝添加培養			他人肝+自己血清+補体添加培養			他人肝+自己血清+補体添加培養	
	陰性	陽性		陰性	陽性		陰性	陽性
自己肝添加培養	陰性	陽性	自己肝添加培養	陰性	陽性	他人肝添加培養	陰性	陽性
	17例	1例		8例	1例		14例	2例
	4例	2例		1例	3例			3例

したもののが表3である。採血量の関係から、3種の肝抗原をすべての症例で添加することができず、症例数が少ないが、一応相互の関係をみると、他人肝添加で反応する症例は、1例を除き自己肝添加でも反応し、自己肝と他人肝+自己血清+補体添加とは、ほぼ同様の反応を示し、他人肝単独添加で反応する症例は、すべて他人肝+自己血清+補体添加でも反応していた。

図 6. 抗胃粘膜壁細胞質因子

図 7. 抗平滑筋因子

III. 細胞性抗体と流血抗体の相互関係

リンパ球培養施行症例の培養時血清を用い、CFT 抗ミトコンドリア抗体（以下 CFT 抗ミト抗体）および蛍光抗体法による各抗体を検索し、蛍光抗体法では血清希釈 10 倍以上を陽性とした成績が表4に示してある。被検例 45 例中、CFT 抗ミト抗体は 11 例、抗胃粘膜壁細胞質因子（図6）は 22 例、抗平滑筋因子（図7）は 3 例、抗核因子は 6 例が陽性であり、抗甲状腺因子は全例陰性であった。これらの流血抗体の疾患別陽性率を示したグラフが図8である。

まず CFT 抗ミト抗体と培養リンパ球反応を比較してみると、表5のように、自己肝添加では、CFT 抗ミト抗体陽性例 10 例中 5 例、CFT 抗ミト抗体陰性例 28 例中 4 例が培養リンパ球反応陽性であり、他人肝添加では、CFT 抗ミト抗体陽性例 7 例中 3 例、CFT 抗ミト抗体陰性例 24 例中 1 例、他人肝+自己血清+補体添加では、CFT 抗ミト抗体陽性例 9 例中 6 例、CFT 抗ミト抗体陰性例 14 例中 1 例が培養リンパ球反応陽性で、いずれの肝抗原添加培養でも、CFT 抗ミト抗体陽性例

表 4. (その1) リンパ球培養症例の流血抗体と肝内リンパ球集簇

	補抗 ミト コン ドリア 性抗体	螢 光 抗 体				肝内リン パ球集 簇
		抗壁 細胞 質 膜 因子	抗平 滑筋 因子	抗 核 因 子	抗甲 状腺 因子	
急性肝炎	0	-	-	-	-	+
亜急性肝炎	×5	+	-	-	-	+
慢性 肝 炎 活 動 型	症例 1	0	+	-	-	-
	2	0	-	-	-	-
	3	×5	+	-	-	-
	4	×5	-	+	-	-
	5	0	-	-	-	-
	6	×5	+	-	-	+
	7	0	-	-	-	-
	8	0	+	-	-	-
	9	0	+	-	-	+
	10	0	-	-	-	-
	11	0	-	-	+	-
	12	0	+	+	-	-
	13	0	+	-	-	+
	14	0	+	-	-	-
	15	0	+	-	-	+
	16	×20	+	-	-	+
	17	×10	+	-	-	+
	18	0	+	-	-	+
慢性 非活動 型肝炎	症例 1	0	-	-	-	+
	2	0	-	-	-	+
	3	×5	+	-	-	-

注：肝内リンパ球集簇の(+)は肝細胞性集簇群を
(+)は非肝細胞性集簇群，(-)は無集簇群を示す。

に培養リンパ球反応陽性例が多い傾向がみられた。しかし CFT 抗ミト抗体陰性例にも、少数ながら培養リンパ球反応陽性例があり、培養リンパ球反応と CFT 抗ミト抗体の間に明らかな関係があるとはいえなかった。ただ PBC 類似の薬剤性肝炎は、CFT 抗ミト抗体は陰性であったが、TRAT 抗ミト抗体が強陽性であったことを考えると、抗ミト抗体陰性例で培養リンパ球反応陽性例は、自己肝添加培養群の3例にすぎなかった。

次に螢光抗体法による各抗体と培養リンパ球反応を比較してみると、表6のように、両者の間に明らかな関係は認められなかった。

表 4. (その2) リンパ球培養症例の流血抗体と肝内リンパ球集簇

	補抗 ミト コン ドリア 性抗体	螢 光 抗 体				肝内リン パ球集 簇
		抗壁 細胞 質 膜 因子	抗平 滑筋 因子	抗 核 因 子	抗甲 状腺 因子	
慢性 非活動 型肝炎	症例 4	0	-	-	-	-
	5	0	-	-	-	-
	6	0	+	-	-	-
肝 硬 変	症例 1	0	-	-	-	+
	2	0	-	-	-	+
	3	0	-	-	-	+
	4	0	+	-	-	-
	5	0	-	-	-	-
	6	×10	-	-	-	-
	7	0	+	-	+	-
	8	×40	-	-	-	+
	9	×10	-	-	-	+
	10	0	+	-	-	+
	11	0	-	-	-	-
ルポイド肝炎	0	+	-	+	-	-
PBC	×40	+	+	+	-	+
薬剤性肝炎	0	+	-	+	-	-
正 常 人	症例 1	0	+	-	-	-
	2	0	-	-	-	-
	3	0	-	-	-	-
	4	0	-	-	-	-
	5	0	-	-	-	-

