シンポジウム 血清肝炎

(2) 輸血後肝障害にかんする二、三の問題

東京大学教授

中 尾 喜 久

SYMPOSIUM ON SERUM HEPATITIS

2) SOME ASPECTS OF LIVER INJURY DUE TO BLOOD TRANSFUSION

Kiku NAKAO M.D.

The Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
University of Tokyo

輸血後の肝障害でビールスに起因しないもの、すなわち臨床像は近似していても厳密な意味では血清肝炎とよびえない肝障害が起こりうるかどうかを検討した。

I. 保存による血漿蛋白の変性の問題

血液をACD液で4℃以下に保存すると1週目頃から血漿蛋白の変性がおこってくる。すなわち、その保存血漿をcyano gum gelあるいは澱粉gel電気泳動にかけるとpostalbumin部あるいは α -globulin部に正常血漿ではみられない新しい峰が出現する。さらに、電気泳動標本からcyano gum gel上に二次元泳動で展開すると、その新しい峰は α_1 -globulinから由来していることが推定される。血漿を60℃に10分間加熱してもこの変化が出現することが知られており、血漿蛋白の一種の変性と理解されている(図1)。

次にこの変性蛋白の輸注が肝に障害作用を及ぼすかどうか。ウサギ血漿についても同様の現象が認められるので、ウサギを用いて次の実験を行なった。

ウサギの加熱変性血漿蛋白を正常ウサギに5～10日間隔で2カ月間輸注したが、血清GOT、GPTの認むべき上昇は起こらなかった。しかるに、

さらに3カ月目に同じ血漿を輸注すると、散発的に血清GOT、GPTの一時的上昇を示し、GOTは90、GPTは54単位に達した。その肝組織像には肝細胞の水腫状腫脹、グラーへの軽度細胞浸潤がみられた。免疫学的機序の関与が想定されたので、あらかじめ右腎莖を結紮したウサギで、手術後の血清GOT、GPTの一時的上昇期が過ぎてから、加熱変性血漿を5ml輸注するとその都度一時的に、血清GOT、GPTは上昇し、反復輸注するについて血清GOT、GPTの基線が高くなる(図2)。その肝臓では明るく腫脹した肝細胞、星細胞の動員、グラーの細胞浸潤、軽度の線維化などがみられた(写真1)。他方、変性ウサギ血漿をadjuvantと共にウサギに免疫注射すると、Boyden法による赤血球凝集反応が陽性になり、抗体の出現が認められた。変性血漿蛋白輸注による肝障害が、免疫学的機序に関連する可能性を想定して次の検索を行なった。すなわち、犬肝homogenateを用いてウサギを免疫し、抗犬肝ウサギ血清を作成、これを犬血清で吸収した。犬血清、加熱犬血清および犬肝homogenateと犬血清で吸収した抗犬肝ウサギ血清との間に共通抗原性があるかどうかを免疫電気泳動法およびOuchterlony法で検討

ヒト血漿の2次元シアノガムゲル泳動像

ヒト保存血漿の2次元シアノガムゲル泳動像

p-A : preAlbumin

A : Albumin

 α_2 : α_2 -GlobulinFa₂ : Ceruloplasmin

Tf : Transferrin

H : Haptoglobin

Sa₂ : Slow α_2 β_L : β -Lipoprotein γ : γ -Globulin

ヒト加熱血漿の2次元シアノガムゲル泳動像

図1. 血漿の2次元シアノガムゲル泳動法による変性蛋白の所在の検索

図2. 加熱自己血漿反復輸注後のS-GOT値, S-GPT値の変化

写真1. 片腎莖結紮ウサギに加熱変性血漿を輸注したあとの肝組織像

したが、この方法では共通抗原は認められなかった。

したがって、保存あるいは加熱による変性血漿蛋白の輸注による、少なくとも初期の肝障害は肝細胞への直接有害作用と解される。他方、長期の注射による肝障害の成り立ちには免疫現象が関与する可能性も推定されたが、今までのところその機序を明らかにすることができなかった。

