肝炎および肝硬変症における免疫細胞化学的検討*

藤 中 新 生**

緒 言

肝炎の慢性化に自己免疫機転が関与しているかどうか、もし関与しているとすればいかなる形で関与しているかという問題に関しては、多数の研究結果が報告されているが、いまだ解決をみていない。

Witebsky¹⁾は免疫血清学的見地から、自己免疫疾患であることの証明として次の条件をあげている。1) 体温下で作用する遊離の循環抗体を直接証明するか、細胞鉤着性抗体を間接的な方法で証明する。2) このような抗体と特異的に反応する抗原を証明する。3) このような抗原を用いて実験動物に抗体の産生を証明する。4) この抗原で感作された実験動物組織にヒトの疾患と同様の組織学的変化を同一の臓器に証明する。これらの観点から肝疾患の病態を把握せんとして、いろいろの研究が行なわれており、ことに肝疾患のさいの肝組織と反応する血中抗体の存在は1933年にHughes²⁾が重症黄熱病で報告して以来、補体結合反応³⁻¹²⁾、沈降反応¹³⁾、Ouchterlony法¹⁴⁾、感作血球またはコロジウム凝集反応と蛍光抗体間接法^{15, 16)}、感作血球凝集反応と補体結合反応¹⁷⁾、抗グロブリン消費試験¹⁸⁾、Prausnitz-Küstner法¹⁹⁾、Schultz-Dale法²⁰⁾、蛍光抗体間接法²¹⁻²⁶⁾などによつて証明されている。上田ら²⁷⁾は肝疾患時の抗肝抗体はグリソン鞘の細胞浸潤や線維化等となんらかの関連をもつて血中に出現するものと推測しているが、肝機能障害の程度、肝病変の進展とは無関係で、同一症例の経過中の抗肝抗体の出没は

臨床像の推移と関連性がないので、血中抗体の存在は肝病変の成因に重要な役割を演じているとは結論しがたく、むしろ二次性の因子であるとのべている。一方、長島²⁸⁾はウイルス性肝炎でポール・パンネル反応凝集価の上昇、自己赤血球に対する不完全抗体の出現を認めているが、肝自己抗体の高値を示す例でも肝組織像に病変の少ない症例のあることから、肝細胞の変化と自己抗原性の獲得との間にはかなりの巾のあることを予想している。しかし肝自己抗体の認められた例では症状の改善が少ないので、肝自己抗体は肝炎の経過になんらかの修飾を与えるものと推測している。松橋²⁹⁾によると血中抗体は生体の破壊産物と結合して血中からこれらの物質の除去を行なうと考え、このような機構をimmunoclearanceと命名している。血中に抗肝抗体を証明したというこれらの報告は、急性あるいは慢性の肝疾患に免疫反応が惹起されていることを暗示はしているが、肝疾患の病態にいかなる役割を演じているかの点では十分解明されていないことを意味する。一方、これらの報告の大部分は抗原として同種または異種の肝組織を用いており、またin vitroでの成績のため検出された血中抗体は真の意味の自己抗体とはいえない。それには抗原として自己の肝組織を用いる必要があり、また抗原と自己抗体との結合物または細胞鉤着性自己抗体を病肝の壊死巣内にin vivoで証明しなければならないが、かかる報告は乏しい。

私は肝炎の慢性化および肝硬変の成立に対する自己免疫機転の関与と、ステロイドホルモンの自己免疫機転に対する効果を検討する目的で、Coonsの蛍光抗体法の変法を用い、四塩化炭素投与ダイコクネズミとステロイドホルモン併用ダイコクネズミの血清および肝について免疫細胞化学

* Immunocytochemical Investigation of Hepatitis and Hepatic Cirrhosis. 要旨は第7回日本消化器病学会秋季大会、日本消化器病学会第52回総会、第3回世界消化器病会議にて発表した。

** Y. Fujinaka: 新潟大学木下内科(指導: 木下康民教授)。

的検討を行なった。また、ウイルス性肝炎の進展過程に対する自己免疫機転の関与を臨床の面より把握すべく、ヒトの肝疾患の血清および肝についても免疫細胞化学的検討を行ない、いずれの場合においても、とくに障害肝細胞に抗原抗体結合物または細胞鉤着性抗体の検索につとめた。その結果、若干の知見をえたのでここに報告する。

実験材料と方法

I. 実験動物

A) 四塩化炭素障害肝における抗原抗体結合物または細胞鉤着性抗体の検討

実験前 1～2 週間オリエンタル製固形飼料と甘藍または水を自由に摂取せしめて飼育した体重 80～250 g の雌性ダイコクネズミ 178 匹を次の 9 群に分類した。なお、実験期間中も同一の飼料をもつて飼育した。

四塩化炭素単独投与群は 2 週から 9 週まで毎週、その他の群は 4 週と 8 週に、エーテル麻酔下で開腹開胸後心臓穿刺により採血致死せしめ、その肝について検討した。

- 1) 四塩化炭素週 2 回単独投与群 (39 匹)
- 2) 四塩化炭素およびプレドニソロン週 2 回投与群 (16 匹)
- 3) 四塩化炭素週 2 回およびプレドニソロン毎日投与群 (15 匹)
- 4) プレドニソロン週 2 回投与群 (21 匹)
- 5) プレドニソロン毎日投与群 (21 匹)
- 6) オリーブ油週 2 回投与群 (20 匹)
- 7) オリーブ油週 2 回および生理的食塩水毎日投与群 (20 匹)
- 8) オリーブ油および生理的食塩水週 2 回投与群 (20 匹)
- 9) エーテル麻酔群 (6 匹)

B) 四塩化炭素障害肝における抗原抗体結合物または細胞鉤着性抗体と血中抗肝抗体の検討

四塩化炭素週 2 回単独投与ダイコクネズミ 41 匹を次の 8 群に分類し 2 週から 9 週まで毎週、エーテル麻酔下で開腹開胸後心臓穿刺により採血致死せしめ、その肝と血液について検討した。未処置群 10 匹については 4 週と 8 週に同様な方法で検討した。

- 1) 投与 2 週間の群 (3 匹)
- 2) 投与 3 週間の群 (3 匹)

- 3) 投与 4 週間の群 (11 匹)
- 4) 投与 5 週間の群 (3 匹)
- 5) 投与 6 週間の群 (3 匹)
- 6) 投与 7 週間の群 (3 匹)
- 7) 投与 8 週間の群 (10 匹)
- 8) 投与 9 週間の群 (5 匹)
- 9) 未処置群 (10 匹)

C) 四塩化炭素 1 回注射後の血中抗肝抗体の検討

ダイコクネズミ 32 匹を次の 6 群に分類し、四塩化炭素 1 回筋注後 1 日から 5 日まで毎日、エーテル麻酔下で開腹開胸後心臓穿刺によりえた血液について検討した。

- 1) 投与後 1 日の群 (5 匹)
- 2) 投与後 2 日の群 (5 匹)
- 3) 投与後 3 日の群 (5 匹)
- 4) 投与後 4 日の群 (4 匹)
- 5) 投与後 5 日の群 (3 匹)
- 6) 未処置群 (10 匹)

II. 四塩化炭素とプレドニソロン

四塩化炭素はダイコクネズミの体重 100 g について 0.075 cc を等量のオリーブ油に混じて大腿に筋注した。プレドニソロンは体重 100 g について 0.05 mg を生食水 0.15 cc に溶解して大腿に筋注した。プレドニソロン併用群では四塩化炭素とプレドニソロンの筋注を左右の大腿に別々に行なつた。

III. 扱った患者血清および肝

入院中の肝疾患ならびに対照疾患 68 名で臨床症状、検査所見 (血清タンパク像は濾紙電気泳動法、肝機能検査は BSP 30 分値、TTT, ZTT, CCLF による膠質反応、血清トランスアミナーゼ活性)、組織学的所見等を総合して診断の確実な症例を対象とした。その疾患の内訳は、伝染性肝炎 7 例、血清肝炎 8 例、慢性肝炎 15 例、肝硬変 7 例、発作性夜間血色素尿症 1 例、サルコイドーシス 5 例、SLE 1 例、梅毒およびうつ肝 1 例、二次性クワッシャーカー 1 例、胃潰瘍 2 例、胃癌 19 例の計 68 例である。

IV. 蛍光抗体法

蛍光抗体法は Coons ら⁸⁰⁾の方法の変法を用いた。抗原と自己抗体との結合物または細胞鉤着性自己抗体の検出のためには、ダイコクネズミの場合は切除肝について、ヒトの場合は生検肝または切除肝について蛍光抗体直接法で検討した。流血中の抗肝抗体の検出のためには、ダイコクネズミの場合は心臓穿刺により、ヒトの場合は肘静脈より採血した血清について蛍光抗体間接法で