IV. リンパ球反応と生検肝内リンパ球との関係

リンパ球培養施行症例の生検肝組織像を、肝内のリンパ球の集簇によって、肝細胞性集簇群、非肝細胞性集簇群、無集簇群の3群に分けると、表4のように、肝細胞性集簇群の3例、非肝細胞性集簇群14例、無集簇群28例であった。

これら3群の培養リンパ球反応を比較すると、表7のごとく、自己肝添加培養症例では、肝細胞性集簇群3例に培養リンパ球反応陽性例がなく、非肝細胞性集簇群12例中5例、無集簇群21例中4例が培養リンパ球反応陽性であった。他人肝添加培養では、同様に肝細胞性集簇群2例に培養リンパ球反応陽性例がなく、非肝細胞性集簇群11例中3例、無集簇群18例中1例が培養リンパ球反応陽性で、他人肝+自己血清+補体添加培養でも、肝細胞性

図 8. リンパ球培養症例の流血抗体

表 5. 培養リンパ球反応と抗肝抗体

添加抗原 リンパ球 反応	自己肝粥		他人肝粥		他人肝+自己血清+補 体		
	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	
抗肝抗体							
補抗ミトコンドリア抗体 結合性	陰性	24例	4例	23例	1例	13例	1例
	陽性	5例	5例	4例	3例	3例	6例

集簇群 1 例は培養リンパ球反応陰性で、非肝細胞性集簇群 7 例中 3 例、無集簇群 15 例中 4 例が培養リンパ球反応陽性であった。すなわち 3 種の肝抗原添加培養においては、ともに肝内にリンパ球集簇を認めない症例より、認める症例にやや培養リンパ球反応の陽性率が高い傾向がみられ、自己肝添加例でリンパ球集簇群 15 例中 5 例 (33.3%)、無集簇群 21 例中 4 例 (19.0%)、他人肝添加例でリンパ球集簇群 13 例中 3 例 (23.1%)、無集簇

表 6. 培養リンパ球反応と蛍光抗体

蛍光抗体	培養法	リンパ球反応陽性		リンパ球反応陰性		計
		陽性	陰性	陽性	陰性	
抗壁細胞質因子	自己肝添加	6	3	14	13	36
	他人肝添加	3	1	14	13	31
	他人肝+自己血清+補体添加	4	3	6	10	23
抗平滑筋因子	自己肝添加	1	8	2	25	36
	他人肝添加	1	3	1	26	31
	他人肝+自己血清+補体添加	1	6	0	16	23
抗核因子	自己肝添加	3	6	1	26	36
	他人肝添加	2	2	3	24	31
	他人肝+自己血清+補体添加	2	5	2	14	23

表 7. 培養リンパ球反応と肝内リンパ球

		自己肝添加培養		他人肝添加培養		他人肝+自己血清+補体添加培養	
		陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性
肝内リンパ球	肝細胞性集簇群	3例		2例		1例	
	非肝細胞性集簇群	7例	5例	8例	3例	4例	3例
	無集簇群	17例	4例	17例	1例	11例	4例

群 18 例中 1 例 (5.6%)、他人肝+自己血清+補体添加例でリンパ球集簇群 8 例中 3 例 (37.5%)、無集簇群 15 例中 4 例 (26.5%) が培養リンパ球反応陽性であり、いずれもリンパ球集簇群の培養リンパ球反応陽性率が高値を示した。しかし肝細胞性集簇群に培養リンパ球反応陽性例がないので、肝内リンパ球形成との間には関係がなかった。

V. 肝内リンパ球と抗肝抗体の関係

次に従来、主として検索されていた流血抗体と肝内リンパ球との関係を検索してみた。

表 8 は、ルポイド肝炎、PBC を除く各種の肝疾患 152 例と、対照として、膠原病 12 例 (SLE 8 例、鞏

表 8. 補体結合性抗肝抗体の出現率

	被 検 例	陽 性 例
急 性 肝 炎	20例	4例 20%
慢性肝炎活動型	45	20 44
慢性肝炎非活動型	38	15 39
肝 硬 変	49	30 61
膠 原 病	12	1 8
正 常 人	25	0 0

