<原 著>

長期アルコール投与ラットにおける IgA の動態に関する研究

—特に肝組織沈着 IgA について—

西信 正男*

要 旨：アルコール性肝障害における血清 IgA 上昇および肝組織への IgA の沈着が生じる肝障害の程度、機序を明らかにする目的で、ラットのアルコール障害肝モデルにおいて、末梢血、門脈血、胆汁中の IgA 量および肝臓、脾臓、空腸粘膜の IgA 含有量を経時的に測定して IgA の動態をしらべ、肝沈着 IgA については免疫組織化学的に検討した。脂肪肝から軽度の肝線維症に至る段階で血清 IgA 上昇がみられ、空腸粘膜の IgA 含有量が最初に増加し、かつ経時的に著増したことから、増加する血清 IgA は主に空腸粘膜に由来するとの結論を得た。また、ラットのアルコール障害肝モデルにおいては、肝組織への IgA の沈着が脂肪肝の段階でみられ、その出現頻度は、対照群ラットと比べ有意に高く、アルコールの関与が強調される現象であった。肝組織に沈着する IgA の局在を免疫電顕で観察すると、肝細胞内の毛細胆管周囲にある小胞に沈着しているものが主体であった。

索引用語： ラット アルコール性肝障害 Immunoglobulin A 動態
IgA 組織沈着

緒 言

ヒトアルコール性肝障害には高 IgA 血症がしばしばみられ^{1,2)}、特に肝類洞壁に沿った直線状の IgA 沈着が、ヒトアルコール性肝障害に特徴的^{2,3)}といわれているが、ヒトの場合、食事性因子、肝炎ウイルスの関与があり、純粋にアルコールの影響が否か明確には判定しえない。アルコール性肝障害での血中 IgA 値の上昇時期、機序についても一定の見解が得られていないが^{4,5)}、その原因としてアルコール以外の因子を除外できないことがあげられる。したがって、食事性因子、肝炎ウイルスの関与が除外できる動物モデルにおける実験が必要であるが、エタノール障害肝モデルで IgA の動態をみた報告はいまだみられない。今回、著者は長期アルコール投与障害肝ラットにおいて、血中 IgA の上昇時期、由来および肝組織沈着 IgA の出現時期、機序、アルコールとの関連性、肝障害との関係について検討した。即ち、IgA の動態については末梢血、門脈血、胆汁中の IgA 量および肝臓、脾臓、空腸粘膜の IgA 含有量を経時的に測定することにより検討し、肝臓での IgA の局在についても検討した。

対象と方法

1) 実験モデルの作成

a) 胃瘻作成

実験には体重350～450g (10週齢) の Wistar 系雄性ラットを使用した。Pentobarbital 50mg/kg 体重の腹腔内投与にてラットを麻酔し、以下の処置を施行した。正中よりやや左側より開腹し前胃に細径ビニールチューブを挿入し固定した。チューブの対側は、皮下を通して背部に引き出しハーネスと保護コイルの中を通し、ハーネスをラットの背中に装着固定した後、ケージの上方に固定したシーベルに接続した。シーベルの対側はポリエチレンチューブにて持続注入ポンプに接続した。

b) 液体飼料の投与方法

Tsukamoto-French⁶⁾の方法に準じ、21匹のラットに胃瘻を通じてエタノール含有高脂肪食を、持続注入ポンプを用いて1～3カ月継続投与した。対照としてエタノールを同カロリーのブドウ糖で置換した高脂肪食を同様に経胃瘻的に同数のラットに持続投与した。エタノール投与量は、8g/kg 体重/日より開始し、徐々にエタノール投与量、総カロリーを増加させ、2週以後は12g/kg 体重/日のエタノール投与量とした。2週目以降の総カロリーに占める各エネルギー源の割合

* 愛媛大学第3内科

<受付日1992年8月10日>

Fig. 1 Contents of ethanol liquid diets

Alc: ethanol, Prot: ptoein.

The treatment was done at ethanol dose of 8g/kg/day during the first week and from the second week on at 12g/kg/day. The control group was given glucose equivalent in calory to ethanol. From the second week on, ethanol accounted for 42% of the total calory.