検討した。

1) 螢光抗体直接法

A) 標本の作製：ダイコクネズミの摘出肝は可及的速やかに約 10 mm 四方のブロックとし、ドライアイスアセトンで -74°C にあらかじめ冷却されたノーマルヘキサンの中に約 30~60 秒間浸して凍結後、サランラップとパラフィルムで二重に包んで -20°C のストッカー中で保存した。ヒトの肝は生検後ただちに約 10 mm 四方のアルミ箔に入れた卵白に包埋後、切除肝はただちに同様操作で凍結保存した。生検肝の一部については 95% アルコールで固定後、10% ゲラチン液にて一夜 37°C で包埋後凍結を行ないストッカー中で保存した。凍結肝ブロックは用時ストッカーの中から取り出し、 -15°C のクリオスタット中で少量の pH 7.2 の磷酸緩衝生食液で金属性ブロックに凍結、ミノー型ミクロトームで厚さ 4μ の切片とし、良質の A 級無螢光載物ガラス ($76\times 26\times 1\text{mm}$) にのせて指の先で温めてはりつけた後、ただちに扇風機で風乾、室温で特級アセトンで 5 分間固定後、同様風乾した。一部の切片は未固定のまま使用した。

B) 染色方法：上述の載物ガラス上のアセトン固定切片は pH 7.2 の磷酸緩衝生食液で軽く洗浄後風乾してから、未固定切片はそのまま pH 7.2 の磷酸緩衝生食液を毛細管ピペットで 2~3 滴重ねた後、さらに螢光抗体液を同量滴下し、蒸発を防ぐために湿った濾紙を底に敷いた有蓋シャーレの中に入れ、 37°C 30 分間反応させた。次いで載物ガラスをシャーレより取り出し、pH 7.2 の磷酸緩衝生食液を載物ガラス上に十分に盛り、15 分間に数回同液を盛りなおして十分洗浄後、扇風機で風乾してから 90% グリセロール磷酸緩衝生食液を滴下し、カバーガラスで被った。pH 7.2 の磷酸緩衝生食液の組成は食塩 12 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.85 g, 蒸溜水 1.5 l であり、冷蔵庫に保存した。90% グリセロール磷酸緩衝生食液は特級グリセロールと上述の pH 7.2 の磷酸緩衝生食液をおのおの 9 対 1 の割合で混合したものである。螢光抗体液はダイコクネズミの場合、シルバーナ社製の fluorescein isothiocyanate 標識 rabbit anti rat globulin globulin (Lot No. 092864 D) を使用した。ヒトの場合は東大伝研試験製造室で作成した抗ヒト γ -グロブリン・F.I.T.C.・ラベル・兎 γ -グロブリンを使用した。

C) 観察：螢光顕微鏡は日本光学工業株式会社の螢光顕微鏡装置、または千代田螢光光源と暗視野顕微鏡装置で UV 系または BV 系励起フィルターを用いて観察し

た。写真撮影には Kodak TRI-X Pan (ASA 400) と Anscochrome (ASA 200) を使用し、露出時間はそれぞれ 1 分と 2~3 分である。

D) 非特異的染色因子の除去

1) マウス肝粉末の作製法

Coons, Leduc, Connolly ら⁸¹⁾の方法によつた。すなわち新鮮なマウス肝 25 g を鉄で細切後、等量の生食水を加え、周囲に氷をつめたホモブレンダーで乳剤を作る。この乳剤をビーカーに入れ、攪拌しつつ 4 倍量の特級アセトンを加えて 2~3 分静置してから上清液を静かに捨て、沈渣を 2,000 rpm 30 分間遠心し、これを数回生食水で洗浄遠心し、上清液中に血液の色調がなくなるまで繰り返した。次にこの沈渣に等量の生食水を加え、攪拌しながら 4 倍量の特級アセトンを加え 3 分放置したのち上清を捨て、これに 4 倍量の特級アセトンを加えて懸濁液を作り Buchner 濾斗で吸引後、室内に放置、 37°C 一夜乾燥後、密栓をして 4°C で貯えた。

2) 吸収法

川村ら⁸²⁾の方法に従つた。すなわち 100 mg のマウス肝粉末を試験管にとり、2 cc の生食水を加えて室温放置後、12,000 rpm で 30 分間遠心し、沈渣に螢光抗体液 1 cc を加えて攪拌し、室温に 1 時間放置してのち 12,000 rpm 30 分間遠心してえた上清に、上述と同様にあらかじめ生食水で洗浄した 50 mg のマウス肝粉末を加え、室温に 1 時間放置後 12,000 rpm で 30 分間遠心してえた上清を染色に用いた。

E) 対照染色：螢光が認められた場合、これが免疫学的に特異的なものかどうかを確認するために、Coons ら⁸⁰⁾, Freedman ら⁸³⁾の方法に従つた。

1) 未標識の抗体液で切片を前処置後、螢光抗体液で染色した。本研究では螢光は認められなかつた。

2) ヒト γ -グロブリンと抗ヒト γ -グロブリン・F.I.T.C.・ラベル兎 γ -グロブリン、ダイコクネズミグロブリンと抗ダイコクネズミグロブリン・F.I.T.C.・ラベル兎グロブリンをあらかじめ試験管内で作用させた後、肝切片を染色した。本研究では螢光は認められなかつた。

3) 種族特異性を検する目的で、特異螢光陽性例のブロックからえたダイコクネズミ肝切片を抗ヒト γ -グロブリン・F.I.T.C.・ラベル兎 γ -グロブリンで染色した。本研究では螢光は認められなかつた。

F) Elution Procedure: Freedman ら⁸⁴⁾の方法に従い、特異螢光として認められたグロブリンが抗体性か否

かを検した。すなわち、特異蛍光陽性例のブロックからえた肝切片を pH 7.2 の磷酸緩衝生食液で洗浄後、pH 3.3 のクエン酸緩衝液で 5~30 分間室温処理後、pH 7.2 の磷酸緩衝生食液で洗い蛍光抗体直接法を実施した。その結果、elution 5 分では蛍光の減弱は認められないが、15 分で著明な減弱を、20 分で完全な消失を認めたので、特異蛍光として認められたグロブリンは抗体性のグロブリンと推定した。臨床例にはこの操作は実施しなかつた。pH 3.3 のクエン酸緩衝液の組成はクエン酸 21.008 g を 1 N-NaOH 200 cc にとかし水 1000 cc にうすめて作つた 0.1 M-クエン酸ソーダー 4.5 cc に、0.1 N-HCl 5.5 cc を加えたものである。

2) 蛍光抗体間接法

反応をうける肝組織としては、ダイコクネズミの場合には組織学的に正常な同種ダイコクネズミの肝を、ヒトの場合には組織学的にも機能的にも異常のない切除肝を材料として、クリオタットで 4 μ の凍結切片とし未固定のまま使用した。すなわち、上述の肝切片に被検血清を 37°C 30 分間作用させた後、pH 7.2 の磷酸緩衝生食液で 15 分間洗い、あらかじめマウス肝粉末で吸収を行なつた蛍光抗体液を 37°C 30 分間作用させ、次いで再度 pH 7.2 の磷酸緩衝生食液で 15 分間洗浄後扇風機で風乾し、90% グリセロール磷酸緩衝生食液を滴下しカバーガラスで被い、蛍光顕微鏡で観察した。観察の方法、非特異的染色因子の除去、対照染色、elution procedure は直接法の場合に準じた。

V. 光学顕微鏡による検査

ダイコクネズミおよびヒトの肝ブロックは蛍光抗体法で検する一方、ヘマトキシリンエオジン (H-E) 染色、アザンマロリー (A-M) 染色、ズダンⅢ染色も実施した。

VI. 肝病変と抗体との関係について

肝病変の度合と細胞鉤着性抗体、循環抗体との関係についても若干の検討を行なつた。

結 果

I. 動物実験

A) 光学顕微鏡による所見

実験 A), B) の四塩化炭素投与 4 週群と 8 週群において、四塩化炭素単独投与ダイコクネズミ 40 匹、およびブレドニソロン併用ダイコクネズミ 31 匹、合計 71 匹の光学顕微鏡による所見を比較検討してみると、四塩化炭素投与 4 週間では、四塩化炭素単独投与群、ブレド