表 9. リンパ母細胞形成肝と補体結合性抗肝抗体

	例 数	抗体陽性例
慢性肝炎活動型	7	2 28%
慢性肝炎非活動型	8	5 63
肝 硬 変	12	8 65
計	27	16 52%

皮症2例, リウマチ様関節炎2例), 正常人25例の血清について, 可溶性および不溶性肝抗原を用い, CFT 抗肝抗体を検索して, そのいずれか一つ, または二つとも陽性の血清を陽性と判定した結果を示している. CFT 抗肝抗体は, 肝硬変の 61% を筆頭に, 慢性肝炎活動型 44%, 慢性肝炎非活動型 39%, 急性肝炎 20% の割に認められ, 肝疾患の慢性化と重症度に比例して陽性率が高いという結果を得た. また対照例では, SLE の1例のみが陽性で, 正常人は全例陰性であった. 次にこれらの症例のうち, 肝内にリンパ母細胞の存在する症例の CFT 抗肝抗体陽性率を示したのが表9である. 肝硬変の 65%, 慢性肝炎活動型の 28%, 慢性肝炎非活動型の 63% が CFT 抗肝抗体陽性であり, 全症例に比較して, 必ずしもリンパ母細胞形成肝に抗肝抗体陽性率が高いとはいえず, 細胞性抗体と同様に, 流血抗体も肝内リンパ母細胞形成との間に明らかな関係は認められなかった.

VI. 肝疾患の経過とリンパ球反応

本研究でリンパ球反応の経過を追求めた症例は, PBC 類似の薬剤性肝炎の1例にすぎないが, この症例では, 表10のように, 第1回目培養時は, 自己肝添加による培養リンパ球反応は陽性であったが, 2回目, 3回目の培養時には, 培養リンパ球は自己肝添加によって, ごく軽度に応答する傾向が認められたが, 著者の criteria では, 培養リンパ球反応陰性であった. これを表1の流血抗体の経過と比較してみると, TRAT で高力

表10. PBC 類似薬剤性肝炎における培養リンパ球反応の経過

	芽球形成率 (%)	自己肝添加培養	
		芽球形成率 (%)	増加率 (倍)
第1回生検時	1.0	3.4	2.7
第2回生検時	0.7	1.7	
第3回生検時	0.7	1.5	1.8

価の抗ミト抗体を認めた時期には, 自己肝添加培養リンパ球反応も陽性で, TRAT 抗ミト抗体の陰性化した時期には, 培養リンパ球反応も陰性化しており, また臨床的にも寛解した時期であった.

考 案

肝疾患の経過中に種々の免疫学的異常反応を伴うことがしばしば認められ, 肝疾患の進行, 慢性化に果たす自己免疫の役割について多く論じられているが³¹⁻⁴⁾, その病因性については, 現在なお多くの疑問点が存在する.

従来肝免疫検索の主対象となった流血抗体には, いわゆる抗肝抗体^{25,26)}をはじめとして, リウマチ因子²⁷⁾, 抗核因子²⁸⁾, 抗胃粘膜壁細胞質因子²⁹⁾, 抗平滑筋因子³⁰⁾, 抗細胆管因子³¹⁾, 抗胆毛細管因子³²⁾, 抗甲状腺因子³³⁾などの種々の抗体が報告されているが, いずれの抗体でもその病因性に関しては否定的であり, むしろ随伴的色彩が強い. 著者は正常人剖検肝より得た可溶性・不溶性肝抗原を用い, 肝疾患別に CFT 抗肝抗体の出現率を検索してみたところ, 抗肝抗体は, 肝疾患のかんりの率に認められ, ほぼ Gajdusek ら³⁴⁾の成績に一致して, 肝疾患の慢性化と重症度に比例して陽性率が高く, 肝疾患の進行, 慢性化と抗肝抗体がなんらかのつながりをもつことが推察された. しかし, すでに著者らが発表したごとく^{35,36)}, 自己肝に対する抗肝抗体の陽性率は意外に低いこと, さらに同種肝に対する抗肝抗体は異種肝に対してもよく反応すること, 病状や肝病変の活性と抗肝抗体とはほとんど平行しないことなどから, 抗肝抗体の存在を慢性肝疾患の病因に結びつけて取り上げることは困難である. したがって, もし肝疾患 (たとえ一部の肝疾患であっても) の病因として自己免疫を考慮するならば, 流