は、蛋白質21%, 脂肪22%, ブドウ糖15%, エタノール42%となるようにした (Fig. 1). 当初は Tsukamoto-French の材料と同一の経口投与可能なものを用いたが、沈殿を生じたため、材料を経静脈投与可能なものに変え、ラットが成長可能な範囲で、混濁の原因とされるカルシウムとリン酸の量を減らすことにより、沈殿は生じなくなり、混濁もほとんどなくなった (Table 1). エタノール投与群、対照群ともに1, 2, 3カ月の時点で7匹ずつ屠殺し、以下の実験に供した。

2) 血液生化学的検討

Pentobarbital 麻酔下に開腹し、総胆管にポリエチレンチューブ (PE-10) を挿入し、1時間にわたり胆汁を採取した。胆汁採取後ただちに門脈、下大静脈より採血し脱血により屠殺を行った。下大静脈血を末梢血として使用した。血清 GPT 値は自動分析装置 (Toshiba TBA-380) により測定した。末梢血、門脈血、胆汁中の IgA 量は、ラット IgA 測定用 SRID kit (BDS 社) を用いて測定した。即ち、ラット IgA に対する特異抗血清を含むアガロースプレートの各ウエルに検体の所定量を注入し4日間反応させた。蛋白は放射状に拡散し、対応する抗体と反応して抗原抗体複合物をつくり、白濁して沈降輪を形成した。既知濃度の標準液を用いて作成した標準検定線を使用して、沈降輪の直径より IgA 濃度を測定した。また、屠殺直後に、肝臓、脾臓、空腸粘膜を摘出し、湿重量を測定した。各臓器 0.3~1g に4倍量の PBS (0.1mM phosphate buffer

Table 1 Diet ingredients (/1).

	Tsukamoto-French	Nishinobu
Protein (g)	Lactalbumin 55 hydrolysate	Amino acid 55
Lipid (g)	Corn oil 26	Soybean oil 26
Hydrocarborate (g)	Dextrose 38	Glucose 38
Ethanol (g)	40~60	40~60
Others (g)	Citric acid 1 Tween-80 5	1 (-)
Mineral		
Ca (mEq)	120	60
P (mg)	1,600	1,005
K (mEq)	51	65
Na (mEq)	26	27
Cl (mEq)	144	142
Mg (mg)	35	35
Fe (mg)	20	20
S (mg)	57	55
Zn (mg)	5	5
Mn (mg)	8	8
Cu (mg)	12	12
I (mg)	0.8	0.8
Mo (mg)	0.3	0.3
Vitamin		
A (IU)	3,600	2,500
D (IU)	400	200
E (mg)	20	15
C (mg)	180	100
K (mg)	9	2
Nicotinic acid (mg)	18	20
B ₂ (mg)	4	5
B ₆ (mg)	4	3
B ₁ (mg)	4	5
Panthenol (mg)	12	12
Biotin (μg)	80	200
Folic acid (μg)	360	1,000
B ₁₂ (μg)	5.4	30
Choline chloride (mg)	300	300

Initially, orally administrable food of the original of Tsukamoto-French was used, but precipitates occurred. Then, the composition was switched over to pervenously administrable one, and the amount of calcium and phosphoric acid which were regarded as responsible for the cloudiness were reduced to a viable extent for rats, thereby precipitates disappeared and the cloudiness could hardly be noted.

in 0.9%NaCl, pH 7.4) を加えてホモジナイズし、3,000rpm で15分間遠心し、上清を採取して血清と同様に BDS 社 SRID kit を用いて上清中の IgA 量を測定し、測定値は組織湿重量当りの含有量に換算して表わした。なお、空腸粘膜 IgA の回収率の検討には、IgA 濃度既知の空腸粘膜ホモジネイト上清 (160mg/l) (a) に IgA 濃度の異なる血清 (19, 23, 55, 121, 248mg/

1) (b)を1:1に混和したものについてIgA濃度(c)を測定し、回収率は、 $\{2c/a+b\} \times 100 (\%)$ の式で求めた。

3) 組織学的検討

a) 光学顕微鏡(光顕)的観察

摘出肝の一部は10%ホルマリンにて固定、パラフィン包埋し、HE染色およびAzan染色して鏡検した。

b) 組織沈着 IgA

摘出肝、空腸、脾臓の一部を2%PLP (periodate-lysine-2%paraformaldehyde) 固定液で6時間固定した後、ショ糖加PBSで洗浄し、OCT compoundに包埋し、6 μ mのクリオスタット切片を作成して、中根の酵素抗体直接法⁷⁾に準じてHRP (horse radish peroxidase) 標識抗ラットIgAモノクローナル抗体(ZYM社)を用いてIgAの局在を光顕的に観察した。対照試験として、HRP未標識抗体であらかじめ抗原抗体反応を行った後、標識抗体による反応を行うblock testと、HRP標識抗IgA抗体100 μ lの3検体にそれぞれクロマト精製IgA(BDS社)0.12mg, 0.012mg, 0.0012mgを添加して、室温で30分、4 $^{\circ}$ Cで24時間反応後10,000 $\times$ Gで20分遠心し、その上清を用いてクリオスタット切片と反応を行う吸収試験を行い、染色の特異性を確認した。内因性のperoxidase活性の阻害は、0.3%過酸化水素加メタノールを30分添加して行った。

c) 組織沈着 IgA の免疫電子顕微鏡(電顕)