II. 肝障害による高酵素血漿の輸注実験

高酵素血を示す供血者血漿を正常犬に輸注すると、血清中GOT, GPTなかにはsorbit dehydrogenase (血清-SDH) も高値を示すが、24時間で殆ど前値に復し、以後上昇するものは認めない。また、ウサギで肝に流動パラフィンを注入し、犬で新しく調製した7.5%タンニン酸0.75~1.5mlの静注、犬肝動脈をクレンメで狭窄するなどの操作

図3. 薬物性肝障害家兎に対する輸血の影響

で肝を障害すると、血清中のGOT, GPTさらにSDHは上昇し、2ないし3日位持続する。この急性肝障害による高酵素値を示す血液を他の動物に輸注すると血清GOT, GPTは一時高値を示すが、急速に低下する。

急性肝障害により一時的に酵素の高値を示す血漿を他の動物に輸注しても持続する肝障害はおこらなかった。

III. 肝障害血を輸血する問題

蛋白同化ホルモン2-hydroxy-methylene-17α-methyl dihydro-testosterone (HMD) 3 mg/kgを片腎莖を結紮したウサギに連続投与すると、血清GOT, GPT殊にGOTは中等度に上昇する(図3の左部、輸血↓までの線)。その肝組織像では暗調細胞の軽度増加、一部に巣状壊死がみられ、星細胞の動員、グラーの軽度細胞浸潤などを示した。かかる肝障害を起こしたウサギの全血液を正常ウサギに輸血し、HMDを投与し続けると血清GOT, GPT, さらにsorbit dehydrogenase, alkaline phosphataseも上昇した。肝の組織像では暗調細胞の出現、水腫様腫脹、小さな壊死巣などが認められた(図4)。この現象は甚だ正確な再現性を示し、興味ある事実である。片腎莖の結紮といった

図4. 薬物性肝障害家兎血液の輸血による
血中酵素の変動

操作が関連することなど、複雑な発現機序が想定されるが、今日までのところその機序は解明されていない。

IV. 肝障害に及ぼす輸血の影響

先きのべたように、片腎莖を結紮したウサギにHMD 3mg/kgを投与し続けると、血清GOT, GPTは上昇し、肝に組織学的変化を認めるようになる。このようなウサギに40ml (約20ml/kg体重)の正常血液を輸血すると、血清GOT, GPTは一層著明な増加を示した(図3の後半)。また、既述のように犬に7.5%のタンニン酸を静注すると血清酵素値は上昇し、組織学的にも肝に出血、小壊死巣などを認める。このような犬に正常犬血漿を10ml/kg輸注すると血清GOT, GPTが上昇し、またsorbit dehydrogenaseも著しく上昇する。この成績は肝自体に新鮮な病変が存在する場合、比較的多量の輸血を行なうと、肝障害が一層増悪することを示唆する。

V. 抗肝抗体の問題

まず、犬の肝homogenateを用いてウサギを免疫し、抗犬肝ウサギ血清を作成、これを犬赤血球で吸収操作を施して後に、正常犬に輸注すると、血清GOT, GPTおよびSDHは一時的にせよ、明らかに上昇し、組織学的にも壊死巣をみとめ

た。

次に、ウサギの肝より超遠心法によりmicrosomeとその他の沈渣成分とを分離し、adjuvantと共にウサギを免疫すると、40日程して、そのウサギの血清にはBoyden法による赤血球凝集反応が陽性に認められるようになる。この血清は正常ウサギに輸注すると、血清GOT, GPTにはほとんど有意義の変動を認めなかったが、このウサギの肝を組織学的に検索すると肝細胞の水腫様変性、星状細胞の動員、散在性壊死巣などを認め(写真2a,b,c)、また心筋にも好酸性変性像を認めた。すなわち、この問題はadjuvant自体の検討も必要であるが、現段階では抗同種肝血清も肝障害を起こす可能性を示唆している。抗体の存在による肝障害については多くの実験成績の報告があるが、その考え方、成績は必ずしもまだ一致していない。殊にヒトの肝炎とどのような関連性をもたせるかについてもなお議論の多いところである。

