＜原 著＞

蛋白同化ステロイドによる肝障害の発生機序に関する研究

板 倉 弘 重*

概 要

蛋白同化ステロイド投与時の血清トランスアミナーゼ上昇機転にアレルギーが関与しているか否かを解明するために、家兎に蛋白同化ステロイドを投与し実験を行った。蛋白同化ステロイドとして 2-hydroxymethylene-17 α -methyldihydrotestosterone を投与すると、14 日ほどで血清トランスアミナーゼ活性値が上昇するが、この肝障害家兎血を輸血すると 2 日で上昇することが判明した。白血球を移入した場合にこの現象がみられ、赤血球や血漿は無効であった。胸管リンパでも同様の現象がみられたが、リンパ球を破壊するとこの現象がみられなくなり、また 6-メルカプトプリン投与でこの現象が抑制された。再投与時にも初回投与時より早期に血清トランスアミナーゼ活性値が上昇した。実験結果から肝を場として遅延型アレルギー反応が関与していると推論した。

要旨の一部は 1967 年、第 3 回世界消化器病学会で発表。

I 結 言

蛋白同化ステロイドの投与により、BSP の貯留、トランスアミナーゼ（以下 TA と略）活性値の上昇がみられる^{1,2)} ことがあり、肝組織像では小葉中心部に cholestasis の所見を呈し、小胆管の拡張・胆栓がみられる³⁾ が、強い炎症像や壊死はみられないことが多い。電子顕微鏡で胆汁排泄器管の異常が認められ^{4,5)} ており、毛細胆管の microvilli の脱落、短小化などが認められる。蛋白同化ステロイド投与で肝機能異常をきたした場合でも、投与を中止すれば一般にすみやかに元に戻り、後遺症を残すことはないとしている。しかしながら時には黄疸が生じることが報告され、まれに本剤による肝障害で死亡したと思われる症例が報告⁶⁻⁸⁾ され、これら肝障害の発生機序が同一の機構によるものか疑問をいだかせる。

動物に蛋白同化ステロイドを投与した場合にもほぼ同様の反応がみられ、ラットや家兎で血中 TA 活性値の上昇が報告されている。

蛋白同化ステロイドによる肝障害の発生機序に関して臨床実験、動物実験等で研究⁹⁻¹¹⁾ されているが、いまだ十分には解明されておらず、BSP の貯留に関しては本剤投与時血中に停滞している BSP の多くが結合型であることから、結合型 BSP の排泄機構の障害によると考えられ、またビリルビンの排泄障害のみられることも実験的に証明¹²⁾ されている。電子顕微鏡により投与例の大部分に前述のごとき変化が認められることから、蛋白同化ステロイドによる肝障害には、アレルギーは関係していないと推定している報告が多い。血中 TA 活性値の上昇の機序に関しては不明の点が多く、肝細胞膜透過性の変化のために酵素が逸脱したと考えられている。Schwarz¹²⁾ は、蛋白同化ステロイドで皮膚感作により湿疹様の病変が生じた例を報告しており、蛋白同化ステロイドによる肝障害にアレルギーが関与している可能性も考えられ、アレルギーの関与の有無を明らかにすべく、家兎による動物実験を行い検討を加えた。

II 蛋白同化ステロイド投与と移入実験

A. 実験方法

1. 実験対象：実験動物は体重 2.5 kg～3.0 kg の白色雄性成熟家兎。餌料はオカラにオリエンタル固形餌料を混合して与えた。

2. 投与薬剤と投与方法：蛋白同化ステロイドとして、2-hydroxy-methylene-17 α -methyldihydrotestosterone (HMD と略) を用いた。HMD をプロピレングリコールに 10 mg/dl の濃度になるように溶解、毎日 3 mg/kg 皮下注射により投与した。アジュバントは使用しない。

3. 片腎結紮法：Campbell¹³⁾ が実験的肝硬変において、片腎結紮によりその発生頻度が高まると報告しており、本実験において HMD 投与家兎の一部に片腎結紮を行った。家兎を固定台上に固定し、腹部を剃毛

* H. Itakura : 東京大学 第 3 内科。

後 10 cm ほど正中切開を行い、腸をひき出し左腎または右腎（主に左腎）の腎動静脈、神経、尿管すべてを含めて強く結紮し、腸を還納後腹壁を縫合した。

4. 採血法および静注法：キシレンで血管を拡張させたのち、耳翼周辺静脈を損傷し滴下する血液を集めた。静注も耳翼周辺静脈を使用した。

5. 酵素測定法：血清 TA 活性は Reitman-Frankel 法に従い測定。アルカリフォスファターゼ活性は Bessy-Lowry-Brock 法。血清ソルビトールデヒドロゲナーゼ、(SDH) 活性は Gerlach 法で測定した。