血抗体よりむしろ細胞性抗体の検索に重点が注がれねばならないという見解が、かなり早くから打ち出されていた。そして、問題はその方法にあった。

1960年 Nowell³⁷⁾ がヒト末梢血培養時に 幼若な特徴をもつ芽球様の細胞が出現することを発見し、これは白血球分離のため用いた PHA の作用によることを明らかにした⁵⁾。これ以来、PHA 添加白血球培養で小型リンパ球が幼若化することが広く確認され^{38~42)}、細胞性抗体検索の手がかりが提供された。さらにツベルクリン反応陽性者の末梢血リンパ球にツベルクリン精製蛋白を加えて培養すると、リンパ球がリンパ芽球様細胞に変態し、盛んな核分裂を起こすことが報告され^{6~10)}、その後テタヌス毒素、ジフテリア毒素、チフスワクチン、ポリオワクチン、天然痘ワクチン、百日咳ワクチンなどの特異抗原添加によっても、それぞれのワクチン・トキシノイドの被予防接種者の末梢血リンパ球培養で blastoid transformation が起こることがわかり^{43~46)}、遅延型免疫を *in vitro* で検出できる可能性が示された。さらに本現象は自己免疫性疾患の研究にも応用され、1963年 Hashen⁴⁷⁾ は、湿疹患者の末梢血リンパ球に皮膚抽出物を添加して培養し、本現象を認めたとしている。その後、橋本病⁴⁸⁾、多発性硬化症⁴⁹⁾、SLE⁵⁰⁾ などでも、それぞれの推定組織抗原を添加することにより、培養リンパ球の blastoid transformation が起こることが報告されている。肝疾患においては、1967年 Schaffner¹¹⁾、穴戸¹²⁾ が、自己生検肝臓を添加することにより、培養リンパ球の blastoid transformation を認めたと報告して以来、Lehner¹³⁾、Pipitone¹⁴⁾、太田¹⁶⁾ によって同様の研究がなされてきた。著者もこれらの研究者と同様に、肝疾患患者の末梢血リンパ球を採取して、自己肝臓を添加培養し、培養リンパ球の反応をみるとともに、今まで試みられなかった術式、すなわち同種肝臓および同種肝に前もって自己血清と補体を作用させたものをそれぞれ添加して、PHA 反応とともに培養リンパ球の反応を検索した。

まず末梢血リンパ球培地に PHA-M を添加すると、Hirschhorn⁵¹⁾、Nowell⁵⁾ の報告のごとく、正常人リンパ球では、培養1日目よりリンパ球の芽球様細胞への変態 blastoid transformation が起こり、ほぼ72時間で最高値の62~90%の芽球形成率に達し、thymidine uptake もほぼこれに平行して増加していた。肝硬変を含めた通常の肝疾患でも、培養72時間で観察するとはほぼ正常人と同様の芽球形成率を示し、各疾患間の有意差

は認められなかった。しかしルポイド肝炎、PBC および PBC 類似の薬剤性肝炎の3例では、培養72時間目の芽球形成率は15~43%にとどまり、PHA 反応の抑制がみられた。このような現象は defective transformation と呼ばれ、慢性リンパ性白血病⁵²⁾、サルコイドーシス⁵³⁾、lymphoid depletion 型の Hodgkin 病⁵⁴⁾、Sjögren 病⁵⁵⁾、尿毒症⁵⁶⁾ などの一部でも同様の現象が認められると報告されている。さらに1969年および1970年 Sherlock^{57,58)} は、PBC の約3分の2に同様の PHA 反応抑制現象を認めたとし、このような患者を2,4-dinitro-1-chlorobenzen (DNCB) で感作し、皮膚反応を行うと多くの症例で反応は陰性であり、またツベルクリン反応も陰性の症例が多く、これらの現象を遅延型免疫の抑制状態であると説明している。著者の症例では、PBC のみならず、ルポイド肝炎と PBC 類似の薬剤性肝炎にも defective transformation を認めたが、サルコイドーシスの1例では認められなかった。さらにこの現象を追求するために行った経時的観察では、ルポイド肝炎、PBC、PBC 類似の薬剤性肝炎の3例ともに、芽球形成率および thymidine uptake のピークは、正常人のピークより1日早く48時間目に起こり、そのときの値はほぼ正常人の72時間目の値に一致していた。しかも免疫的、臨床的寛解に伴い、培養72時間目の芽球形成率、thymidine uptake は正常人のそれに近づき、さらに PBC 類似の薬剤性肝炎の1例では、免疫的、臨床的な寛解とともに正常人と同様の pattern にもどっていた。以上より Sherlock^{57,58)} が説明するごとく、PBC は PHA 反応が defective で、遅延型免疫の抑制状態であるというより、PBC やルポイド肝炎などのアレルギー性肝疾患では、むしろ PHA 反応が早期に出現し、遅延型免疫が促進された状態と考えられ、しかも免疫的、臨床的寛解に伴い、遅延型免疫も正常状態にもどる傾向があると考えられる。一方において、白血病や Hodgkin 病などでは PHA 反応のピークが低く、正常人に比べ逆におくれ、約1週間でピークに達するという Bouroncie⁵⁹⁾ の最近の報告がある。このように白血病のごとく PHA 反応が遅延し、抑制されているものが defective or delayed transformation であり、PBC やルポイド肝炎は、むしろ rapid transformation というべきであろうと考えられるが、今後さらに症例を加えて、この新しい現象の意義を追求するつもりである。