図 1. 四塩化炭素投与 4 週 (A-M)
軽度の線維増生があるが偽小葉形成はない。

図 2. 四塩化炭素投与 4 週 (H-E)
肝細胞索の乱れ、脂肪化が軽度にある。

図 3. 四塩化炭素投与 4 週 (H-E)
肝細胞壊死、星細胞動員、細胞浸潤等が軽度

ニソロン毎日および間歇併用群の 3 群とも線維増生は軽度であり、偽小葉の形成はまだみられず(図 1)、肝細胞索の乱れ、脂肪化、壊死、星細胞の動員、細胞浸潤等が軽度ながらみられた(図 2, 3)。四塩化炭素投与 8 週間では 3 群とも線維増生が高度となり、偽小葉の形成があり

図 4. 四塩化炭素投与8週 (A-M)
高度の線維増生と偽小葉形成

図 7. 四塩化炭素投与8週 (H-E)
小葉周辺部の肝細胞の切り崩し現象

図 5. 四塩化炭素投与8週 (H-E)
著明な細胞浸潤

図 8. 四塩化炭素投与8週 (H-E)
胆管増生と細胞浸潤を伴った小葉内線維伸展

図 6. 四塩化炭素投与8週 (H-E)
肝細胞壊死, 胞脂肪化等が高度

図 9. 四塩化炭素投与8週 (H-E)
間質での胆管の増生

(図4), 肝細胞の壊死, 脂肪化, 細胞浸潤等が著明となり(図5, 6), 小葉周辺部の肝細胞の切り崩し(図7), 胆管の増生(図8, 9), 静脈腔の拡大等がみられた。偽小葉形成を各群についてみると四塩化炭素単独投与群では18匹中7匹, プレドニソロン毎日併用群と間歇併用

群ではいずれも8匹中3匹ずつであつた(表1)。

B) 蛍光抗体法による所見

1) 実験 A) における成績は表2のごとくで線維増生が軽度に見られる4週で障害された肝細胞に抗体性と推定されるグロブリンを認めるものは, 四塩化炭素単独

表 1. Light microscopic study of CCl₄ induced hepatic damages in rats

Number of Rat.	Treatment	Treatment weeks	Fibrous proliferation	Pseudobule formation	Necrosis of hepatic cell
22	CCl ₄ (twice in a weeks)	4	+	—	+
8	CCl ₄ (twice in a week) with prednisolone (every day)	4	+	—	+
7	CCl ₄ with prednisolone (twice in a week)	4	+	—	+
18	CCl ₄ (twice in a week)	8	##	7/18	##
8	CCl ₄ (twice in a week) with prednisolone (every day)	8	##	3/8	##
8	CCl ₄ with proednisolone (twice in a week)	8	##	3/8	##
71	Total				

表 2. Fluorescent microscopic study of CCl₄ induced hepatic damages in rats

Number of Rat.		Treatment	Treatment weeks	Number of rats showing localization of "Localizing Antibody" in		
Total				Hepatic cell	Infiltrative cell	Hepatic cell & infiltrative cell
39	3	CCl ₄ (twice in a week)	2	0	0	0
	3		3	0	0	0
	11		4	1	0	0
	3		5	0	0	0
	3		6	0	0	0
	3		7	0	0	0
	8		8	1	1	1
	8		9	1	0	0
	5					
16	8	CCl ₄ with prednisolone (twice in a week)	4	2	0	0
	8		8	0	2	1
15	7	CCl ₄ (twice in a week) with prednisolone (every day)	4	3	0	0
	8		8	3	1	0
21	11	Prednisolone (twice in a week)	4	0	0	0
	10		8	0	0	0
21	11	Prednisolone (every day)	4	0	0	0
	10		8	0	0	0
20	10	Olive Oil (twice in a week)	4	0	0	0
	10		8	0	0	0
20	10	Olive oil (twice in a week) with saline (every day)	4	0	0	0
	10		8	0	0	0
20	10	Olive oil with saline (twice in a week)	4	0	0	0
	10		8	0	0	0
6	3	Ether anaesthesia	4	0	0	0
	3		8	0	0	0
178		Total		11	4	2

投与群 11 匹中 1 匹, プレドニソロン間歇併用群 8 匹中 2 匹, プレドニソロン毎日併用群 7 匹中 3 匹にあり, 偽

小葉形成がみられる 8 週で同様に障害された肝細胞に抗体性と推定されるグロブリンを認めるものは, 四塩化炭

素単独投与群 8 匹中 1 匹、プレドニソロン間歇併用群 8 匹中 0 匹、プレドニソロン毎日併用群 8 匹中 3 匹であり、四塩化炭素単独投与 9 週群では 5 匹中 1 匹にあつた。また、四塩化炭素投与 8 週群で間質の浸潤細胞に抗体性と推定されるグロブリンを認めるものは、四塩化炭素単独投与群 8 匹中 1 匹、プレドニソロン間歇併用群 8 匹中 2 匹、プレドニソロン毎日併用群 8 匹中 1 匹であつた。一方、間質の浸潤細胞と肝細胞の両者に抗体性と推定されるグロブリンを認めるものは、四塩化炭素単独投与 8 週群 8 匹中 1 匹、プレドニソロン間歇併用 8 週群 8 匹中 1 匹、プレドニソロン毎日併用 8 週群 8 匹中 0 匹であつた。しかし、2, 3, 5, 6, 7 の各週では肝組織内に抗体性と推定されるグロブリンの肝組織内での検出率を四塩化炭素単独投与群とプレドニソロン併用群とで比較すると、ほぼ同率でいずれも低率であつた。

図 10. 四塩化炭素投与 4 週(蛍光抗体直接法). 自己抗体と考えられるグロブリンの特異蛍光は小葉内の肝細胞に認められる。

図 11. 四塩化炭素投与 4 週(蛍光抗体直接法). 自己抗体と考えられるグロブリンの特異蛍光は小葉内の肝細胞に認められる。

次に個々の例を示すと、図 10, 11 は四塩化炭素単独投与 4 週群の一例で、肝細胞の細胞質にグロブリンを認めた。細胞質にグロブリンを認める肝細胞が小葉内で単一にあるいは群をなして存在することは興味のある点である。図 12, 13 はプレドニソロン毎日併用 4 週群の 1 例で、限界板を構成する一部の肝細胞の細胞質にグロブリンを認めた。図 14, 15, 16 は四塩化炭素単独投与 8 週群の 1 例で、線維性隔壁内の浸潤細胞にグロブリンを認めた。図 17, 18 は四塩化炭素単独投与 8 週群の他の一例で、線維性隔壁内および小葉内の浸潤細胞とそれらに近接した一個の肝細胞にグロブリンを認めた。図 19, 20 は四塩化炭素単独投与 8 週群の他の一例で、線維性隔壁内および小葉内の浸潤細胞と小葉内の単一の肝細胞にグロブリンを認めた。図 21 は図 17, 18 と同例の他の小葉で、線維性隔壁内の浸潤細胞、限界板の一部の肝細胞

図 12. プレドニソロン毎日併用 4 週 (蛍光抗体直接法). 自己抗体と考えられるグロブリンの特異蛍光は限界板の一部の肝細胞に認められる。

図 13. プレドニソロン毎日併用 4 週 (蛍光抗体直接法). 図 12 の強拡大. 自己抗体と考えられるグロブリンの特異蛍光は限界板の肝細胞に認められる。

図 14. 四塩化炭素投与 8 週(蛍光抗体直接法). 自己抗体と考えられるグロブリンの特異蛍光は線維性隔壁内の浸潤細胞に認められる.

図 18. 四塩化炭素投与 8 週(蛍光抗体直接法)自己抗体と考えられるグロブリンの特異蛍光は線維性隔壁内の 2 個の浸潤細胞および小葉内の 1 個の浸潤細胞と限界板の 1 個の肝細胞に認められる.

図 15. 四塩化炭素投与 8 週(蛍光抗体直接法). 図 14 の強拡大

図 19. 四塩化炭素投与 8 週(蛍光抗体直接法). 自己抗体と考えられるグロブリンの特異蛍光は線維性隔壁内の浸潤細胞と小葉内の 1 個の肝細胞に認められる.

図 17. 四塩化炭素投与 8 週(蛍光抗体直接法). 自己抗体と考えられるグロブリンの特異蛍光は線維性隔壁内および小葉内の浸潤細胞とそれらに近接した肝細胞の 1 個に認められる.

図 20. 四塩化炭素投与 8 週(蛍光抗体直接法). 図 19 の強拡大. 自己抗体と考えられるグロブリンの特異蛍光は線維性隔壁内および小葉内の浸潤と小葉内の 1 個の肝細胞に認められる.

図 16. 四塩化炭素投与8週（蛍光抗体直接法）。図 14 の強拡大

図 34. 症例2（蛍光抗体直接法）

肝小葉の一部分で肝細胞にびまん性の γ -グロブリンの特異蛍光を認める。

図 21. 四塩化炭素投与 8 週(蛍光抗体直接法). 自己抗体と考えられるグロブリンの特異蛍光は線維性隔壁内の多数の浸潤細胞と小葉内の 1 個の浸潤細胞および小葉内と限界板の肝細胞に認められる.