6. BSP 試験法：BSP 試験は体重 kg あたり 20 mg の BSP 色素を静注し、20 分後反対側で採血し BSP 濃度を測定した。

7. 輸血法：交叉試験を行い、異常のみられない家兔の血液を耳翼周辺静脈、あるいは頸動脈より 30 ml 採血し、抗凝固剤 ACD 液 10 ml と混合し静注法により輸血した。

8. 血液成分分析法：血液 30 ml と ACD 液 10 ml と混合し、3,000 回転 30 分遠心分離し、上清を血漿成分とし、沈渣に 20 ml の生理食塩水を加え、3,000 回転 30 分遠心分離し、上清をすて沈渣を生理食塩水 20 ml に浮遊させ、これを血球成分とした。遠心分離した血球成分の上層部分をピペットで取り、生理食塩水に浮遊させ 3,000 回転 20 分遠心分離し、上層の白色部分をていねいに採取し生理食塩水と混合しこれを白血球成分とし、下層の部分に同量の生理食塩水を加え赤血球成分とした。

9. 胸管リンパ採取法：家兔を固定台上に固定し、前頸部から上胸部にかけ毛を刈りとったのち、正中よりやや左に縦切開を加え、左頸静脈の内側で鎖骨下静脈との合流部やや上方に胸管をさがし、カニューレを挿入あるいは破れて流出するリンパを採取し、1 ml の ACD 液を入れた遠沈管中に 5 時間ほどで 10 ml 採取した。リンパ中の白血球数は $2 \sim 3 \times 10^4 / \text{mm}^3$ であり、そのうち 98% がリンパ球であった。

10. 破壊リンパ液作成法：上記の方法で採取したリンパをホモゲナイザーに入れ、ドライアイス・アセトン中で凍結、室温で融解。この操作を数回行い、塗抹標本で血球が破壊されていることを確かめ破壊リンパ液とした。

B. 実験成績

1. 蛋白同化ステロイド投与実験

蛋白同化ステロイド HMD を未処置正常家兔に 3mg

図 1. 蛋白同化ステロイド連続投与時の s-GOT (実線で示す)、s-GPT (破線で示す) の変動。片腎茎結紮を行わなかった家兔群。

図 2. 蛋白同化ステロイド連続投与時の s-GOT, s-GPT の変動。片腎茎結紮を行った家兔群。

/kg 連日投与すると、4 例中 2 例において 14 日目に血中 TA 活性値が著明な上昇をきたした（図 1）。片腎茎結紮法を併用すると、血中 TA 活性値の上昇が高率にみられるようになり、14 日目に 4 例中 2 例が、15 日目に 1 例、20 日目に 1 例が上昇をきたした（図 2）。とくに s-GOT の変動が著明であり s-GPT の変動は一般に少ない傾向がみられ、200 単位以下のことが多い。

上昇した血中 TA 活性は種々の変動を呈し、1 週間で正常値に戻る場合や、1 ヶ月間異常高値を持続する場合もみられた。TA 活性が異常に上昇するまでの HMD 投与期間は、家兔により個体差はあるがおよそ 14 日を要した。SDH も TA に伴って変動し、処置前 10 単位であったが薬剤投与後 30 単位まで上昇をきたした。アルカリフォスファターゼ活性、血清ビリルビン値は有意

図 3. 蛋白同化ステロイド投与時における BSP 試験とトランスアミナーゼ活性値の比較.

の変動を示さなかった。BSP 試験で正常家兎は 5% 以下であったが、HMD 注射開始 3 日目ごろから全例で徐々に BSP 停滞増加傾向を認め 10% 程度になる。投与 2 週間で 10% から 80% までバラツキがみられる。血清 TA 活性値と比較すると、BSP 値が 10% 以下では血清 TA 活性値は正常範囲内にあり、10% を越えると TA 活性値も上昇していることが多いが相関関係は認められない (図 3)。

2 例において片腎結紮のみを行い、HMD を投与せず血中 TA 活性値の経過を 1 年間にわたり観察したところ、1 例は処置後も変動なく、1 例は手術 24 時間後に s-GOT、s-GPT ともに 10 単位上昇をきたしたが、6 日後には処置前値に戻りその後上昇傾向は認めなかった。

2. HMD による肝障害に対する肝障害家兎血輸血の影響

HMD 投与により血中 TA 活性の上昇した家兎血を輸血し、24 時間後から HMD を 3 mg/kg 投与開始したところ、注射開始 1~2 日後から血中 TA 活性値が上昇することを認めた (図 4)。4 例中 3 例は処置前と輸血 24 時間後と TA 活性値に相違はみられず、1 例の s-GOT が輸血 24 時間後に上昇した。注射開始 48 時間後には 4 例全例において s-GOT の上昇がみられ、300 単位以上まで上昇がみられたが、s-GPT は s-GOT

図 4. 蛋白同化ステロイド投与家兎血を輸血し、HMD を投与した場合のトランスアミナーゼ活性値の変動.

図 5. 蛋白同化ステロイド投与家兎血を輸血し、HMD を投与した 1 例の諸酵素活性値の変動.