次に肝抗原を添加して、肝疾患患者の末梢血リンパ球を培養し、control 培養に比べ、芽球形成率、thymidine

uptake とともに 2.5 倍以上のものを培養リンパ球反応陽性とする、自己肝添加では、36 例中 9 例、すなわちルポイド肝炎、PBC、PBC 類似の薬剤性肝炎と一部の慢性肝炎、肝硬変、1 例の亜急性肝炎が陽性であった。他人肝添加では、陽性率が低く、31 例中 4 例、他人肝 + 自己血清 + 補体添加では、やや陽性率が高く 23 例中 7 例が陽性であった。従来このような研究は、移植抗原の相違を避けるために、主として自己生検肝臓を添加抗原として用いられてきた。その陽性例の芽球形成率は、Schaffner ら¹¹⁾の発表した 14~18% を筆頭に、著者の症例も含め、多くは 10% 以下の低い芽球形成率にとどまっている。自己肝成分のうち、いかなる成分に抗原性があるかについては、まったく不明であり、しかも肝抗原に対するリンパ球の反応があまりにも弱く、本反応の意義について断定的なことはいえない。しかし、すでに報告されているリンパ球反応陽性例は、著者の症例も含め、PBC、ルポイド肝炎と一部の慢性肝炎、肝硬変であり、これらはいずれも遅延型免疫の関与が疑われている疾患で、このリンパ球反応が、肝疾患の体内にある遅延型免疫を示している可能性を示唆しているのではなかろうかと考える。

他人肝添加によるリンパ球培養反応は、組織適合性の相違による刺激の可能性があつて、まだ広く行われていず、著者と加納⁶⁰⁾の報告があるのみである。著者の症例で他人肝添加と自己肝添加のリンパ球反応を比較してみると、他人肝添加で陽性を示したリンパ球が、自己肝添加では陰性を示すような症例は 1 例のみであった。その 1 例は著者の criteria では陰性であるが、わずかながら自己肝でも反応を示した症例である。一方自己肝添加で陽性でも、他人肝添加では陰性の症例はかなり存在し、かえって control 培養に比べ、他人肝添加では、芽球形成率、thymidine uptake が低いものが多い。したがって他人肝添加培養で、組織適合性の相違によるリンパ球刺激の可能性は少ないのではないかと考えられる。ただ太田¹⁶⁾は、激症肝炎の剖検他人肝臓を添加し、かなりの率でリンパ球刺激反応を認めたとしているが、著者の用いた他人正常肝抗原添加とは意味が異なり、むしろ肝崩壊の agent を抗原に用いようとした意図がうかがわれる。

次に、抗原・抗体複合体がリンパ球を刺激するとの Hirschhorn ら²²⁾ Möller⁶¹⁾の報告に基づいて、他人肝に自己血清を作用させ、なんらかの流血抗体との複合体ができるなら、それがリンパ球を刺激する作用がないか

と考え検索してみた。他人肝に前もって自己血清と補体とを作用させ、それを添加した培養では、他人肝単独添加に比べ、やや高率にリンパ球刺激反応を認め、しかも他人肝単独添加で反応するリンパ球は、すべてこの複合体添加培養でも反応し、むしろ自己肝添加培養に近い成績であり、自己血清と補体のみの添加ではリンパ球刺激作用がなかった。さらに複合体添加培養陽性例は、すべて抗ミトコンドリア抗体が検出されているので、この抗体との複合体がリンパ球を刺激したのではないかと考えられる。しかし抗ミトコンドリア抗体陽性症例のリンパ球が、必ずしもこの培養でリンパ球反応が陽性とは限らなかったもので、なお疑問が残っている。このような他人肝 + 自己血清 + 補体添加リンパ球培養は、著者を除き報告がないので、今後症例を加えて検討すべき課題だと考えられる。

このように肝抗原添加で、一部の慢性肝疾患患者の末梢血リンパ球は軽度刺激されるのであるが、この反応と従来主として検索されてきた即時型免疫に主役を演じる流血抗体との関係について考えてみよう。最近英国グループ⁶²⁾で注目されている抗ミトコンドリア抗体の陽性例には、3 種の肝抗原添加ともに、培養リンパ球反応陽性例が多いが、両者の間に明らかな相関関係があるとはいえなかった。また螢光抗体法による流血抗体とも明らかな関係はみられず、穴戸¹²⁾の報告にはほぼ一致していた。

肝内で起こった免疫反応の組織学的表現ともいわれる肝内リンパ細胞形成⁶³⁾との関係をみると、太田¹⁶⁾は、肝細胞性肝炎のかなりの率に自己肝添加培養リンパ球反応が陽性であったとしているが、著者の症例では必ずしもそうではなかった。肝内にリンパ球集簇を認めた症例に、自己肝あるいは他人肝・複合体添加培養リンパ球反応陽性率が高い傾向が認められたが、肝細胞性集簇群に陽性例がなく、むしろ非肝細胞性の肝内リンパ球集簇例に陽性例が多く認められたことを述べておきたいと思う。

1 例ではあるが、その臨床経過と流血抗体・培養リンパ球反応の推移を比較してみたが、臨床的、免疫学的寛解とともに、培養リンパ球反応も陰性化していることは、はなはだ興味深い。そして薬剤性肝炎について、薬剤の添加によるリンパ球刺激反応の経過が Popper ら⁶⁴⁾によって報告されており、同様の結果を示している。