図 26. プレドニソロン間歇併用 8 週 (蛍光抗体直接法). グロブリンの特異蛍光は 2 個のクッペル星細胞と 1 個の小葉内浸潤細胞に認められる.

図 22. 蛍光抗体直接法により肝細胞に認められたグロブリンの特異蛍光

図 23. pH 3.3 のクエン酸緩衝液で前処置後蛍光抗体直接法を行なうと図 22 で認められたグロブリンの特異蛍光は認められない.

図 24. 蛍光抗体直接法により線維性隔壁内の浸潤細胞に認められたグロブリンの特異蛍光

図 25. pH 3.3 のクエン酸緩衝液で前処置後蛍光抗体直接法を行なうと図 24 で認められたグロブリンの特異蛍光は認められない.

表 3. Antibody localization in the liver of CCl₄ induced hepatic damages in rats

Number of Rat	Treatment	Treatment weeks	Hepatic cell		Infiltrative cell	Infiltrative cell, and hepatic cell in lobule	Infiltrative cell and hepatic cell in limiting plate
			in lobule	in limiting plate			
1	CCl ₄ (twice in a week)	4	1	0	0	0	0
3		8	1	0	1	1*	1*
1		9	1	0	0	0	0
3	CCl ₄ (twice in a week) with prednisolone (every day)	4	0	3	0	0	0
4		8	2	1	1	0	0
2	CCl ₄ with prednisolone (twice in a week)	4	2	0	0	0	0
3		8	0	0	2	1	0
17	Total		7	4	4	2	1

* Same case

および小葉内の単一の肝細胞にグロブリンを認めた。

これらの症例の連続肝切片を pH 3.3 のクエン酸緩衝液で前処置後蛍光抗体直接法を施行すると、これらのグロブリンの特異蛍光は認められないので、小葉内や限界板の肝細胞および小葉内や線維性隔壁内の浸潤細胞に認められたこれらのグロブリンは抗原抗体結合物の形で存在していると考えられ、対応する抗原は不明であるが細胞鉤着性抗体と推定された (図 22~25)。

図 26 はブドニソロン間歇併用 8 週群の一例で、クッセル星細胞にグロブリンを認めた。

次に組織抗体陽性と考えられる 17 例について、抗体と推定されるグロブリンを認める細胞の局在を検討した結果、4 週群では四塩化炭素単独投与群 1 匹中 1 匹が小葉内肝細胞、プレドニソロン毎日併用群 3 匹中 3 匹が限界板の肝細胞、プレドニソロン間歇併用 2 匹中 2 匹が小葉内肝細胞であった。一方、8 週群では四塩化炭素単独投与群 3 匹中 1 匹が小葉内肝細胞で、浸潤細胞、浸潤細胞と小葉内肝細胞、浸潤細胞と小葉内および限界板の肝細胞がおのおの 1 匹ずつであり、プレドニソロン毎日併用群 4 匹中 2 匹が小葉内肝細胞で、限界板の肝細胞、浸潤細胞がおのおの 1 匹ずつであり、プレドニソロン間歇併用群 3 匹中 2 匹が浸潤細胞、1 匹が浸潤細胞と小葉内肝細胞であった。四塩化炭素単独投与 9 週群の 1 匹では、小葉内肝細胞であった。以上、例数が少ないので結論はたせないが、4 週群では肝細胞に抗体性と推定されるグロブリンを認めたが、8 週群では肝細胞のほか線維性隔壁内および小葉内の浸潤細胞に抗体性と推定されるグロブリンを認めた (表 3)。

(2) 実験・B) では流血中の抗体を追求する一方、抗

表 4. Incidence of localizing and circulating anti-liver antibody in rats with CCl₄ induced hepatic damages

	Treatment weeks	No. of Rat	Antibody in	
			Tissue	Serum
CCl ₄ given	2	3	0	0
	3	3	0	0
	4	11	7	2
	5	3	0	0
	6	3	0	0
	7	3	0	0
	8	10	5	5
	9	5	1	1
Total		41	13	8
No CCl ₄ given	4~8	10	0	0
Total		51	13	8

原抗体結合物または細胞鉤着性抗体と推定されるグロブリンとの関連について検討した (表 4)。

その結果、線維増生が軽度認められる 4 週群 11 匹では、肝細胞に抗原抗体結合物または細胞鉤着性抗体と推定されるグロブリンを認めるもの 7 匹、in vitro で正常の同種ダイコクネズミ肝細胞の細胞質、ことに核周辺部と強く結合する血清因子を認めるものが 2 匹であった。偽小葉形成が認められる 8 週群 10 匹では、肝細胞に抗原抗体結合物または細胞鉤着性抗体と推定されるグロブリンを認めるもの 5 匹、in vitro で正常の同種ダイコクネズミ肝細胞の細胞質、ことに核周辺部と強く結合する血清因子を認めるものが 5 匹であった。9 週群の 5 匹では、肝細胞に抗原抗体結合物または細胞鉤着性抗体

と推定されるグロブリンを認めるもの1匹, *in vitro* で正常の同種ダイコネズミ肝細胞の細胞質, ことに核周辺部と強く結合する血清因子を認めるもの1匹であつた. これらの血清因子は, pH 3.3 のクエン酸緩衝液で前処置を行なうと血清因子(グロブリン)の特異蛍光が認められないので, 抗体性であると推定された(図27, 28).

図27. 四塩化炭素投与8週(蛍光抗体間接法). *In vitro* で正常同種肝の肝細胞質ことに核周辺部と強く結合する血清因子を認めた.

図28. pH 3.3のクエン酸緩衝液で処理後蛍光抗体液を作用させると図27で認められた血清因子の特異蛍光は認められない.

肝細胞の抗原抗体結合物, または細胞鉤着性抗体と推定されるグロブリンと抗体性と推定される血清因子とは同時に検出される場合もあり, いずれか一方しか検出されない場合もあつた. 四塩化炭素投与2, 3, 5, 6, 7週の各群と無処置群では肝細胞の抗原抗体結合物, または細胞鉤着性抗体と推定されるグロブリンも抗体性と推定される血清因子も検出されなかつた.

3) 実験C)では四塩化炭素一回投与後どのくらいで血清因子が検出されるかを検討した(表5).

表5. Incidence of serum factor in rats with CCl_4 induced hepatic damages

	Hours after injection	No. of Rat	Serum factor
CCl_4 given	24	5	4
	48	5	2
	72	5	0
	96	4	0
	120	3	0
Total		22	6
No CCl_4 given		10	0
Total		32	6

その結果, 投与後24時間の5匹中4匹と, 48時間の5匹中2匹に血清因子が検出された. しかし, 72時間の5匹, 96時間の4匹, 120時間の3匹, 無処置の10匹ではいずれも血清因子が検出されなかつた.

II. 臨床例

症例1: 斎○淑○, 25才, 家婦, (図29).

昭和40年3月10日子宮外妊娠で開腹手術をうけたが, 術中術後を通じて保存血1000ccを輸血された. 輸血後

図29. 症例1の serum transaminase の変動

約30日の4月9日ころより全身倦怠感, 食欲不振, 悪心あり, 家人に黄疸を指摘された. 心窩部圧迫感が時折あり, 4月12日某医受診, 血清総ビリルビン 4.1mg/dl , 血清 GPT 603 単位, GOT 250 単位, コリンエステラーゼ活性(アコレスト法)は15分であつた. 4月13日当内科外来受診, 血清総ビリルビン 3.5mg/dl , 血清 GPT 637 単位, GOT 455 単位, 膠質反応は陰性であつた. 4月23日当科入院.