より 24 時間ほど遅れて上昇を開始し、上昇の程度も s-GOT より軽度で 200 単位以下であった。

アルカリフォスファターゼは4例中3例において不変であったが、1例は1.8単位から8.0単位まで上昇した。この例はSDHも11単位から35単位まで上昇した(図5)。

血清ビリルビン値は上昇せず、BSP試験はTA活性値が早期上昇を示した時期でも5~10%ほどであった。

高TA家兎血を輸血されHMD投与をうけ早期に血中TA活性値が上昇した家兎から、HMD投与6日目に採血し、未処置正常家兎に輸血し同様にHMDを注射したところ、この家兎の血中TA活性値はHMD投与開始48時間後から上昇をきたした。

3. 対照実験

i) プロピレングリコールは低分子の化合物で、生体に無害であるとされているのでHMDの溶媒として使用した。血清TA活性値に対する影響を検討するため、プロピレングリコール0.3ml/kgを家兎に連続24日間皮下注射したが、血清TA活性値の上昇はまったくみられなかった(図6)。

ii) プロピレングリコール投与家兎血および未処置正常家兎血を輸血し、HMDを投与しない場合の受血家兎血清TA活性値を測定したが、4例全例において血清TA活性は正常範囲内にあり、上昇はまったくみられなかった(図7-a)。

iii) HMD投与により血清TA活性値が上昇している家兎血を同様に輸血しても、受血家兎にHMDを投与しなければ受血家兎の血清TA活性値の上昇はみられない(図7-b)。

iv) HMD投与中で血清TA活性値が正常である時期の家兎血を輸血しHMDを投与したところ、血清TA活性の上昇開始時期が早くなるという現象はみられ

なかった(図8-a)。

v) 四塩化炭素を0.03cc/kg皮下注射すると、24時間後すでに血清TA活性が著明に上昇する。6日間四塩化炭素を投与し、血清TA活性が上昇している家兎の血液を未処置正常家兎に輸血し同様にHMDを連続投与したところ、輸血直後わずかに血清TA活性が上昇するが、正常範囲内における変動でHMDによる高TA活性値を示す血液を輸血した場合と異なり、HMDを投与しても血清TA活性値が短期間で上昇してくるという現象はみられなかった(図8-b)。

図7. 輸血を受けた家兎の血清トランスアミナーゼ活性値の変動。HMD投与を行わず。

a. s-GOT・s-GPT活性値が正常範囲にある血液を輸血。

b. s-GOT・s-GPT活性値が上昇している血液を輸血。

図6. プロピレングリコール連続投与時の血清トランスアミナーゼ活性値の変動。

図8. 受血家兎の血清トランスアミナーゼ活性値の変動。

a. s-GOT・s-GPT活性値が正常範囲にある家兎血を輸血しHMDを投与。

b. 四塩化炭素を投与し、s-GOT 500, s-GPT 400単位と上昇した家兎血を輸血しHMDを投与。

4. 血液の成分別移入実験

以上の実験より HMD を家兎に連続投与すると、約 14 日で血清 TA 活性値が上昇する。次にこの高 TA 活性を示す時期の血液を輸血し HMD を投与すると、受血家兎の血清 TA 活性値が HMD 注射後 1~2 日目に上昇して来る事が判明した。この早期上昇をひき起こす物質が血液中のどの成分にあるか調べるために、血液を血漿と血球部分に分離し、それぞれを別の家兎に輸注し HMD を投与したところ、血漿の注射を受けた家兎では 10 日以内には血清 TA 活性値の上昇はみられず、5 例全例で早期上昇は起こらなかった (図 9 左)。血球部分の移入を受け HMD の投与を受けた家兎は、早期に血清 TA 活性値が上昇した。

さらに血球部分を白血球と赤血球に分離し同様の実験を行った。赤血球を移入し HMD を投与しても、血清 TA 活性値は 3 例全例において 9 日まで正常値を示しており、早期上昇は認められなかった (図 9 右)。白血球

図 9. 血漿 (図左)、赤血球 (図右) の輸注を受け HMD を投与された家兎の血清トランスアミナーゼ活性値の変動。

図 10. 白血球 (図左)、リンパ (図右) の輸注を受け HMD を投与された家兎の血清トランスアミナーゼ活性値の変動。

を移入し HMD を投与した群では、HMD 注射 24 時間後から 48 時間後にかけて 5 例中 2 例が上昇を示し (図 10 左)、白血球部分に早期上昇を惹起せしめるものが存在することが推定された。血清 TA 活性値は 100 単位まで上昇しているが、全血輸血の場合に比較し上昇の程度は少ない。移入された白血球数は 2.5×10^8 個であった。

5. リンパ移入実験

早期に HMD 肝障害を惹起せしめる物質が白血球に存在すると推定されるため、リンパ球を多く含む胸管リンパを採取し検討を行った。

i) 正常家兎リンパ移入実験: 血清 TA 活性が正常値を示す家兎のリンパを移入し HMD を投与したところ、血清 TA 活性の上昇は 7 日目までは起こらなかった (図 11)。