穴戸¹²⁾は、肝抗原に対して感受性の高いヒトのリンパ球をマウス尾静脈に注入し、リンパ球反応陰性のリンパ球注入マウスと対比して、肝組織像を観察し、リンパ

球の病因性を検索しようとしたが、明らかな結果を得なかったとしている。しかし潰瘍性大腸炎患者の末梢血リンパ球と正常人大腸粘膜細胞を混合培養すると、正常人リンパ球を加えた培養に比べ、大腸粘膜細胞がより早期に死滅するとの報告^{65,66)}もあり、リンパ球のもつ細胞性抗体が肝疾患の進行、慢性化になんらかの病因性をもつ可能性も考えられるが、いまだ確証がない。

まとめ

金沢大学第1内科に入院した肝疾患患者について、肝生検時に採取した末梢血リンパ球に種々の肝抗原を添加して培養し、その反応を観察して、次の結果を得た。

1) PBC やルポイド肝炎などのアレルギー性肝疾患では、培養リンパ球の PHA に対する反応が早期に起こり、そのピークは培養 48 時間目にあり、臨床的、免疫学的改善に伴い正常化する傾向がある。

2) 自己肝添加リンパ球培養では、PBC・ルポイド肝炎、一部の慢性肝炎・肝硬変で刺激反応を認め、他人正常肝添加ではやや陽性率が低く、他人肝+自己血清+補体添加では、ほぼ自己肝添加と同様の培養リンパ球反応がみられた。

3) 培養リンパ球反応と抗ミトコンドリア抗体は、軽度に関連する傾向がみられたが、蛍光抗体法による各種の流血抗体とは、明らかな相関はなかった。

4) 培養リンパ球反応陽性例の多くの肝にリンパ球集簇を認めたが、定型的なリンパ母細胞形成肝には1例も反応陽性例がなかった。また流血抗体(抗肝抗体)は、肝疾患の慢性化と重症度に比例して高率に認められたが、必ずしもリンパ母細胞形成肝に抗肝抗体陽性率が高いとはいえなかった。

稿を終えるにあたり、ご指導・ご校閲を賜った恩師太田五六助教授に深謝し、ご指導、ご協力賜った恩師武内重五郎教授に厚くお礼申し上げます。また研究にご協力いただいた医動物学教室教員および技師、第1内科肝・消化器グループの皆様にも心からお礼申し上げます。

文 献 1) Popper, H., Paronetto, F. & Schaffner, F.: Immune processes in the pathogenesis of liver disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **124**: 781, 1965. 2) Mackay, I. R., Weiden, S. & Hasker, J.: Autoimmune hepatitis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **124**: 767, 1965. 3) Burch, G. E., Phillips, J. H., Gelzayd, E. A. &

Kirsner, J. B.: Immunologic aspects of chronic active hepatitis in young people. A critical review of the recent literature, *Amer. J. Med. Sci.*, **253**: 98, 1967. 4) Doniach, D. & Walker, J. G.: A unified concept of autoimmune hepatitis, *Lancet*, **1**: 813, 1969. 5) Nowell, P. C.: Phytohaemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes, *Cancer Res.*, **20**: 462, 1960.

6) Pearmain, G., Lycette, R. R. & Fitzgerald, P. H.: Tuberculin induced mitosis in peripheral blood lymphocytes, *Lancet*, **1**: 637, 1963. 7) Schreck, R.: Cell transformations and mitosis produced in vitro by tuberculin purified protein derivative in human blood cells, *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **87**: 734, 1963. 8) Heilman, D. H. & McFarland, W.: Mitogenic activity of bacterial fractions in lymphocyte cultures. I. Purified protein derivative and polysaccharides of tuberculin, *J. Immunol.*, **96**: 988, 1966. 9) McFarland, W. & Heilman, D. H.: Comparison of lymphocyte transformation & intradermal reactions to tuberculin, *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **93**: 742, 1966. 10) Marshall, W. H. & Roberts, K. B.: Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes, *Lancet*, **1**: 773, 1963.

11) Tobias, H., Safran, A. P. & Schaffner, F.: Lymphocyte stimulation and chronic disease, *Lancet*, **1**: 193, 1967. 12) 穴戸英雄, 奥田正治, 川口尚志: 肝疾患におけるリンパ球の自己肝抗原添加培養による blastoid cell transformation について, *日本臨床*, **25**: 127, 1967. 13) Lehner, T.: Lymphocyte stimulation and liver disease, *Lancet*, **1**: 332, 1967. 14) Pipitone, V.: Lymphocyte stimulation and liver disease, *Lancet*, **1**: 840, 1967. 15) 太田五六, 梶原光令, 若月寿之助: 一次性胆汁性肝硬変の免疫学的研究, リンパ球培養を中心として, *肝臓* **10**: 553, 1969.