入院時, 肝を1.5横指触知し圧痛軽度, 硬度軟, 辺縁鈍, 表面平滑であつた. 血清 GPT 149 単位, GOT 124

単位、ZTT 7.5, TTT 2.5, CCLF (—), 血清総ビリルビン 0.9 mg/dl, Latex 反応 (—) であつた。肝底護剤の投与により漸次血清トランスアミナーゼ値の減少が認められた。5月6日肝生検施行。光顕像ではグリソン鞘の軽い細胞浸潤、少数の好酸体、星細胞の動員、小葉内の比較的集族性の細胞浸潤などを認めた(図 30)。蛍光抗体直接法では肝細胞と類洞腔内に、おそらくクッペル星細胞と思われる部位に γ -グロブリンを認めた(図 31)。5月10日血清トランスアミナーゼ値は急上昇を示

図 30. (H-E)

図 31. 症例 1 (蛍光抗体直接法)

肝細胞と類洞腔内の細胞(おそらくクッペル星細胞)に γ -グロブリンの特異蛍光を認める。

し、GPT 302 単位, GOT 209 単位となつた。5月17日食欲不振、悪心あり、GPT 820 単位, GOT 590 単位, 血清総ビリルビン 2.6 mg/dl, ZTT 7.0, TTT 3.9, CCLF (—), γ -グロブリン 17.2% で増悪の傾向が認められたので、プレドニソロン初期投与量 30 mg/day 4 投 3 休各週 5 mg の漸減療法を実施したところ、血清トランスアミナーゼ値は漸次下降し、自覚症状の改善肝腫脹の消失が認められ、6月12日には血清トラン

スアミナーゼは、GPT 52 単位, GOT 32 単位となつた。6月16日家人の希望もあり退院、プレドニソロン 5 mg/day の維持量で外来治療を行なっている。

症例 2: 川○ヨ○, 51 才, 家婦(図 32)。

昭和 40 年 2 月 25 日乳癌のため当院外科で手術を受けた。術中術後を通じて保存血 2200 cc の輸血をうけ、

図 32. 症例 2 の serum transaminase の変動

3月1日退院。退院後全身倦怠感あり、3月11日の血清 GPT 14 単位, GOT 17 単位であつたが、29日 GPT 178 単位, GOT 94 単位となり、4月3日当内科外来受診。肝は2横指触知し硬度軟で圧痛軽度であつた。血清 GPT 615 単位, GOT 870 単位, 血清総ビリルビン 0.8 mg/dl, TTT 1.1, ZTT 8.0, CCLF (—), γ -グロブリン 21.6% であつた。4月13日当科入院。

肝は1横指触知し、弾力性軟で圧痛なし、血清 GPT 294 単位, GOT 130 単位, 血清総ビリルビン 0.6 mg/dl, TTT 2.0, ZTT 6.5, CCLF (—), γ -グロブリン 21.2% であつた。4月19日には血清 GPT 67 単位, GOT 39 単位となり、24日肝生検施行。光顕像では肝細胞はかなり空泡化しており、類洞に少数のリンパ様細胞の浸潤を認めた(図 33)。蛍光抗体直接法では、肝小葉の一部分で肝細胞にびまん性の γ -グロブリンの存在を認めた(図 34)。4月26日血清 GPT 70 単位, GOT 32 単位, TTT 2.0, ZTT 5.9, CCLF (—) であつた。5月13日食欲不振、悪心あり、14日血清 GPT 149 単位, GOT 111 単位と上昇傾向がみられたが、31日 GPT 84 単位, GOT 69 単位、6月8日退院。外来で経過観察中であるが、7月半ば以後、血清 GPT, GOT は正常値にもどり、自覚的にも軽快した。

臨床例 66 例の肝切片について蛍光抗体直接法を用いて肝内の γ -グロブリンの存在を検討するとともに、68 例

図 33. 症例 2 (H-E)

図 35. 慢性肝炎の症例(蛍光抗体間接法). 同種肝の肝細胞質, ことに核周辺部と結合する血清因子を認めた.

図 36. S. L. E. の症例(蛍光抗体間接法). 抗原にヒト肝, ダイコクネズミ肝を用いて血中の抗核因子を検出した. γ -グロブリンの特異蛍光は肝細胞の核にのみ認められる.

の血清について蛍光抗体間接法を用いて流血中の血清因子の存在を検討した(表 6).

肝内 γ -グロブリンは, 肝疾患 36 例では血清肝炎 8 例中 4 例, 慢性肝炎 15 例中 1 例, 肝硬変 6 例中 3 例に検出されたが, 伝染性肝炎 7 例では検出しえなかつた. 対照疾患 30 例では梅毒およびうづ血肝の 1 例で検出されたが, サルコイドーシスの 5 例, S. L. E., 二次性クワシヨーカー, 発作性夜間血色素尿症の各 1 例, 胃潰瘍の 2 例, 胃癌の 19 例ではいずれも検出されなかつた. 肝内 γ -グロブリンの存在は肝細胞質内の γ -グロブリンの存在であつて, 血清肝炎の 1 例ではおそらくクッペル星

表 6. Incidence of γ -globulin in the liver and serum factor in patients with various diseases

Diagnosis	γ -Globulin in tissue		Serum factor	
	No. of patient	Positive case	No. of patient	Positive case
Infections hepatitis	7	0	7	0
Serum hepatitis	8	4	8	0
Chronic hepatitis	15	1	15	1
Hepatic cirrhosis	6	3	7	0
Sarcoidosis	5	0	5	0
Systemic lupus erythematosus	1	0	1	1
Syphilis, engorged liver	1	1	1	0
Kwashiorkor syndrome	1	0	1	0
Common bile duct obstruction			1	0
Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	1	0	1	0
Gastric ulcer	2	0	2	0
Gastric cancer	19	0	19	0

表 7. 症 例

Name of patient	Clinicopathologic diagnosis	γ -Globulin in hepatic tissue	Serum factor	Serum ransaminase		Serum γ -globulin (%)	Colloid reaction			BSP (30 min)
				GOT	GPT		ZTT	TTT	CCLF	
I. T.	Acute hepatitis	(-)	(-)	48	80	15.4	17.0	2.0	(-)	7.5
K. S.	Acute hepatitis	(-)	(-)	80	73	23.1	14.7	4.1	(-)	30.0
H. I.	Acute hepatitis	(-)	(-)	20	43	15.6	7.0	1.5	(-)	
Y. S.	Acute hepatitis	(-)	(-)	21	31	24.2	1.6	1.0	(-)	17.5
I. K.	Acute hepatitis	(-)	(-)	23	18	16.5	7.5	4.2	(-)	15~17.5
I. H.	Acute hepatitis	(-)	(-)	16	18	17.5	5.4	0.8	(-)	10.0
A. S.	Acute hepatitis	(-)	(-)	17	20	16.6	9.1	2.9	(-)	
M. N.	Serum hepatitis	(-)	(-)	47	37	29.3	10.5	2.6	(-)	10.0
K. K.	Serum hepatitis	(-)	(-)	420	408	22.8	11.0	6.0	(-)	
S. K.	Serum hepatitis	(-)	(-)	38	32	22.6	3.1	1.0	(-)	10.0
K. Y.	Serum hepatitis	(-)	(-)	26	22	22.8	7.3	2.2	(-)	7.5~10.0
Y. K.	Serum hepatitis	(+)	(-)	32	70	21.2	6.5	2.7	(-)	10.0
Y. S.	Serum hepatitis	(+)	(-)	94	820	17.2	6.5	3.4	(-)	15.0
S. I.	Serum hepatitis	(+)	(-)	43	46	20.0	8.0	1.5	(-)	12.5
A. T.	Serum hepatitis	(+)	(-)	41	22	22.0	13.0	5.7	(-)	5.0
K. M.	Chronic hepatitis	(-)	(-)	73	77		8.0	1.4	(-)	7.5
Y. T.	Chronic hepatitis	(-)	(-)		84	21.0				
I. S.	Chronic hepatitis	(-)	(-)	17	27	16.7	8.0	3.7	(-)	15.0
D. S.	Chronic hepatitis	(-)	(-)	69	49	33.4	19.4	7.6	(-)	
S. M.	Chronic hepatitis	(-)	(-)		10.5	16.7				
K. S.	Chronic hepatitis	(+)	(-)	35	29	27.9	19.4	10.7	(-)	17.5~20.0
I. Y.	Chronic hepatitis	(-)	(-)	76	88	23.2	22.1	8.6	(-)	30.0
S. S.	Chronic hepatitis Diabetes mellitus	(-)	(-)	62	66	32.7	19.7	8.4	(-)	27.5
Y. I.	Chronic hepatitis	(-)	(+)	193	93	10.2	9.5		(-)	10.0
T. W.	Chronic hepatitis	(-)	(-)	37	76	23.8	4.5	3.2	(-)	
I. N.	Chronic hepatitis Diabetes mellitus	(-)	(-)	41	16	16.7	9.6	3.5	(-)	20.0
T. K.	Chronic hepatitis	(-)	(-)	94	72	31.9	16.1	4.0	(-)	7.5
T. N.	Chronic hepatitis	(-)	(-)	120	140	21.7	9.4	1.2	(-)	7.5
K. A.	Chronic hepatitis	(-)	(-)	84	136	14.7	4.7	3.6	(-)	10.0
S. I.	Chronic hepatitis	(-)	(-)		25	21.6				
M. O.	Hepatic cirrhosis	(-)	(-)	108	108	18.3	14.3	5.4	(-)	15.0
M. I.	Hepatic cirrhosis	(+)	(-)	31	25	21.2	9.1	1.6	(-)	
A. K.	Hepatic cirrhosis	(+)	(-)	77	95	17.5	11.5		(-)	30.0
Y. H.	Hepatic cirrhosis	(+)	(-)	32	35	13.2	8.0	1.5	(-)	12.5
S. T.	Hepatic cirrhosis	(-)	(-)	32	31	26.5	10.3	2.8	(-)	17.5
M. N.	Hepatic cirrhosis	(-)	(-)	56	52	28.4	14.6	4.2	(-)	20.2
H. Y.	Hepatic cirrhosis Diabetes mellitus		(-)	32		29.2				
T. K.	Syphilis, engorged liver	(+)	(-)	14	36	25.0	20.0		(-)	10.0
T. Z.	Systemic lupus erythematosus		(+)		22	13.9				