PLP固定肝より6 μ mのクリオスタット切片を作成し、HRP標識抗体を用いて、4 $^{\circ}$ C12時間酵素抗体直接法を行った。ついで0.1M pH 7.4 phosphate-buffered 1%glutaraldehydeで20分、1%オスミウム酸で2時間固定し、型の如くethanol系列で脱水し、Epok812で包埋後、ウルトラミクロトーム(LKB8800型)により超薄切片を作成し、透過型電顕(日立H800型)を用いて無染色で観察した。観察対象は、エタノール投与群で光顕にてIgAの沈着を認めた5匹とした。

4) 統計学的処理

各群間の統計学的有意差検定は、肝組織へのIgA沈

着の出現頻度については χ^2 test, その他の2群間の平均値の検定はStudent t-testで行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。なお、実験結果はすべてmean $\pm$ SDで表わした。

成 績

1) 光顕的観察

HE染色で全ての小葉の30%以上の領域の肝細胞に脂肪沈着が認められるものをfatty liver mild, 50%以上の領域の肝細胞に脂肪沈着が認められ、かつfatty cystを伴うものをfatty liver moderateとすると、エタノール投与群においては、1カ月の時点で7匹中fatty liver mild 4匹, fatty liver moderate 2匹, 2カ月で7匹中fatty liver mild 5匹, fatty liver moderate 2匹, 3カ月で7匹中fatty liver mild 2匹, fatty liver moderate 5匹と脂肪化がみられたが、対照群にはどの時期にも脂肪沈着は認められなかった。線維化に関しては、エタノール投与群において3カ月の時点で、7匹中びまん性の肝線維症1匹、中心静脈周囲の線維化2匹を認めたが、それ以前のエタノール投与群、対照群には線維化はみられなかった(Table 2, Fig. 2)。

2) 血清 GPT

1, 2, 3カ月で測定した血清GPT値(IU/l)は、エタノール投与群および対照群でそれぞれ115 $\pm$ 31 vs 97 $\pm$ 41, 193 $\pm$ 155 vs 87 $\pm$ 40, 215 $\pm$ 67 vs 89 $\pm$ 35であり、2カ月でエタノール投与群の方が高い傾向にあり、3カ月でエタノール投与群の方が有意に高かった($p < 0.001$), (Table 3)。

3) 末梢血, 門脈血, 胆汁中のIgA量

a) 末梢血

末梢血IgA量(mg/l)は、1, 2, 3カ月の順にエタノール投与群および対照群で84 $\pm$ 20 vs 82 $\pm$ 17, 124 $\pm$ 39 vs 104 $\pm$ 37, 180 $\pm$ 24 vs 128 $\pm$ 21と3カ月で、エタノール投与群の方が有意に多かった($p < 0.01$)。

b) 門脈血

門脈血IgA量(mg/l)は、1, 2, 3カ月の順にエ

Table 2 Histological changes in the livers of rats fed on ethanol diet.

Duration of feeding (Month)	n	Fatty liver			Hepatic fibrosis		
		non	mild	moderate	non	central	diffuse
1	7	1	4	2	7	0	0
2	7	0	5	2	7	0	0
3	7	0	2	5	4	2	1

a

b

Fig. 2 Histological findings of the livers of rats fed on ethanol diet for 3 months
a) fatty liver (HE, $\times 100$), b) hepatic fibrosis (Azan-Mallory, $\times 40$)

Table 3 Time course in serum GPT levels.

		Months on liquid diet		
		1(n=7)	2(n=7)	3(n=7)
S-GPT (IU/l)	E	115 $\pm$ 31	193 $\pm$ 155	215 $\pm$ 67
	C	97 $\pm$ 41	87 $\pm$ 40	89 $\pm$ 35

E: rats fed on ethanol diet, C: control

• : $p < 0.001$

タノール投与群および対照群で 82 ± 20 vs 90 ± 17 , 149 ± 51 vs 100 ± 12 , 167 ± 18 vs 120 ± 39 と2カ月, 3カ月でエタノール投与群の方が有意に多かった ($p < 0.05$).

c) 胆汁

胆汁中IgA量(mg/l)は, 1, 2, 3カ月の順にエタノール投与群および対照群で 44 ± 37 vs 35 ± 26 , 49 ± 22 vs 42 ± 16 , 86 ± 41 vs 46 ± 27 と3カ月でエタノール

Table 4 IgA levels in blood and bile.