そこでBoyden法に従って、諸肝疾患患者血清中に抗肝成分抗体の存否を検討した。すなわちFoil-mol処置羊赤血球と、抗原成分には新鮮ヒト肝のmicrosomeとその他の沈渣とを用い、患者血清の赤血球凝集反応を検索した。その結果、血清肝炎ではmicrosomeで14例中3例、他の沈渣では3例中1例に赤血球凝集反応が陽性であった。慢性肝炎ではmicrosomeで6例中1例に陽性であった。この赤血球凝集反応の陽性であるということと、臨床的肝機能検査(ZTT, TTT, S-GOT値, S-GPT値)との間には相関は認めえなかった。抗体の証明しうる血液が多量に輸注されると、受血者の肝に有害作用のある可能性は無視しえない。

次に、蛍光抗体法を応用して、肝疾患患者の血清中に肝に対する抗体の有無につき検討した。

今回は専ら直接法を採用した。すなわち、患者血清そのものに蛍光色素fluorescein isothiocyanateをラベルし、これを用いて正常および病的肝を蛍光染色し、特異蛍光の存在部位を確かめる方法を用いた。

各種肝疾患11症例の血清につき蛍光色素でラベ

(a)

(b)

(c)

写真2. ウサギ肝の同種免疫による抗肝 (microsome) 血漿の輸注によるウサギの肝障害

ルした γ -globulinを用いて正常肝 および 病的肝を蛍光染色した。この際、正常肝とは既往に黄疸なく、肝機能正常な6症例から手術によりとつたものであり、病的肝とは輸血後3カ月で肝機能障害を現わしfulminantな経過で死亡した症例の死

表1. 剖検肝 (Fulminant Hepatitisの例) に対する「蛍光抗体法」肝における特異蛍光の存在部位

蛍光染色液		Nucl. of liver cell	Bile ductule
自己のラベル血清		+	—
他の症例のラベル血清	永〇 (Viral hepatitis)	+	—
	前〇 (Chronic hepatitis)*	+	—
	長〇 (Liver cirrhosis)	+	—
	佐〇 (Liver cirrhosis)	+	—
	村〇 (Serum hepatitis)*	—	+

* この2症例は正常肝に対しても同一の部位に特異蛍光を認める

後3時間の剖検肝である。いずれの場合にも採取後直ちにdry ice-acetone中のn-hexane (-70°C)で凍結し、cryostat (-20°C)で 4μ の切片を作り、acetoneで固定、風乾後染色を施した。

1) 正常肝の蛍光染色

細胆管壁に限って特異蛍光を示した「村〇」例 (血清肝炎)、肝細胞核に限って特異蛍光を示した「前〇」例 (慢性肝炎) と二つの異なる型の特異蛍光が認められた。未だ検索症例も少ないが、正常肝組織の特定な構成部位に附着する因子 (おそらくは自己抗体) が肝疾患患者の血清中に存在することを示すもので甚だ興味がある。しかも、肝細胞核に対する抗体と、細胆管壁に対する抗体と、それぞれ異つたものが見い出されたことも臨床的には重要かつ興味ある問題である。

同様な事実をすでにPopperらも間接法により認めているが、肝炎の慢性化する機序の解明に一つの手掛となるばかりでなく、かかる血液の多量が輸血されるとき、受血者肝のうけるであろう障害は看過しえないであろう。

2) 病肝の蛍光色素 (表1)

正常肝を用いて染色した場合には、細胆管壁にのみ特異蛍光を示したラベル血清を病的肝に作用させても全く同様に細胆管壁に特異蛍光を示した。しかも、正常肝の場合と異なり、グ鞣外の末梢細胆管壁にも同じような特異蛍光を認めることが特徴的である (写真3)。