細胞と思われる部位にも γ -グロブリンを検出した。

流血中の血清因子は肝疾患 37 例では慢性肝炎 15 例中 1 例に検出されたが、急性肝炎の 7 例、血清肝炎の 8 例、肝硬変の 7 例には検出されなかつた。この血清因子は同種肝の肝細胞質核周辺部と結合する血清 γ -グロブリンである (図 35)。対照疾患 31 例では S. L. E. の 1 例で抗核因子を検出したが (図 36)、サルコイドーシスの 5 例、梅毒およびうつ血肝、二次性クワシヨーカー、総胆管閉塞、発作性夜間血尿症の各 1 例、胃潰瘍の 2 例、胃癌の 19 例ではいずれも検出されなかつた。

肝疾患 37 例、梅毒およびうつ血肝、SLE の各 1 例、計 39 例について肝内 γ -グロブリンと血清因子の有無血清トランスアミナーゼ、血清 γ -グロブリン、膠質反応、BSP などについて検討した (表 7)。

その結果、肝内 γ -グロブリンや血清因子の有無と臨床検査所見との間には、とくに関連を見出すことはできなかつた。

総括および考案

肝疾患における血清トランスアミナーゼ値の上昇は障害された肝細胞から血中へのトランスアミナーゼの漏出によるが、この場合、肝抗原の血中遊出も当然考えられる。この観点から Espinosa ら⁸³⁾はダイコクネズミに四塩化炭素を注射し血中の抗肝原の推移を Ouchterlony 法で検討した結果、血中肝抗原は注射後 12~24 時間でピークに達し、2 日後に下降線をたどるとしており、Pinckard ら⁸⁵⁾は四塩化炭素注射家兎にみられる血中の抗肝抗体は 1 gM にあり、これと反応する肝抗原はミトコンドリア分画にあると考えている。浅川ら⁸⁶⁾は家兎に四塩化炭素投与後 6~12 時間から血中に肝抗原性物質が証明され、3~4 日で消失し、大体 GPT, GOT の消長と平行し、これらの酵素活性値が高値を示す間、陽性像を呈するというが、抗肝抗体の出現と肝抗原性物質の間にとくに関連性はないと推測した。しかし、肝障害のある時点では、肝抗原と抗肝抗体が血中に共存することは当然考えられ、両者間に反応が起こるであろうことも容易に推測される。したがって抗原と抗体が最適比で存在する区域をはさんで、抗原過剰域と抗体過剰域が *in vivo* で生じていることも推定され血中の肝抗原性物質と抗肝抗体の出現が必ずしも平行しないことはありうるであろう。辛島ら⁸⁷⁾は血中の抗肝抗体はヒト、牛、家兎等の肝組織とはほぼ同程度に反応し、病肝と健康肝との間にも差は認めがたいので本抗体の検出には同種、また

は異種の肝組織を抗原として使用できるとのべている。

私は同種肝組織を抗原として動物実験と臨床例で血中の抗肝抗体について蛍光抗体間接法により検討した。その結果、動物実験では四塩化炭素注射後 24 時間と 48 時間で血中に抗肝抗体と推定される血清因子を検出した。Weir⁸⁸⁾はダイコクネズミに四塩化炭素注射後 2~3 日以内に補体結合反応により血中に抗肝抗体を検出している。私の実験と多少時間的なずれがあるが、四塩化炭素の投与量が少ないことが一因と考えられる。

この血中の抗肝抗体は私の四塩化炭素によるダイコクネズミ肝障害実験では、肝に結合組織増生が軽度認められる 4 週と、偽小葉形成が認められる 8 週、9 週の一部の例にのみ証明され、また臨床例 39 例についての肝機能と血中の抗肝抗体と推定される血清因子出現との検討においても両者間にとくに関係は見出されず、本抗体の病因作用については決定的なことはいえない。

石井ら⁸⁹⁾は肝疾患で肝細胞の崩壊等により肝乳剤上清抗原の血中遊出が起これば、そこで血中自己抗体と反応し抗原抗体結合物が形成されて生物学的活性をえた後、正常肝組織に鉤着すれば肝組織障害が起こりうるとしている。Popper ら⁴⁰⁾は異種タンパクによる抗原抗体結合物をダイコクネズミの胆管から注入し胆管周囲の急性炎症、肝細胞壊死、次いで慢性炎症性変化等を観察しており、Paronetto ら⁴¹⁾はマウスに四塩化炭素注射後異種タンパクによる抗原抗体結合物を注射して肝障害の増強されることを認めている。これは四塩化炭素により肝細胞の透過性亢進とクッペル星細胞の貪食能低下が起こるため、細胞障害性の抗原抗体結合物が肝細胞に沈着して既存の四塩化炭素による微少障害巣を拡大するからとのべている。かかる観察より Popper は肝炎の慢性化には必ずしも自己の肝起源の抗原とそれに対する抗体でなくとも、とにかく抗原抗体結合物ができれば、それが肝細胞傷害性に働き軽微ながら傷害されている肝細胞はこの抗原抗体結合物を取り込みやすいので、傷害が一層強くなるといつている。山本⁴²⁾は Campbell の卵黄感作による片腎結紮ダイコクネズミの実験的肝硬変症で蛍光抗体法により、グリソン鞘、中心静脈付近、小葉内小壊死巣に集積する主としてプラズマ様細胞からなる円形浸潤細胞に γ -グロブリンを認めたが、変性壊死に陥った肝細胞には認めていない。太田⁴³⁾は臨床例に蛍光抗体法を用いて、障害された肝細胞に *in vivo* でグロブリン沈着の有無を検討した結果、慢性肝炎 14 例に 1 例もなく、壊死後性肝硬変症 9 例中 1 例、肝癌を伴った肝硬変症 5

例中2例に沈着を認めたが、elution procedureによる抗体の確認は行なっておらず、蛍光像や光顕像からこれは単なる plasma imbibition とは考えられず、さりとて免疫学的反応像とも決定しがたいと述べている。以上のように現在まで変性壊死に陥った肝細胞に抗原抗体結合物、または細胞鉤着性抗体としての自己グロブリンの存在を認めたとの報告はない。私も蛍光抗体直接法により、血清肝炎4例、慢性肝炎1例、肝硬変3例で肝細胞に、血清肝炎の1例ではクッペル星細胞に γ -グロブリンの存在を認めたが、elution procedureを実施しなかったので抗体性のグロブリンか否かは確かでない。しかし、実験的四塩化炭素肝障害ダイコクネズミで、小葉内肝細胞、限界板肝細胞、線維性隔壁内の浸潤細胞にグロブリンの存在を認め、pH 3.3のクエン酸緩衝液で前処置後蛍光抗体直接法を実施するとグロブリンの特異蛍光がみられないので、抗原は検索していないため不明であるが、とにかくこれらのグロブリンは抗原抗体結合物の形で存在しているものと推定した。なお、線維性隔壁内の浸潤細胞にグロブリンが認められるにもかかわらず肝細胞に証明されなかつたり、線維性隔壁内の浸潤細胞に認められないにもかかわらず小葉内の肝細胞にグロブリンをみるものもあつて、線維性隔壁内の浸潤細胞で産生された抗体性グロブリンが肝細胞と結びついて障害作用を発揮しているという所見はえられなかつた。