			Months on liquid diet		
			1(n=7)	2(n=7)	3(n=7)
IgA (mg/l)	Peripheral blood	E	84 $\pm$ 20	124 $\pm$ 39	180 $\pm$ 24
		C	82 $\pm$ 17	104 $\pm$ 37	128 $\pm$ 21
	Portal blood	E	82 $\pm$ 20	149 $\pm$ 51	167 $\pm$ 18
		C	90 $\pm$ 17	100 $\pm$ 12	120 $\pm$ 39
	Bile	E	44 $\pm$ 37	49 $\pm$ 22	86 $\pm$ 41
		C	35 $\pm$ 26	42 $\pm$ 16	46 $\pm$ 27

E: rats fed on ethanol diet, C: control

• : $p < 0.05$, •• : $p < 0.01$

投与群の方が有意に多かった ($p < 0.05$), (Table 4).

4) 脾臓, 肝臓, 空腸粘膜のIgA含有量

a) 脾臓

脾臓のIgA含有量($\mu\text{g/g}$ wet tissue)は, 1, 2, 3カ月の順にエタノール投与群および対照群で 211 ± 72 vs 179 ± 82 , 154 ± 37 vs 187 ± 37 , 255 ± 95 vs 223 ± 76 といずれの時期においても有意な差は認められなかった。

b) 肝臓

肝臓のIgA含有量($\mu\text{g/g}$ wet tissue)は, 1, 2, 3カ月の順にエタノール投与群および対照群で 447 ± 178 vs 360 ± 162 , 461 ± 164 vs 289 ± 68 , 709 ± 441 vs 431 ± 152 と2カ月, 3カ月でエタノール投与群の方が有意に多かった ($p < 0.05$), ($p < 0.01$).

c) 空腸粘膜

空腸粘膜IgAの回収率は89~105%と良好であり, 空腸粘膜のホモジネイトを血清と同様に測定できることが分かった(Table 5). 空腸粘膜のIgA含有量($\mu\text{g/g}$ wet tissue)は, 1, 2, 3カ月の順にエタノール投与群および対照群で 663 ± 277 vs 412 ± 129 , $1,192 \pm 544$ vs 513 ± 123 , $2,008 \pm 601$ vs 730 ± 93 と1カ月でエタノール投与群の方が多い傾向にあり, 2カ月, 3カ月でエタノール投与群の方が著増しておりかつ有意に多かった ($p < 0.05$), ($p < 0.001$) (Table 6).

5) 臓器IgA含有量とエタノール投与月数との関係

a) 脾臓

脾臓IgA含有量とエタノール投与月数との間には有意な相関は認められなかった。

b) 肝臓

肝臓IgA含有量とエタノール投与月数との間には有意な相関は認められなかった (Fig. 3a).

c) 空腸粘膜

Table 5 Recovery of jejunal mucosal IgA measured by SRID.

a. sample (homogenized jejunal mucosa) (mg/l)	b. standard IgA (serum) (mg/l)	c. values (mg/l)	recovery (2C/a+b, %)
160	19	80	89
160	23	87	95
160	55	97	90
160	121	129	91
160	248	215	105

Serum (b), the standard as known IgA concentration was added to homogenized jejunal mucosa (a), and the half of sum of both (a) and (b) was taken as the theoretical value. Actual measurement was taken as observation (c). Taking the division of (c) by the theoretical value as the rate of recovery, the latter proved to be good, indicating similar measurability of homogenized jejunal mucosa to the serum.

空腸粘膜 IgA 含有量とエタノール投与月数との間には, $r=0.765$, $p<0.001$ と強い有意な正の相関がみられた (Fig. 3b).

d) IgA 含有量の経時的変化

エタノール投与群の各 IgA 量を, 1, 2, 3 カ月の順に, 正常ラットの平均値に対する%で表示すると, 空腸粘膜 IgA 含有量は161, 289, 487と1カ月の時点で増加し始め, その程度が最も顕著であった. 門脈血 IgA 量は100, 180, 203と2カ月の時点で増加し始めた. 肝臓 IgA 含有量は124, 128, 200と3カ月の時点で増加し始めた. 胆汁中 IgA 量は126, 140, 246と3カ月の時点で増加し始めた. 脾臓 IgA 含有量は86, 118, 142と変化は認められなかった (Fig. 4).

Fig. 3a Correlation between liver IgA level and duration on ethanol diet. **Fig. 3b** Correlation between jejunal IgA level and duration on ethanol diet.

6) 組織沈着 IgA の光顕的観察

a) 空腸

エタノール投与群および対照群ともにすべての時期に空腸粘膜固有層の形質細胞内に IgA の染色がみられ, エタノール投与群の方が IgA 染色形質細胞が多くみられた (Fig. 5).

b) 脾臓

エタノール投与期間が1, 2, 3 カ月のラットにつ

Table 6 IgA levels of three kinds of tissues.