図 11. 血清トランスアミナーゼ活性値が正常値を示す家兎のリンパの輸注を受け、HMD 投与をされた家兎の血清トランスアミナーゼ活性値の変動。

図 12. HMD 投与家兎リンパ球を破壊し、輸注を行い HMD 投与を行った場合の血清トランスアミナーゼ活性値の変動。

ii) 障害家兎リンパ移入実験: HMD 投与で血清 TA 活性値が上昇している時期のリンパを未処置正常家兎に移入し HMD を投与すると、注射開始 2~3 日後に血清 TA 活性値が著明に上昇することが認められた (図 10 右)。

iii) 破壊リンパ移入実験: HMD 肝障害家兎の破壊リンパ液を未処置正常家兎に移入し HMD を投与したところ、前の実験でみられた血清 TA 活性値の早期上昇はみられなくなった。1 例はまったく上昇せず、1 例は HMD 注射開始 2 日目から 4 日目まで s-GOT が 55 単位と軽度の上昇はみられたが、リンパをそのまま移入した場合のごとき著明な上昇はみられず、HMD を投与続けると 14 日後に s-GOT の上昇がみられた (図 12)。

6. 長期投与実験

2 ヶ月以上連続して HMD 投与を行った 13 例の血清 TA 活性値の変動をみると、まったく上昇しなかったもの 1 例、1 回上昇しそれが下降後再上昇のみられなかったもの 2 例、上昇し、いったん下降後再上昇をみたもの 5 例、上昇後正常範囲まで下降せず投与中止まで長期間上昇を続けたもの 5 例であった。個体差があり長期間投与による反応は一定していないが、再上昇の起こる場合があることが確かめられた。上昇の程度は再上昇の場合のほうが軽度であった。HMD 障害家兎血の輸血を受け、HMD を 87 日間連日投与し、この間血清 TA 活性が異常高値を示しながら上昇下降という大きな変動を 3 回示した例がある (図 13)。HMD 投与を中止すると血清 TA 活性値は 10 日で全例正常化した。

7. 再投与の影響

HMD を一定期間投与後、1 ヶ月間休業し HMD 再投与を行った。第 1 回目の HMD 投与により血清 TA 活性値が上昇しなかったもの 1 例、10 例は 10 日から 30 日 (平均 17 日) に TA 活性値が上昇した。再投与時 3 例は TA 活性値が上昇せず、7 例は 4 日から 18 日 (平均 7.7 日) で血清 TA 活性値が上昇し、再投与により注射開始から TA 活性値上昇に要する時間が短縮することが判明した (図 14)。

休業期間を 6 ヶ月に延長し再投与を行った場合の影響を 3 例で観察した。初回投与時上昇開始までに要した時間は 12 日、19 日、30 日 (平均 20.3 日)、6 ヶ月後の再投与時は 4 日、10 日、6 日で上昇し、平均 6.7 日と上昇に要するまでの時間が短縮されてくることが認められた。再投与までの休業期間が 1 週間では再投与によ

図13. 蛋白同化ステロイド長期間連続投与時の血清トランスアミナーゼ活性値の変動。

図14. 休業期間をおいての初回投与時と再投与時の血清トランスアミナーゼ活性値上昇に至るまでの時間の関係。(一)は上昇しなかった場合。

っても血清 TA 活性値に変動を示さなかった。

8. 組織学的検討

主として頸動脈から瀉血致死せしめ直ちに臓器切片をホルマリン固定し組織標本を作成、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い観察した。HMD 投与家兎肝を光学顕微鏡でみるとグリソン鞘の細胞浸潤、限界板のけずり取り現象がみられ、かつグリソン鞘を相互に結ぶ線維化がみられた。主として小葉周辺部に散在する単細胞壊死が認められ、暗調細胞の増加が認められた。Kupffer 細胞の動員がみられ胆管の増生も軽度ながら認められたが、著明な胆管の拡張や胆栓などは認められなかった。血清 TA 活性の程度と肝組織像を比較すると、血清 TA 活性値が高くかつその上昇期間の長いものは一般に上記の変化が強い傾向がみられるが、とくにグリソン鞘の細胞浸潤が目立ってくる傾向がみられた (図 15)。

HMD 投与による障害肝と障害家兎血輸血後 HMD を投与された家兎肝の組織像を比較したが、とくに差は見出せなかった。

肝以外の組織では心筋動脈内に Hyalin thrombus が

a. HMD 投与 1 ヶ月の家兎肝、H-E 染色。グ翰の軽度の細胞浸潤、胆管増生を認める。

b. HMD 投与 2 ヶ月の家兎肝、H-E 染色。グ翰の細胞浸潤を認める。

図 15.