Popper⁴⁴⁾、Cohenら⁴⁵⁾は肝炎および活動性肝硬変症、または壊死後性肝硬変症の肝で蛍光抗体法を用い、線維性隔壁内や類洞内の網内系細胞に γ -グロブリンを認め、プラズマ細胞に移行しつつある網内系細胞が γ -グロブリンを産生しており、肝障害と免疫反応に関係する肝内浸潤細胞の密度とはほぼ平行するとのべている。Gonzales-Guzman⁴⁶⁾はmicrocinematographyを用い、*in vitro*でimmunoallergic shockの結果、網内系細胞が形質細胞に移行することを証明した。しかし、私の実験的四塩化炭素ラット肝硬変症では蛍光抗体法により抗体性と考えられるグロブリンが検出されない、すなわち免疫反応に関係がないと思われる肝内浸潤細胞が存在する例もみられるので、Burnetのimmunologically competent cellが少なくとも肝障害の主要な促進因子とは考えられない。また、私の実験的四塩化炭素ラット肝硬変症では、肝細胞にみられたグロブリンの特異蛍光と浸潤細胞にみられたそれでは強さに明らかな差があり、肝細胞で弱いということはなにを物語るものであろうか。浸潤細胞ではグロブリンの積極的な産生があり、おそらく貪食され

た肝抗原と細胞質内で結合を起こしているが、肝細胞では、産生されかつ血中に遊出した肝抗体(グロブリン)が肝細胞質内の肝抗原と結合するが、障害肝細胞内の抗原量は刻々と減少しつつあるので、抗ダイコクネズミグロブリン蛍光色素標識グロブリンが比較的結合しにくいであろうと推定している。

自己免疫疾患における本質的な病理学的所見については議論があるが、Waksman⁴⁷⁾はツベルクリン反応、移植免疫、実験的甲状腺炎等の病理組織所見を比較検討し、本質的で共通な変化はびまん性または散在性のリンパ球および形質細胞の浸潤であろうとのべている。しかし一般的には、これらの細胞浸潤を慢性の炎症や組織の崩壊に対する非特異的反応にすぎないと考える習慣がある。私の四塩化炭素ダイコクネズミ肝硬変症では、浸潤細胞が免疫学的に活動状態を示す例があり、Scheiffarthら⁴⁸⁾は急性肝炎の1例、慢性肝炎の2例の肝切片を蛍光色素標識同種肝細胞分割で染色し、門脈周辺部の単核細胞とクッペル星細胞に特異蛍光を認めており、これらの細胞の活動状態は自己の体成分に対応するものであると推定される。Mackay⁴⁹⁾はルポイド肝炎の肝組織に芽中心をもつたリンパ濾胞形成を認め、小坂ら⁴⁹⁾はウイルス性肝炎の経過中における自己免疫現象の組織表現の1つとして濾胞性肝炎という名称を提唱している。しかし、市田ら^{50, 51)}は活動性慢性肝炎の38%にlymphoid focusを証明したが、非活動性慢性肝炎の40%にもlymphoid focusを認めたことから、lymphoid focusの存在のみによつて活動性慢性肝炎とするにはなお多くの問題があるとしている。私の四塩化炭素ダイコクネズミ肝硬変症ではその経過中に芽中心をもつたリンパ濾胞形成の例は認められなかつた。一方、Schaffnerら⁵²⁾、Popper⁴⁴⁾らKalk⁵³⁾は肝硬変が進行性である場合に再生結節周辺にpiecemeal necrosisが発生することから、これをhepatic self perpetuationの組織学的表現として重要視し、蛍光抗体法でこの部分に γ -グロブリン含有細胞が豊富に出現しているのを認めているが、肝壊死細胞には γ -グロブリンを認めていないので、壊死が抗原抗体反応の産物であるという証拠を欠いている。この点、私の実験的ダイコクネズミ肝硬変症における結果は興味ある所見で、障害された肝細胞に自己のグロブリンの存在を認め、これは抗体性のグロブリンであろうと推定した。

ステロイドホルモンとアレルギー反応との関連について、ステロイドホルモンは抗体産生、抗原抗体反応を抑制する^{54, 55)}、毛細血管の透過性を抑制する⁵⁶⁻⁵⁸⁾、抗ヒア

ルロニダーゼ作用を有する⁵⁹⁾といわれている。畔柳ら⁶⁰⁾は実験的アレルギー性肝炎でプレドニソロンは抗肝抗体中に含まれる localizing antibody の肝への局在を抑制しないが、抗肝抗体注射による白ネズミのアレルギー性肝炎を抑制するとのべている。私の実験的ダイコクネズミ肝硬変症で、プレドニソロン併用群にも肝細胞に自己グロブリンの存在を認めるものがあり、この点興味深い。

肝炎の慢性化に自己免疫機転が積極的に関与しているとすれば、高率に、しかも広範囲にわたって細胞鉤着性抗体が証明されるべきであるのに、私の実験的ダイコクネズミ肝硬変症では低率、かつ散在性にしか証明されないことから、自己免疫機転が実験的四塩化炭素ダイコクネズミ肝障害の慢性化に重要な役割を演じているとの結論は引出せなかつた。しかし、リンパ球、形質細胞を担体とした細胞鉤着性抗体が肝実質細胞に障害因子として作用することも推定され、肝炎の慢性化に遅延型過敏反応または cell-bound immunity の面からの検討が今後さらに必要であろう。

結 語

肝炎の慢性化に対する自己免疫機転の関与を検討する目的で、Coons の蛍光抗体法の変法を用いて、四塩化炭素ダイコクネズミ肝障害について免疫細胞化学的検討を行なつた。同時に、臨床例 68 例(血清肝炎 8 例、急性肝炎 7 例、慢性肝炎 15 例、肝硬変 7 例、発作性夜間血色素尿症 1 例、サルコイドーシス 5 例、S. L. E. 1 例、梅毒およびうつ血肝 1 例、二次性クワッショーカー 1 例、胃潰瘍 2 例、胃癌 19 例)についても同様の検討を行なつた。その結果、次の所見をえた。

1) ダイコクネズミに四塩化炭素 0.075 mg/100 g 体重を筋注すると、蛍光抗体間接法で、注射後 24 時間と 48 時間で正常同種肝の肝細胞質核周辺部と結合する血清因子が検出される例があつた。注射後 72 時間、96 時間、120 時間では検出されなかつた。

2) ダイコクネズミに四塩化炭素 0.075 mg/100 g 体重を毎週 2 回筋注すると、線維増生が軽度認められる 4 週では、蛍光抗体間接法で正常同種肝の肝細胞質ことに核周辺部と強く結合する

血清因子が検出される例があり、一方、蛍光抗体直接法では障害された肝細胞の細胞質に自己グロブリンの存在する例を認めた。偽小葉形成が認められる 8 週と 9 週では、蛍光抗体間接法で正常同種肝の肝細胞質ことに核周辺部と強く結合する血清因子が検出される例があり、一方蛍光抗体直接法では障害された肝細胞と小葉内および線維性隔壁内の浸潤細胞の細胞質に自己グロブリンの存在する例を認めた。また、8 週の 1 例ではクッペル星細胞に自己グロブリンの存在を認めた。

3) 上述の血清因子は自己の血清中に存在するグロブリンであつて、pH 3.3 のクエン酸緩衝液で前処置を行なうと血清因子の特異蛍光が認められないので、これらの血清因子は in vitro で正常同種肝の肝細胞質ことに核周辺部と抗原抗体結合を行なつていと推定された。1) で検出された血清因子については elution procedure を施行しなかつた。

4) 肝細胞と小葉内および線維性隔壁内の浸潤細胞に検出されたグロブリンは、pH 3.3 のクエン酸緩衝液で前処置後蛍光体直接法を行なうと特異蛍光として認められなくなることから、in vivo で抗原抗体結合物の形で存在していると推定された。

5) 抗原抗体結合物の形で存在すると推定されるあるいは細胞鉤着性抗体と推定される肝細胞質グロブリンは、小葉内の単一の肝細胞、限界板の肝細胞に認められた。

6) プレドニソロン投与では、四塩化炭素ダイコクネズミ肝障害時の肝内グロブリンの局在を抑制することのできない例があつた。

7) 臨床的には、血清肝炎 4 例、慢性肝炎 1 例、肝硬変 3 例で生検肝の肝細胞質に、蛍光抗体直接法によつて自己 γ -グロブリンの存在を認めた。血清肝炎の 1 例では、クッペル星細胞に自己 γ -グロブリンの存在を認めた。慢性肝炎の 1 例では蛍光抗体間接法によつて正常同種肝の肝細胞質ことに核周辺部と強く結合する血清因子(γ -グロブリン)が検出された。

8) 肝疾患 37 例、梅毒およびうつ血肝と SLE

の各1例, 計 39 例について肝内 γ -グロブリンおよび血清因子の存在と肝機能 (BSP, TTT, ZTT, CCLF, GOT, GPT) および血清 γ -グロブリン値との関係について検討したがとくに関連を見出すことはできなかった。しかし, 実験的四塩化炭素ダイコクネズミ肝硬変では, 肝組織内に抗原抗体結合物の形で存在すると推定される。または細胞鉤着性抗体として存在すると推定されるグロブリンと循環抗体と推定される血清因子が線維増生や偽小葉形成となんらかの関連をもつて出現するものと推定された。