			Duration of feeding or liquid diet (Month)		
			1(n=7)	2(n=7)	3(n=7)
Tissue containing IgA	Spleen	E	211±72	154±37	255±95
		C	179±82	187±37	223±76
	Liver	E	447±178	461±164	709±441
		C	360±162	289±68	431±152
	Jejunal mucosa	E	663±277	1,192±544	2,008±601
		C	412±129	513±123	730±93

E: rats fed on ethanol diet, C: control

•: $p<0.05$, ••: $p<0.01$, •••: $p<0.001$

IgA levels: $\mu\text{g/g}$ wet tissue

Fig. 4 Changes in IgA levels in blood and tissue of rats fed on ethanol diet.

The relationship between the period (month) fed on ethanol diet and IgA levels. Each IgA level was expressed as the ratio to the mean value of that of control rats. In view of the initial increase in jejunal mucosal IgA and that to a remarkable extent, increased level of serum IgA in ethanol-fed rats was considered to be derived from jejunal mucosa.

いて検討した。脾臓内の形質細胞と思われる細胞に IgA の染色がみられるが、数はかなり少なく、また、経時的な IgA 含有細胞の増加もみられず、他部位に移行して IgA を産生する可能性はあるが、少なくとも脾臓での IgA 産生は経時的に増加はしていないと考えられた。

c) 肝

投与開始後 1 カ月では、エタノール投与群および対照群ともに光顕的な IgA の沈着は認めなかった。2 カ月以後は、主として毛細胆管に IgA の沈着を認め、類洞内にもわずかながら IgA の沈着を認めた。Fig. 6a はエタノール投与 2 カ月の例であり、弱陽性 (+) とした。主に毛細胆管に IgA の沈着を認めた。Fig. 6b はエタノール投与 3 カ月の例であり、強陽性 (+) とした。毛細胆管に強い IgA の沈着を認め一部類洞内にも IgA の沈着を認めた。2 カ月以後は両群ともに、肝組織に IgA の沈着を認めるものがあつたが、その出現頻度は、2, 3 カ月の順にエタノール投与群および対照群で 7 匹中 4 匹 (57%) VS 7 匹中 1 匹 (14%), 7 匹中 6 匹 (86%) VS 7 匹中 2 匹 (23%) と 3 カ月でエタノール投与群で有意に出現頻度が高かった (Table 7)。

ブロックテストでは、未標識抗体であらかじめ抗原抗体反応を行った切片では未処理の切片に比し、染色

a

b

Fig. 5 Immunohistochemical visualization of IgA in the jejunal mucosa of a rat fed on ethanol diet and the control ($\times 100$).

a) control showing IgA containing cells (plasma cells) in the lamina propria, b) rat fed on ethanol diet showing more numerous IgA containing cells than the control.

性は著しく減弱していた。吸収試験では、 $100\mu\text{l}$ の抗体を 0.12mg , 0.012mg の精製 IgA で吸収した上清では、染色は全く認められず、 0.0012mg を吸収した上清では、やや淡く染色が認められた。

7) 肝組織沈着 IgA の免疫電顕的観察

エタノール投与 3 カ月の例では、肝細胞内の毛細胆管近傍に小胞の増加を認め、その一部の細胞内に反応生成物である IgA を認めた。ミトコンドリア、小胞体は比較的良く保たれていたが、細胞間隙はやや拡大していた (Fig. 7)。類洞内に観察される水胞様構造の内側面に沈着した IgA も一部認められた。また、脂肪の沈着を毛細胆管近くに認め一部に毛細胆管内に放出されつつある像もみられたが、脂肪滴の周囲には反応生成物は認められなかった。

a

b

c

Fig. 6 Microphotographs showing IgA deposition along the bile canaliculi of the liver from rats fed on ethanol diet and the control (immunoperoxidase, $\times 100$)

a) rat fed on ethanol diet for 2 months, IgA deposition (+), b) rat fed on ethanol diet for 3 months, IgA deposition (++), c) control, IgA deposition (-).

Table 7 Hepatic IgA deposition in rats fed on ethanol diet and the control.

Months on liquid diet	groups	n	IgA deposition			
			(-)	(+)	(++)	(+)+(++)
1	E	7	7	0	0	0
	C	7	7	0	0	0
2	E	7	3	3	1	4
	C	7	6	1	0	1
3	E	7	1	2	4	6
	C	7	5	2	0	2

E: rats fed on ethanol diet, C: control

考 案

アルコール性肝障害では血清 IgA の上昇がしばしばみられ、他の肝疾患との鑑別に有用であるといわれているが^{1,2,4)}、アルコール性肝障害のどの段階で血清 IgA が上昇するかについては種々の報告^{2,4,8,9)}があり明確にされていない。Drew ら⁴⁾は、肝障害のない常習飲酒者において正常者に比べ血清 IgA 濃度が増加し、IgA の非特異的抗体産生能も亢進すると述べた。Van de Wiel ら⁸⁾は、ヒトアルコール性脂肪肝において血清 IgA が上昇し、脂肪肝の段階で IgA が上昇するのはアルコール性肝障害のみであると報告した。

a

b

Fig. 7 Immunoelectron micrograph of hepatic IgA deposition of rats fed on ethanol diet for 3 months.