みられ、心筋に凝固壊死像がみられた。細胞浸潤はほとんど認められない。腎にはとくに変化なく、尿蛋白は常に陰性であった。脾、副腎にはとくに変化はみられない。

C. 小 括

以上の実験で家兎に HMD を 3 mg/kg 毎日投与していると、個体差はあるが、およそ 14 日を要して血清 TA 活性値の上昇をきたし、この家兎の血液を輸血し HMD を投与すると、2 日以内に血清 TA 活性が上昇してくるという現象を発見した。このとき移入される要因は、白血球とくにリンパ球に存在することが推定され、凍結融解の操作で移入できなくなることが判明した。長期投与で再上昇し、HMD 投与中断後再投与により以前より短期間に血清 TA 活性値が上昇することを認めた。肝の組織学的検索で細胞浸潤をグリソン鞘に認め、単細胞壊死、Kupffer 細胞の動員が軽度ながら認められた。以上の実験結果から、この現象にアレルギーの関与して

いる可能性が推定される。

III 免疫学的検討

A. 実験方法

1. 6-メルカプトプリン投与方法

6-メルカプトプリン (6-MP と略) がアレルギーを抑制する¹⁴⁾ ことが知られ、家兎におけるアレルギーも 10 mg/kg ないし 6 mg/kg の 6-MP で抑制されると報告¹⁵⁾ されている。HMD による肝障害家兎血の移入実験でみられた血清 TA 活性の早期上昇現象が 6-MP で抑制されるか否か検討するため、高 TA 血を輸血し 24 時間後に 6-MP を 6mg/kg ずつ毎日皮下注射により投与した。

2. 螢光抗体法

正常家兎と障害家兎を脱血死せしめたのち、両者の肝切片をとり直ちにドライアイス・アセトン中の n-ヘキサン (-70°C) で凍結し、クリオスタットで 4 μ の切片とし、アセトン固定後抗ウサギ γ-グロブリンによる螢光染色を実施した。

3. HMD とアルブミン結合物の作成

HMD がハプテンとして作用し生体内で蛋白と結合し抗原性を獲得する可能性が推定されるが、HMD は水に不溶性であり、このままでは HMD を用いて免疫反応を行うことが困難なため、HMD とアルブミンと結合させることを考えた。アルブミンとしてウシ血清アルブミン (BSA と略) を用いた。

ステロイドと蛋白と結合させる試みはすでになされ、ステロイドと蛋白の結合物を抗原として動物を感作し、ステロイドに対する抗体が作られることが報告¹⁶⁾ されている。HMD の場合、その化学構造から考えてステロイド核の 2 の位置で 1 級アルコールとケトンの両方の性質を持つことが推定され、蛋白とまぜれば蛋白のアミノ基とケトンと反応し結合することが予想される。

HMD をジオキサン水溶液 (ジオキサン : 水 : 1 N NaOH = 50 : 50 : 2) に溶かし、BSA を少量の水に溶かしさらにジオキサン水溶液を加え、強く攪拌しながら HMD のジオキサン水溶液を少量ずつ滴下混合せしめた。4 時間室温で攪拌し淡黄色透明の溶液を 4°C で 40 時間透析し、ジオキサン臭がなくなり pH が 7.1 になっているのを確認後、1 N HCl で pH 4.5 とし白濁させ、これを遠沈管に入れ 4°C 24 時間放置後遠心分離し、沈渣と上清に分け上清はそのまま凍結乾燥、沈渣に蒸留水を加え NaHCO₃ で pH 7.4 にして溶解 24 時間 4°C で

図 16. 赤外線吸収スペクトル

a. ウシ血清アルブミン, b. HMD, c. 結合物

透析を行い凍結乾燥し, KBr Disc 法で赤外吸収をみたところ, 上清は BSA から成っていたが, 沈渣部分には HMD と BSA の存在を認めたのでこれを抗原として免疫学的反応に用いた (図 16)。

4. 皮膚反応

正常家兎 4 例, HMD 肝障害家兎 6 例 (うち血清 TA 活性上昇中のもの 3 例, 正常範囲内のもの 3 例) を使用。上記の方法で作成した HMD-BSA 結合物を 5mg/ml になるように生理食塩水に溶解し, 家兎背部皮内に 0.1ml 注射した。対照としてこれから 3 cm 離して生理食塩水を 0.1 ml 皮内注射した。また正常家兎 3 例, HMD 肝障害家兎 4 例に HMD のプロピレングリコール溶液, および対照としてプロピレングリコールを 0.1 ml 皮内注射し皮膚反応を観察した。

5. 寒天内沈降反応

Ouchterlony 法により検討した。正常家兎血清, HMD 障害家兎血清, HMD-BSA 結合物の生理食塩水溶解物 (5 mg/ml), 障害家兎破壊リンパ, 正常家兎肝, 障害家兎肝の間で沈降抗体の検討を行った。肝は 10 倍量の生理食塩水でホモゲナイズし, 2,000 回転 30 分遠心分離し上清を使用した。おのおの 0.2 ml 使用し 1 ヶ月間観察した。