9) 四塩化炭素ダイコクネズミ肝硬変で検出された細胞鉤着性抗体と推定されるグロブリンと循環抗体と推定される血清因子 (グロブリン) との同一性については, *in vivo* と *in vitro* での差はあるが, 蛍光抗体法による染色態度に差が認められるので, 若干の異類性が推定された。

10) 肝炎から肝硬変への経過中に自己グロブリンの肝細胞への鉤着が起こり, このグロブリンは抗体としての性状を有するので肝炎の慢性化に自己免疫機転の存在が推察された。

稿を終るに臨み, ご指導, ご校閲を賜わった恩師木下康民教授に深甚なる感謝の意を表するとともに, 直接ご指導を賜わった木下内科笹川力講師, 病理学教室木原達博士, 金沢大学太田五六助教授に深く感謝する。また, ご指導, ご協力をいただいた木下内科肝臓研究班各位に深く感謝する。

文 献

- 1) Witebsky, E., Rose, N. R., Terplan, K., Paine, J. R., & Eagan, R. W.: JAMA, 164: 1439, 1957.
- 2) Hughes, T. P.: J. Immun., 25: 275, 1933.
- 3) Eaton, M. D., Murphy, W. D., & Hanford, V. L.: J. Exp. Med., 79: 539, 1944.
- 4) Bjørneboe, M., & Krag, P.: Acta. Path. Microbiol. Scand., 24: 352, 1947.
- 5) Miles, J. A. R.: Brit. J. Exp. Path., 27: 25, 1946.
- 6) Vorländer, K. O.: Z. Ges. Exp. Med., 118: 352, 1962.
- 7) Gajdusek, D. C.: Arch. Intern. Med., 103: 9, 1958.
- 8) Gökcen, M.: J. Lab. Clin. Med., 59: 533, 1962.
- 9) Mackay, I. R. & Larkin, L.: Aust. Ann. Med., 7: 251, 1958.
- 10) Mackay, I. R. & Larkin, L.: Clin. Sci., 18: 425, 1959.
- 11) Hackett, E., Beech, M. & Forbes, I. J.: Brit. Med. J., II: 17, 1960.
- 12) Coppo, M., Tedeschi, G. & Robbà, L.: Gastroenterologia, 2: 1964 (文献 61 より引用).
- 13) Olitzki, L. & Bernkopf, H.: J. Infect. Dis., 77: 60, 1945.
- 14) Mori, W., & Suzuta, T.: Nature, 192: 41, 1961.
- 15) Scheiffarth, F. & Berg, G.: Klin. Wschr., 31: 441, 1953.
- 16) Scheiffarth, F., Frenger, W. & Brichzy, W.: Klin. Wschr., 33: 445, 1955.
- 17) Asherson, G. L. & Broberger, O.: Brit. Med. J., I: 1429, 1961.
- 18) Dausset, J. & Marchall, G.: Immunopathologie, 1st. Internat. Symposium. Basel. Benno. Schwabe. & Co., Basel. u. Stuttgart, P. 113, 1959.
- 19) 金田平: 阪市大医誌, 9: 239, 1960.
- 20) 辛島喜広: 阪市大医誌, 7: 429, 1958.
- 21) Hunter, F. M., Sparks, R. D. & Salzman, R. T.: Gastroenterology, 39: 394, 1960.
- 22) Henning, N., Scheiffarth, F. & Warnatz, H.: Gastroenterologia, 1: 221, 1963.
- 23) Paronetto, F., Schaffner, F. & Popper, H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 106: 216, 1961.
- 24) Paronetto, F., Schaffner, F., Mutter, R. D., Kniffen, J. C. & Popper, H.: JAMA, 187: 503, 1964.
- 25) Scheiffarth, F., Warnatz, H., & Essing, H.: Int. Arch. Allerg., 28: 240, 1965.
- 26) 小川勝士, 辻孝夫, 太田康平: 肝臓, 6: 263, 1965.
- 27) 上田英雄, 亀田治男, 山口潜, 小宮正文: 内科, 12: 450, 1963.
- 28) 長島秀夫: 日新医学, 48: 571, 1961.
- 29) 鈴木秀郎: 自己免疫と自己免疫疾患, 中外医学社, 東京, 初版, 105 頁, 1965.
- 30) Coons, A. H. & Kaplan, M. H.: J. Exp. Med., 91: 1, 1950.
- 31) Coons, A. H., Leduc, E. H. & Connolly, J. M.: J. Exp. Med., 102: 49, 1955.
- 32) 川村明義, 川島豊作, 堀入康平: 最新医学, 17: 2739, 1962.
- 33) Freedman, P., Peters, J. H. & Kark, R. M.: Arch. Intern. Med., 105: 524, 1960.
- 34) Espinosa, E. & Insunza, I.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111: 174, 1962.
- 35) Pinckard, P. N. & Weir, D. M.: Clin. Exp. Immunol., 1: 33, 1966.
- 36) 浅川英男, 奥田正治, 大熊信也, 矢野英雄: アレルギー, 15: 28, 1966.
- 37) 辛島喜広, 井神宏: 日本臨牀, 22: 39, 1964.
- 38) Weir, D. M.: Immunology, 6: 581, 1963.
- 39) 石井潔, 山本祐夫: 日内会誌, 51: 734, 1962.
- 40) Popper, H.: 肝臓, 3: 78, 1961.
- 41) Paronetto, F. & Popper, H.:

- Amer. J. Path., 47 : 549, 1965. 42) 山本祐夫 : アレルギー, 14 : 149, 1965. 43) 太田五六 : 肝臓, 5 : 151, 1964. 44) Popper, H., Paronetto, F., & Rubin, E. : Aktuelle Probleme der Hepatologie, Martini, Stuttgart, 1962. 45) Cohen, S., Ohta, G., Singer, E. J. & Popper, H. : J. Exp. Med., 111 : 285, 1960. 46) Gonzales-Guzman, I. : Blood, 14 : 978, 1959. 47) 鈴木秀郎 : 自己免疫と自己免疫疾患, 中外医学社, 東京, 初版, 141 頁, 1965. 48) Mackay, I. R. & Burnet, F. M. : Autoimmune Disease, C. C. Thomas Co., Illinois, 2nd ed., p. 197, 1964. 49) 小坂淳夫, 太田康幸 : 肝臓, 6 : 284, 1965. 50) Ichida, F., Sasaki, H. & Wakisaka, G. : Progress in Liver Disease (ed. by Popper, H. & Schaffner, F.), Grune & Stratton, New York, Vol. 2, p. 416, 1965. 51) 市田文弘, 馬庭熙, 中川忠幸, 井上恭一, 渡辺和雄, 葛岡哲男, 小川弘道, 田中裕 : 日本臨牀, 24 : 14, 1966. 52) Schaffner, F., Popper, H. & de la Torre, M. : Gastroenterology, 30 : 357, 1956. 53) Kalk, H. : Verh. Deutsch. Ges. Inn. Med., 63 : 177, 1957. 54) Germuth, F. G., Ottinger, B. & Oyama, J. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 80 : 188, 1952. 55) Germuth, F. G. : J. Exp. Med., 98 : 1, 1953. 56) Moon, V. H. & Tershakov, G. A. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 79 : 63, 1952. 57) Chappel, J. W., Ebert, R. H. & Barkley, W. R. : J. Lab. Clin. Med., 39 : 896, 1952. 58) 畔柳武雄 : 臨牀アレルギー, 医学書院, 東京, 1956. 59) Rawling, A. G. : Ann. Allerg., 10 : 440, 1952. 60) 畔柳武雄, 栗栖明, 杉山始, 斎藤昌信 : 日新医学, 49 : 458, 1962. 61) Scheiffarth, F. & Warnatz, H. : Klin. Wschr., 43 : 473, 1965.

*

*

*

<お 知 ら せ>

第 2 回 日本肝臓学会西日本支部会ご案内

第 2 回日本肝臓学会西日本支部会を下記のごとく行なう予定ですのでご案内申し上げます

会 長 小坂淳夫教授 (岡山大学)
 会 場 岡山市立市民会館
 会 期 昭和 43 年 1 月 20 日 (土), 21 日 (日)

[プ ロ グ ラ ム]

特 別 講 演

日本住血吸虫症 中島敏郎教授 (久留米医大)

パ ネ ル

肝臓と免疫

C. P. C.

一 般 演 題

- 1) 食道静脈瘤とその治療
- 2) 肝疾患と糖代謝
- 3) 原発性肝癌