16) 太田康幸, 小林敏成, 辻孝夫, 檀上博, 竹原謙三, 岡莞爾, 水野保夫, 佐藤公身: Follicular Hepatitis と肝における自己免疫機転の組織学的表現, *日本臨床*, **28**: 22, 1970. 17) Sleeman, H. K.: Studies on soluble antigenic substances isolated from human liver, *Proc. Soc. Exp. Med. Biol.*, **113**: 451, 1963. 18) Smith, J. T., Funckes, A. J., Barak, A. J. & Thomas, L. E.: Cellular lipoproteins. 1. The insoluble lipoprotein of whole liver cells, *Exp. Cell. Res.*, **13**: 96,

1950. 19) Asherson, G. L. & Dumonde, D. C.: Characterization of autoantibodies production in the rabbit by the injection of rat liver, *Brit. J. Exp. Path.*, **43**: 12, 1962. 20) Ripps, C. S. & Hirschhorn, K.: The production of immunoglobulins by human peripheral blood lymphocytes in vitro, *Clin. Exp. Immunol.*, **2**: 377, 1967.

21) Hanks, J. H. & Wallace, R. E.: Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissue by refrigeration, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **71**: 196, 1949. 22) Shtacher, N. B., Hirschhorn, K. & Uhr, W.: The response of lymphocytes from non immunized humans to antigen-antibody complexes, *Clin. Exp. Immunol.*, **3**: 889, 1968. 23) Mayer, M. M., Eaton, B. B. & Heidelberger, M.: Spectrophotometric standardization of complement for fixation tests, *J. Immunol.*, **53**: 31, 1946. 24) Stavitsky, A. B.: Micromethods for study of proteins and antibodies: Procedure and general applications of hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid & protein treated red blood cells, *J. Immunol.*, **72**: 360, 1954. 25) Eaton, M. D., Murphy, W. D. and Hanford, V. L.: Hepatogenetic antibodies in acute hepatitis, *J. Exp. Med.*, **79**: 539, 1949.

26) Voländer, K. O.: Über den Nachweis Komplexbindernder Autoantikörper bei Nieren- und Lebererkrankungen, *Ztsch. d. Ges. Exp. Med.*, **118**: 352, 1952. 27) Atwater, E. C. & Jacox, R. F.: The latexfixation test in patients with liver disease, *Ann. Int. Med.*, **58**: 419, 1963. 28) Friou, G. J.: Antinuclear antibodies: diagnostic significance and methods, *Arth. and Rheum.*, **10**: 151, 1967. 29) Walker, J. G., Doniach, D., Roitt, I. M. & Sherlock, S.: Serological tests in diagnosis of primary biliary cirrhosis, *Lancet*, **1**: 827, 1965. 30) Johnson, G. D., Holborow, E. J. & Glynn, L. E.: Antibody to smooth muscle in patients with liver disease, *Lancet*, **2**: 878, 1965.

31) Paronetto, F., Schaffner, F., & Popper, H.: Immunocytochemical reaction of serum of patients with hepatic diseases with hepatic structure, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **106**: 216, 1961. 32) Johnson, G. D., Holborow, E. J. & Glynn, L. E.: Antibody to liver in lupoid hepatitis, *Lancet*, **2**: 416, 1966. 33) Don-

iach, D., Roitt, I. M., Walker, J. G. & Sherlock, S.: Tissue antibodies in primary biliary cirrhosis, active chronic (lupoid) hepatitis, cryptogenic cirrhosis and other liver diseases and clinical implication, *Clin. Exp. Immunol.*, **1**: 237, 1966. 34) Gajdusek, D.: An autoimmune reaction against human tissue antigen in certain acute and chronic diseases, *Arch. Int. Med.*, **101**: 9, 1958. 35) 太田五六, 梶原光令, 佐々木晏子, 武内重五郎, 若月寿之助, 津田功雄: 自己肝抗原と反応する自己免疫性肝炎, *肝臓* **9**: 413, 1968.

36) 太田五六, 若月寿之助: 慢性肝疾患の肝内間質反応と抗原抗体, *医学のあゆみ* **62**: 843, 1967. 37) Nowell, P. C.: Differentiation of human leukaemic leucocytes in tissue culture, *Exp. Cell. Res.*, **19**: 267, 1960. 38) Byron, J. W. & Lajtha, L. G.: Cellular kinetics of peripheral blood cell system treated with phytohaemagglutinin, *Blood*, **20**: 102, 1962. 39) Carstairs, K.: The human small lymphocyte: its possible pluripotential quality, *Lancet*, **1**: 829, 1962. 40) Cooper, E. H., Barkhan, P. & Hale, A. J.: Observations on the proliferation of human leucocytes cultured with phytohaemagglutinin, *Brit. J. Haemat.*, **9**: 101, 1963.