図 17. HMD 投与家兎血を輸血し, HMD と 6MP を併用投与した際の血清トランスアミナーゼ活性値の変動。

6. PCA 反応

Ovary の方法によりモルモット背部の毛を刈ったのち HMD 障害家兎血清, リンパ, 正常家兎血清, リンパを 0.1ml ずつ皮内注射し, 6 時間後 1% エバンスブルーの生理食塩水中に HMD-BSA 結合物を 5 mg/ml 溶解させ 0.5 ml 静注した。静注後 45 分後に断頭殺害し皮膚を剥離し反応を観察した。

B. 実験成績

1. 6-MP による抑制実験

高 TA 血輸血後 HMD とともに 6-MP を投与していると, 4 例全例において 7 日間血清 TA 活性値は正常であり, 6-MP が早期上昇現象を抑制することが認められた。6-MP 投与により白血球数が減少し, 投与前平均 9,000, 7 日後 6,000, 14 日後 5,000 に減少した。4 例中 3 例は 20 日間までに血清 TA 活性の上昇がみられなかったが, 1 例は輸血後 12 日目から血清 TA 活性値の上昇をきたした (図 17)。

2. 蛍光抗体法

HMD 障害家兎において特異蛍光の局在が認められ, おそらく Kupffer 細胞と思われる部分にその特異蛍光が局在する傾向が認められた。その他の肝細胞核, 毛細胆管には特異蛍光は認められなかった (図 18)。

3. 皮内反応

家兎皮内に HMD のプロピレングリコール溶液を注射すると全例で発赤を起し, プロピレングリコールの直接刺激作用がみられたにすぎなかった。HMD-BSA 結合物の皮内注射では正常家兎, HMD 障害家兎ともに発赤はみられず有意差は見出せなかった。

4. 寒天内沈降反応

障害家兎リンパと障害家兎肝との間に沈降線が認めら

a. 障害家兎肝。蛍光染色。中央部に特異蛍光を認める。

b. 障害家兎肝。蛍光染色。中央部に特異蛍光を認める。

図 18.

れた。7日目ごろから沈降線が出現した。その他障害家兎リンパと正常家兎肝、HMD-BSA 結合物と血清あるいはリンパの間には沈降線は認められなかった (図 19)。

5. PCA 反応

正常家兎リンパでは反応がみられず、正常家兎血清では 2 mm 以下のわずかな着色斑のみで陰性と考えられたが、障害家兎の血清、リンパでは 5×4mm の着色斑がみられた。

IV 考 案

血清 TA 活性の変動に注目し HMD を投与すると個体差はあるが上昇に至るまで2週間ほどの期間を要し、しかもその上昇は投与開始後徐々に上昇するのではなく急激に高値を呈するに至ることが認められた。長期の経過中 TA 活性値がいったん下降後再上昇することもみられ、休薬後の再投与で上昇に至るまでの期間が短縮されることなどアレルギーの関与も推定される。かかる血

図 19. 寒天内沈降反応

清酵素値の変動から考えると、蛋白同化ステロイドにより酵素産生が高まったと考えるより、肝細胞膜に急に变化が起こり、肝細胞膜透過性亢進による酵素の逸脱現象が推定される。BSP 試験の結果では HMD 投与とともに BSP 値が徐々に上昇し、全例で BSP 異常値を示し、蛋白同化ステロイドの BSP 排泄障害作用と TA に対する作用とは同一に論じられないと思われる。

蛋白同化ステロイドの生体内における代謝や生体に及ぼす影響に関して不明の点が多く、肝の反応を十分に解明することは困難であるが、ステロイド核の 17 の位置にアルキル基のついたステロイドが肝障害を起こしやすいことが判明しており、その化学構造が肝組織と反応を起こす上に重要な関係を持っていると思われる。蛋白同化ステロイドの生体内分布をみると肝に多く蓄積し、蛋白と結合する能力を持っており、組織蛋白と結合し抗体を産生する可能性があり、肝の過敏症を起こしうると推

定される。

HMD を家兎に投与してみられた現象がアレルギーによるものか、アレルギーが関与するならどのような型のものかを検討するため移入実験を行った。HMD 投与で血清 TA 活性値の上昇した時期の家兎血を輸血し HMD を投与すると、血清 TA 活性値が上昇するまでの期間が2週間から2日にまで短縮されるという現象を発見した。その理由として考えられることは、

① 高 TA 血中に含まれている TA が移る、

② HMD あるいはその代謝産物が輸血で移され、そのものがあとから加えられた HMD とともに直接肝障害作用を起こす。

③ 輸血により drug metabolizing enzyme など薬剤を処理する生体機構に変化を与え、あとから投与された HMD の作用が早期に強く発現する。