Many small vesicles were seen in the cytoplasm of hepatocyte around the bile canaliculus. The reaction products (arrow) were observed in some of the vesicles.

前ら⁹⁾は、ヒトアルコール性肝障害において肝線維症の段階になると IgA の非特異的産生状態が出現すると述べた。教室の田中²⁾は、ヒトアルコール性肝障害において、脂肪肝およびアルコール性肝炎で IgA は上昇するが、病期が進行した肝硬変になると著増すると述べた。今回の著者の実験では、エタノール投与ラットは対照群ラットに比べ、2カ月の時点で末梢血 IgA が増加し始め、3カ月の時点で有意に末梢血 IgA が増加した。肝組織は、2カ月では脂肪肝、3カ月では脂肪肝～軽度の肝線維化がみられる時期であり、ラットアルコール性肝障害においては脂肪肝～軽度の肝線維化がみられる時期に、末梢血 IgA が増加し、Van de Wiel, 田中の報告とほぼ一致していた。なお、対照群でも経時的に末梢血 IgA が軽度増加していたが、

Ebersole ら¹⁰⁾によれば加齢により正常ラットの末梢血 IgA が経時的に上昇するといわれており、著者の対照群でみられた末梢血 IgA の上昇は Ebersole らの観察した加齢による IgA 増加にほぼ一致していたので、加齢の影響と考えられる。

アルコール性肝障害で上昇する血中 IgA の由来についても一定の見解は得られていない。嵐ら¹¹⁾は、リンパ球培養上清中の IgA の分子性状をみることにより、ウイルス肝炎を含むヒトの慢性肝疾患において上昇する IgA が、腸管粘膜のバイエル板を含む GALT (gut associated lymphoid tissue) で産生されるのか、全身免疫系で産生されるのかについて検討した。即ち、骨髓血リンパ球が主として monomeric IgA を産生するのは対照的に、末梢血リンパ球で産生される IgA は GALT のリンパ球と同様に dimeric IgA が主体であり monomer が主体の血清 IgA のパターンと異なると述べ、末梢血リンパ球には GALT 由来の IgA 産生細胞へと分化しうる前駆細胞が多く含まれていると考え、ヒト慢性肝疾患において上昇する IgA の由来は主として GALT であると報告した。一方、木下ら¹²⁾は、肝障害のない長期アルコール投与マウスにおいて、血中 IgA 抗体量およびバイエル板、脾臓、骨髓での IgA の非特異的抗体産生能を検討した。IgA の非特異的抗体産生能はアルコール投与により増大するが、主体となる臓器は飼料中の抗原により異なり、微生物由来の抗原では脾臓が主体であり、食餌性抗原ではバイエル板が主であり、血中 IgA 量を増加させる程強い影響がみられるのは食餌性抗原を投与したときのみで、バイエル板がアルコール投与時の IgA の主な供給源であると報告した。以上の如く GALT において抗原刺激を受けた IgA 産生前駆細胞が腸管リンパ節を経て大循環に移行、成熟し、腸管を含む局所粘膜に到達し IgA 抗体産生を行うという homing 現象¹³⁾を示唆する所見がみられ、血中 IgA の由来はバイエル板が主体と思われるが、肝障害時において、重要な網内系である肝臓、脾臓の IgA 産生への関与を検討する必要があると考えられた。今回の著者の実験では、直接、末梢血、門脈血、胆汁中の IgA 量および肝臓、脾臓、空腸粘膜の IgA 含有量を測定したが、アルコール投与後1カ月では空腸粘膜の IgA 含有量のみ増加し、2カ月の時点で門脈血 IgA 量、肝臓の IgA 含有量が増加し、3カ月の時点で末梢血、胆汁中の IgA 量が増加し、脾臓の IgA 含有量は全経過を通じて増加しなかった。これらの結果よりアルコール性肝障害での増加した血中 IgA の

産生臓器を考察すると、まず最初に増加傾向が出現し経時的に増加することより空腸粘膜が産生部位の主体であり、肝障害出現時においても脾臓の関与は少ないとの結論を得た。IgAは腸管粘膜のIgA産生形質細胞より産生され、その多くはdimeric IgAとして腸管内に分泌され、一部は循環血液中に放出されるといわれているが¹⁴⁾、空腸粘膜でのIgA増加に引き続き門脈血IgAの増加が起こることより空腸粘膜から門脈血中への移行が示唆された。また、ラット正常肝では血中IgAは速やかに胆汁に排泄されるといわれているが¹⁵⁾、アルコール投与2カ月の時点で門脈血IgA量、肝臓のIgA含有量が増加しているにもかかわらず、胆汁IgA量は増加しておらず、肝内でのIgAの停滞が示唆された。