41) Mackinney, A. A., Stohlman, F. & Brecher, G.: The kinetics of cell proliferation in culture of human peripheral blood, *Blood*, **19**: 349, 1962. 42) Elves, M. W. & Wilkinson, J. F.: The effect of phytohaemagglutinin on normal and leukaemic leucocytes when cultured in vitro, *Exp. Cell. Res.*, **30**: 200, 1963. 43) Elves, M. W., Roath, S. & Israëls, M. C. G.: The response of lymphocytes to antigen challenge in vitro, *Lancet*, **1**: 806, 1963. 44) Lycette, R. R. & Pearmain, G.: Further observations of antigen-induced mitosis, *Lancet*, **2**: 386, 1963. 45) Ling, N. R. & Husband, E. M.: Specific and non-specific stimulation of peripheral lymphocytes, *Lancet*, **1**: 363, 1964.

46) Matsaniotis, N. S. & Tsenghi, C. J.: Mitosis in leukocyte cultures, *Lancet*, **1**: 368, 1964. 47) Hassen, N., Sedlis, E., Hirschhorn, K. & Holt, L. E.: Evidence of autoimmunity to human skin, *Lancet*, **2**: 269, 1963. 48) Forbes, I. J.: Specific and nonspecific stimulation synthesis by human leucocytes in vitro,

- Lancet, **1**: 198, 1965. 49) Fowler, I., Morris, C. E. & Whitley, T.: Lymphocyte transformation in multiple sclerosis induced by cerebrospinal fluid, New. Eng. J. Med., **275**: 1041, 1966. 50) Patrucco, A., Rothfield, N. F. & Hirschhorn, K.: The response of cultured lymphocytes from patients with SLE to DNA, Arth. Rheum., **10**: 32, 1967.
- 51) Hirschhorn, K., Bach, F., Kolodny, R. L., Firschein, I. L. & Hashen, N.: Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro, Science, **142**: 1185, 1963. 52) Robbins, J. H.: Human peripheral blood in tissue culture and the action of phytohaemagglutinin, Experientia, **20**: 164, 1964. 53) Hirschhorn, K., Schreihman, R. R., Bach, F. H. & Siltzbach, L. E.: In vitro studies of lymphocytes from patients with sarcoidosis and lymphoproliferative diseases, Lancet, **2**: 842, 1964. 54) Hersh, E. M. & Oppenheim, J. J.: Impaired in vitro lymphocyte transformation in Hodgkin's disease, New. Eng. J. Med., **273**: 1006, 1965. 55) Leventhal, G. B., Waldorf, D. S. & Talal, N.: Impaired lymphocyte transformation and delayed hypersensitivity in Sjögren's syndrome, J. Clin. Invest., **46**: 1338, 1967.
- 56) Weksler, M. E., Alepa, F. P. & Schreiner, G. E.: Inhibition of human lymphocyte transformation in uremia, J. Clin. Invest., **46**: 1131, 1967. 57) Fox, R. A., James, D. G., Scheuer, P. J., Sharma, O. & Sherlock, S.: Impaired delayed hypersensitivity in primary biliary cirrhosis, Lancet, **1**: 959, 1969. 58) Fox, R. A., James, D. G., Scheuer, P. J., Sharma, O. & Sherlock, S.: Impaired lymphocyte response in primary biliary cirrhosis, Proc. Roy. Soc. Med., **63**: 19, 1970. 59) Bouroncie, B. A., Clausen, K. P. & Aschenbrand, J. F.: Studies of the delayed response of phytohemagglutinin stimulated lymphocytes in 25 chronic lymphatic leukemia patients before and during therapy, Blood, **34**: 166, 1969. 60) 加納英行: 昭和45年11月8日, 日本内科学会東海・北陸合同地方会シンポジウムにて発表.
- 61) Möller, G.: Induction of DNA synthesis in normal human lymphocyte cultures by antigen-antibody complexes, Clin. Exp. Immunol., **4**: 65, 1969. 62) Doniach, D., Walker, J. G., Roitt I. M. & Berg, P. A.: Autoallergic hepatitis, New. Eng. J. Med., **282**: 86, 1970. 63) 小林淳夫, 太田康幸, 小林敏成, 渡辺友邦, 青地一郎, 衣笠舜二, 柴田浩一, 横井理, 間坂孝文, 国府島紀文, 佐々木博雅, 幡慶一: 自己免疫としての組織表現をもつビールス性肝炎—濾胞性肝炎なる病名の提唱—, 肝臓, **6**: 284, 1965. 64) Paronetto, F. & Popper, H.: Lymphocyte stimulation induced by halothane in patients with hepatitis following exposure to halothane, New. Eng. J. Med., **283**: 277, 1970. 65) Watson, D. W., Quigley, A. & Bolt, R. J.: Effect of lymphocytes from patients with ulcerative colitis on human adult colon epithelial cells, Gastroenterology, **51**: 985, 1966.
- 66) Shorter, R. G., Cardoza, M., Spencer, R. J. & Huizenga, K. A.: Further studies of in vitro cytotoxicity of lymphocytes from patients with ulcerative and granulomatous colitis for allogeneic colonic epithelial cells, including the effects of colectomy, Gastroenterology, **56**: 304, 1969.

*

*

*