④ 肝障害家兎血中に抗肝抗体など肝障害性の物質が形成されている。

⑤ 輸血により HMD に対するアレルギーが移される。

などの可能性が考えられる。①の可能性に関しては、高 TA 血を輸血してもそれが四塩化炭素障害によるものであれば、HMD を投与しても受血家兎の血清 TA 活性値が上昇しなかったことなどから、酵素がそのまま移されて早期上昇を起こしたとは考えにくい。移入された白血球が HMD その他の作用で細胞内酵素を放出したとしても、白血球内酵素量を考えると白血球の GOT は 108 単位、GPT は 12 単位であり、移された白血球が一度にこわれたとしても血清 TA 活性値が 100 単位以上にまで上昇することは考えられない。

②の可能性については、HMD あるいはその代謝産物が輸血で一部移入されるが、輸血のみでは肝障害は起こさずこれらの物質の単独作用は考えられない。血液中では蛋白と結びついて血清中に大部分存在していると考えられ、とくにリンパ中に高濃度に存在することは考えにくい。また凍結融解の操作で HMD あるいはその代謝産物がこわれて作用を失うことも考えにくい。実験結果を総合して考えると、HMD あるいはその代謝産物の血中濃度が上昇したために、早期上昇が起こったとは考えにくい。

③に関して drug metabolizing enzyme の関与を考慮にしても、単なる輸血では HMD を投与しても早期上昇は起こらず、輸血のみでこの酵素系の阻害が起こったとは考えにくい。

④に関して抗肝抗体も形成されている可能性は否定できないが、受血家兎の TA 活性値上昇に HMD の追加投与が必要なことから、抗肝抗体単独の肝障害作用とは考えにくい。

⑤に関して、アレルギーがリンパ球で移入できるとき、簡単な化学物質をハプテンとしてアレルギー状態を作り、それをリンパ球で移入した報告も多く、この実験においてリンパ球を含んでいる場合にのみ HMD 追加投与で早期上昇がみられたこと、6-MP でこれが抑制されること、再投与で肝障害発現までの時間が短縮されることなどから⑤の可能性のあるものと推定する。血清では移入できずリンパ球を必要とすること、輸血し HMD 追加投与後血清 TA 活性値が上昇するまで 1~2 日要することなどから、遅延型アレルギーに属するものと考ええる。

遅延型アレルギーの受身感作を成立させる必要条件として、1) 一定数 (静脈注射では少なくとも 10^8 個以上) の単核細胞が必要である。2) 細胞は完全に無傷でなければならない、緩和な物理的破壊によっても受身感作力を失う。3) 細胞移入経路は静脈内がもっとも有効で移入と同時に受身感作は成立し、能動感作動物とまったく同様な時間的経過をとってアレルギー反応を発現せしめる^{17,18)}とされている。受身感作は 56°C 30 の加熱で影響されなかったという報告もあり、また破壊細胞から分離された transfer factor により成立する場合もあるが、HMD 肝障害の場合には無傷のリンパ球が必要と考えられる。本実験で移入した白血球数は 10^8 個ほどであった。

アレルギーを抑制するといわれる 6-MP を併用すると、血清 TA 活性の早期上昇が抑制されることが認められた。その作用機序に関して抗体産生の抑制、白血球の増殖の抑制、あるいは酵素産生の抑制など種々の可能性が考えられるが、HMD 肝障害の場合には早期上昇は全例で抑制されたが 1 例は 10 日後に遅れて上昇しており、一定数以上の無傷の白血球が必要であることなどから、6-MP は白血球の増殖を抑制し抗体産生能の低下をきたすものと推定する。

蛋白同化ステロイド投与時の肝の組織像は一般に軽微であると考えられ、本実験においても肝に特異的な変化は見出されなかったが、血清 TA 活性値の異常が強く長期に続いたものはグリソン鞘や胆管周囲の細胞浸潤が強い傾向がみられた。組織像と生化学的所見との関連に関しては、電子顕微鏡や組織化学などより詳細な検討が必要

と思われる。アレルギーの場合、腎など他臓器にも変化が起こる可能性があるが、組織学的に腎には変化を認めず心筋に変化がみられた。即時型アレルギーの受身伝達で心筋障害を実験的に作成した報告¹⁹⁾もあるが、この実験における心筋の変化が HMD によるアレルギー反応が関与しているか否か今後さらに検討を要する問題と思われる。上昇した s-GOT 活性値の一部は心筋由来のものである可能性もあるが、SDH の上昇とともに肝に壊死像もみられ肝が重要な役割を果たしていると思われる。

一般に薬物によるアレルギーの場合、特異的にこれを証明することは困難とされているが、HMD 投与による血清 TA 活性値の上昇機転にアレルギーが関与していることを推定させる所見が得られたため、免疫学的に抗体を検出しようと試みた。遅延型アレルギーは細胞抗体によるとされ、本実験においても血漿の移入では感作できなかったが流血抗体も微量含まれている可能性があり²⁰⁾、流血抗体の検討も行った。