さらに、アルコール投与後3カ月で、肝臓のIgAの増加に遅れて胆汁IgAが増加し、門脈血IgAの増加に遅れ末梢血のIgAが増加することより、肝内でのIgAの停滞機構の解除あるいは破綻が示唆された。なお、エタノールが腸管粘膜のバリアを破壊し、エンドトキシンや細菌などの異物の透過性を亢進させ、腸管局所での感染や異物刺激に対する免疫応答を亢進させ、IgAの産生を増加させる¹⁶⁾ともいわれており、経口摂取したエタノールの大部分を吸収する上部消化管である空腸がエタノールの影響を最も受け易く、GALTの一部であるパイエル板も豊富であると思われる。

また、腸管粘膜にはIgA1のみ特異的に分解するIgA1 proteaseを産生する細菌の存在が知られており、空腸粘膜ホジネイト中のIgAを測定する際の影響を検討するために回収試験を行った。回収率は89~105%と良好であり、IgA1 protease産生菌の影響およびIgA以外の物質による測定値への影響は無視できると思われた。また、エタノール投与期間、即ち総エタノール投与量と空腸粘膜のIgA含有量とが有意な強い正の相関を示すことより、血中IgAの主な供給源である空腸粘膜でのIgA産生の増加は、直接、エタノールの影響と結論した。

蛍光抗体法による研究でKaterら³⁾により最初に指摘されて以来、肝類洞壁に沿った線状のIgAの沈着は、ヒトアルコール性肝障害に特徴的といわれているが、教室の田中²⁾はアルコール以外でも肝硬変のように障害の程度が強くなると顆粒状の沈着パターンが出現し、肝へのIgAの沈着は、肝障害の程度とも関係すると報告している。今回のアルコール性障害肝ラットにおける免疫電顕的検討では、ヒトの報告と異なり肝

細胞内の毛細胆管周辺に主としてIgAの沈着がみられ、その出現頻度は対照群ラットと比べ2、3カ月の時点では有意に高かった。この肝組織へのIgAの沈着は、アルコールにより増強されるという結論を得た。肝組織へのIgA沈着の局在については、ヒトアルコール性肝障害において免疫電顕で検討されており、教室の田中¹⁷⁾は、肝類洞内皮細胞の胞体内に均一な反応生成物として観察されると述べ、天野、名倉ら¹⁸⁾はKupffer細胞や類洞内皮細胞の表面および内皮細胞と肝細胞の間に介在する膠原線維や細線維上にあると報告している。今回のラットアルコール性障害肝モデルでの検討では、肝細胞内の毛細胆管周囲の小胞に反応生成物として認められるものと、類洞内に観察される水胞様構造物の内側面に沈着するものがあり、前者が主体であった。小胞内に認められるIgAが、IgA単独なのか、IgA抗原抗体複合物なのか今回の検討では明らかでなく、今後の検討課題と思われた。肝組織へのIgAの沈着部位がヒトと異なる機序として、ラットでは線維化が軽度で、ヒトよりIgAの胆汁への移行がよいことより¹⁹⁾、IgAが移送され易く類洞側よりも毛細胆管側に沈着したと考えられる。

結 論

アルコール性肝障害における血清IgA上昇の時期、成因および肝組織へのIgAの沈着の部位、出現時期、機序を明らかにする目的で、ラットのアルコール障害肝モデルにおいて、末梢血、門脈血、胆汁中のIgA量および肝臓、脾臓、空腸粘膜のIgA含有量を経時的に測定することによりIgAの動態を検討し、肝組織沈着IgAの光顕、電顕酵素抗体法による観察を行い、以下の成績を得た。

1) ラットのアルコール障害肝モデルにおいて、脂肪肝から軽度の肝線維症の肝障害度で血清IgA上昇がみられた。

2) 空腸粘膜でのIgA含有量が最初に増加しかつ経時的に著増することより、増加する血清IgAの主な由来は空腸粘膜と考えられた。

3) 脾臓のIgA含有量が経時的な変化を示さなかったことより、増加する血清IgAの由来として脾臓の関与は乏しい。

4) 肝臓のIgA含有量が経時的に増加するにもかかわらず、胆汁IgA濃度が遅れて上昇することより、肝内でのIgAの停滞が示唆された。

5) ラットのアルコール障害肝モデルにおいては肝組織へのIgAの沈着が脂肪肝の段階でみられ、その出

現頻度は、対照群ラットと比べ有意に高く、アルコールの関与が示唆された。

6) 肝組織に沈着する IgA の局在を免疫電顕で観察すると、肝細胞内の毛細管周囲にある小胞に反応生成物として認められるものが主体であった。

本論文の要旨は第27回肝臓学会総会(1991)にて発表した。

稿を終るに臨み、御指導御校閲を賜った太田康幸教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、本研究に際し、終始御教示頂いた赤松興一助教授、田中美和博士、金岡光雄博士ならびに谷本憲治技官に深謝致します。