肝を場としてアレルギー反応が起こっていれば、障害肝と正常肝と蛍光抗体法で差が生ずる可能性が考えられる。抗ウサギ γ -グロブリンに蛍光をラベルしてみたところでは、障害肝にわずかに特異蛍光の局在を認められたにすぎず、明瞭な差異は証明できなかった。HMD 障害家兎の HMD による皮膚反応は陰性であったが、PCA 反応は弱陽性に出ており HMD に対する抗体が存在する可能性が考えられる。

オクタロニー法で障害家兎リンパと HMD-BSA 結合物との間に沈降線を証明しえなかったが、目にみえない可能性もありまた条件が適切であったか問題もあり、HMD に対する抗体の存在を否定することはできないと思われる。障害家兎リンパと障害家兎肝との間に沈降線が認められ抗肝抗体様物質が形成されている可能性が考えられる。したがって実験成績から HMD あるいはその代謝産物が生体内で蛋白と結合し抗原性を獲得し、肝障害を惹起するに至る可能性が考えられ、単に色素排泄機構の機能的障害によるだけとは思わず、蛋白同化ステロイド肝障害にアレルギーの関与を推定するのが妥当と思われる。

V 結 論

1. 家兎に蛋白同化ステロイドとして HMD を投与し、血清 TA 活性値の変動に注目し実験を行った。
2. 家兎に HMD を 3mg/kg 毎日投与続けると2週間ほどで血清 TA 活性値が上昇し、片腎萎縮結紮を行う

と高率に上昇がみられる。

3. HMD 障害家兎血を輸血し、HMD を投与すると、1～2日後から血清 TA 活性値の上昇がみられる。

4. 早期上昇を引き起こす物質は白血球中にあり、赤血球や血漿の移入ではこの現象がみられない。

5. 胸管リンパでも同様に移入することができるが凍結融解をくり返し、細胞を破壊したリンパではこの現象がみられなくなる。

6. 1ヵ月以上の休薬期間において再投与すると初回投与時に比較し、より早期に血清 TA 活性値が上昇する。

7. 6-MP により早期上昇の現象が抑制される。

8. 肝組織像では、わずかに散在する壊死、グリソン鞘の細胞浸潤がみられるが、血清 TA 活性値が長期間上昇した例ではグリソン鞘の細胞浸潤が強い傾向がみられた。

9. 蛍光抗体法で HMD 障害肝に Kupffer 細胞と思われる部分に特異蛍光の局在する傾向がみられた。

10. HMD とウシ血清アルブミンと結合させ抗体の証明を試みたところ、皮膚反応は陰性、寒天内沈降反応は陰性、PCA 反応は障害家兎血清中に弱陽性であった。

11. 寒天内沈降反応で障害家兎リンパと障害家兎肝との間に沈降線が出現した。

12. 実験成績から考えて、HMD による肝障害にはアレルギーが関与していると推定した。

稿を終えるにあたり、直接手をとって研究のご指導を賜った恩師 高橋善弥木教授に深謝し、ご指導、ご校閲を賜った中尾喜久教授に厚くお礼申し上げる。また研究にご協力いただいた研究室の武藤泰敏博士、深沢敏男博士、蛍光抗体法をしていただいた長沢俊彦博士、その他多くの研究協力者の皆様に心からお礼申し上げる。また心よく HMD を提供していただいたシオノギ製薬にお礼申し上げる。

文 献 1) Heaney, R. P. & G. D. Whedon: J. Lab. Clin. Med. 52: 169, 1958. 2) 吉利和ほか: 最新医学 21: 1059, 1966. 3) Kory, R. C. et al.: Am. J. Med. 26: 243, 1959. 4) Schaffner, F. et al.: J. Lab. Clin. Med. 56: 623, 1960. - 5) Popper, H. et al.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 104: 988, 1963.

6) Gordon, B. S. et al.: Am. J. Clin. Path. 33: 156, 1960. 7) Wilder, E. M.: Canad. Med. Ass. J. 87: 768, 1962. 8) 冲中重雄ほか: 最新医学 17: 1187,

1962. 9) Schaffner, F. & J. C. Kniffen: Ann. N. Y. Acad. Sci. **104**: 847, 1963. 10) Carmichael, R. H. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **113**: 1006, 1963. 11) 高橋義浩ほか: 医化学シンポジウム第4集: 129, 1964. 12) Schwarz, K. & H. Storck: Dermatologica **132**: 73, 1966. 13) Campbell, J. A. H.: Brit. J. Exp. Path. **42**: 290, 1961. 14) Humphrey, J. H.: Immunological Diseases, Little Brown and company,

Boston, 1965. 15) Borel, Y. & R. Schwartz: J. Immun. **92**: 754, 1964.

16) Zimmering, P. E. et al.: J. Immun. **95**: 262, 1965. 17) 橋本達一郎: 臨床科学 **2**: 793, 1966. 18) Stavitsky, A. B.: Fed. Proc. **16**: 652, 1957. 19) Nishimura, E. T. et al.: Lab. Invest. **15**: 1269, 1966. 20) 進藤宙二: 臨床科学 **2**: 822, 1966.