文 献

- 1) Wilson ID, Onstard G, Williams RC, et al: Serum immunoglobulin concentrations in patients with alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 57: 59—67, 1969
- 2) 田中美和: アルコール性肝障害における IgA の診断的意義. *肝臓* 28: 1550—1557, 1987
- 3) Kater L, Jobsis AC, Baart De La Faille-Kuyper EH, et al: Alcoholic hepatic disease. Specificity of IgA deposits in liver. *Am J Clin Pathol* 71: 51—57, 1979
- 4) Drew PA, Clifton PM, Labrooy JT, et al: Polyclonal B cell activation in alcoholic patients with no evidence of liver dysfunction. *Clin Exp Immunol* 57: 479—486, 1984
- 5) 石井邦英, 佐田通夫, 松尾義人, 他: アルコール性肝障害における高 IgA 血症について, 特に血中 IgA の分子性状と腸管局所での IgA 含有細胞の検討を中心に. *肝臓* 29: 882—891, 1988
- 6) Tsukamoto H, Townner SJ, Ciofalo LM, et al: Ethanol induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology* 6: 814—822, 1986
- 7) Nakane PK, Kawanoi A: Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem* 10: 161—171, 1977
- 8) Van de Wiel A, Van Hattum J, Schurman HJ, et al: Immunoglobulin A in the diagnosis of alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 94: 457—462, 1988
- 9) 前 素直, 泉 並木, 蓮村 清, 他: アルコール性肝障害と血清 IgA の上昇. 末梢血リンパ球培養による成因の検討. *アルコール代謝と肝* 6: 309—317, 1987
- 10) Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ, et al: Secretory immune responses in aging rats. *Immunology* 56: 345—350, 1985
- 11) Arashi Y, Akahonai Y, Yati A, et al: Molecular forms of IgA produced by various lymphoid tissues analysis using high speed liquid chromatography. *Gastroenterol Japonica* 22: 709—715, 1987
- 12) 木下國浩, 狭間真澄, 東野 正, 他: アルコールによる抗体産生の増幅. *アルコール代謝と肝* 8: 258—261, 1989
- 13) Graig SW, Cebra JJ: Pyers, patches: An enriched source of precursors for IgA producing immunocyte in the rabbit. *J Exp Med* 134: 188—200, 1971
- 14) Brandtzaeg P: Two types of IgA immunocytes in man. *Nature (New Biol)* 243: 142—143, 1973
- 15) Orlans E, Peppard J, Raynold J, et al: Rapid active transport of immunoglobulin A. *J Exp Med* 147: 588—592, 1978
- 16) Bjarmason I, Ward K, Peters TJ: The leaky gut of alcoholism: Possible route of entry for toxic compounds. *Lancet* 1: 179—182, 1984
- 17) 田中美和: 肝類洞壁沈着 IgA の研究, 特に電顕的局在に関連して. *肝臓* 28: 1451—1459, 1987
- 18) Amano K, Tsukada K, Takeuchi T, et al: IgA deposition in alcoholic liver disease. An immunoelectron microscopic study. *Am J Clin Pathol* 89: 728—734, 1988
- 19) Takahashi I, Nakane PK, Brown WR: Ultrastructural events in the translocation of polymeric IgA by rat hepatocytes. *J Immunol* 128: 1181—1187, 1982

Increased serum IgA and IgA deposition in the liver of rats fed on ethanol

Masao NISHINOBU*

To clarify the mechanisms of elevated serum IgA levels and hepatic IgA deposition in alcoholic liver diseases, IgA of peripheral and portal blood, bile and homogenized tissues (liver, spleen and jejunal mucosa) was measured and hepatic IgA deposition was visualized immunohistochemically in rats fed on alcohol. Jejunal IgA concentration increased progressively with the severity of liver injury. IgA of the spleen showed no remarkable changes at any stage of alcoholic liver injury. These elevated serum IgA in alcoholic liver disease may thus mainly be caused by the overproduction of IgA in the jejunal mucosa. In immunohistochemical study, IgA was visualized in the liver. The incidence of hepatic IgA deposition in rats fed on ethanol significantly increased beyond that in control rats. By immunoelectronmicroscopy, hepatic IgA deposition corresponded to reaction products in the vesicles mainly in hepatocyte adjacent to the bile canaliculi.

* Third Department of Internal Medicine, Ehime University School of Medicine (Ehime)