他方、正常肝を用いた場合には肝細胞核のみに

写真3. 特異蛍光はグ氏鞘外の末梢細胆管壁にまで認められる。

写真4. 特異蛍光は肝細胞核に限って認められるが、正常肝を染めた場合に比し、染まり方が不均等である。

特異蛍光を示した血清はただ1例のみであつたが、病的肝を用いて検索すると、さらに4症例の血清が同じく病的肝細胞核に特異蛍光を示した。この場合、特異蛍光の認められる核の分布は正常肝を用いた場合に比してまばらで、染まる細胞核と染まらない細胞核とが明らかに区別出来た(写真4)。肝疾患患者の蛍光色素で標識した血清で病的肝を染色すると、正常肝を染色した場合よりも、より多くの患者血清の中に抗肝細胞核抗体を発見することができる。この事実は、病的状態にある肝はより容易に抗体の侵襲をうけるものと推定される。

VI. 結 語

ビールス以外の要因によつても、輸血後肝障害

がおこる可能性がある。この点を免疫学的立場から多角的に検討した成績を述べた。

1) 保存による血漿蛋白は変性し、その輸注は一過性ながら肝障害をおこすことがある。

2) 肝障害による高酵素血漿を輸注しても、それ自体では肝障害の原因とはなり難い。

3) 蛋白同化ホルモン (2-hydroxy-methylene-17 α -methyl dihydro-testosterone) を投与し、片腎莖を結紮すると血清GOT, GPTは上昇する。この全血液を輸注すると受血者肝は障害される。

4) 肝に新しい障害のある個体では、多量輸血によりその障害は増悪する可能性がある。

5) 異種および同種間の肝microsomeによる免疫血清は、多量輸注により、受血者に肝障害をおこす可能性がある。なお、肝疾患患者の血清中にはBoyden法による赤血球凝集反応で、肝microsomeに対する抗体が認められる症例がある。

蛍光抗体法を応用して、肝疾患患者血清中に、正常あるいは病的肝の肝細胞核あるいは細胆管壁にのみ特異蛍光を発せしめる抗体の存在が認められた。

肝炎の慢性化の機序を解明する手掛りとなる可能性をもち、他方、かかる血漿が多量に輸注されると、肝に障害的影響をもたらす可能性がある。

文 献

- 1) Cameron, G.R., Milton, R.F. and Allen, J. W.: Toxicity of tannic acid. An experimental investigation. *Lancet* 2: 179, 1943. —2) Cohen, S., Ohta, G., Singer, E.J. and Popper, H.: Immunocytochemical study of gamma globulin in liver in hepatitis and postnecrotic cirrhosis. *J. exp. Med.* 111: 285, 1960. —3) Dodd, M.C., Bigley, N.J., Geyer, V.B., McCoy, F.W. and Wilson, H.E.: Autoimmune response in rabbits injected with rat and rabbit liver ribosomes. *Science*. 137: 688, 1962. —4) Gerlach, U.: Zur klinischen Bedeutung der Aktivitätsmessung von Sorbitdehydrogenase in menschlichen Blutserum. *Klin. Wschr.* 37: 93, 1959. —5) 石井潔, 山本祐夫: 肝炎とアレルギー, 肝臓, 2: 400, 1962. —6) 亀田治男, 山口潜: 肝疾患を中心とした自己免疫現象について, 日内会誌, 51: 749, 1962. —7) 小坂淳夫, 長島秀夫: 肝疾患と自己免疫, 日本

臨床, 20 : 25, 1963. —8) Paronetto, F., Rubin, E. and Popper, H.: Local formation of γ -globulin in the diseased liver, and its relation to hepatic necrosis. Lab. Invest. 11 : 50, 1962. —9) Paul Havens, W. Jr.: Role of autoimmune mechanisms in liver diseases. Ann. New York Acad. Sci. 104 : 1074, 1963. —10) Poulik, M. D. and Smithies, O.: Comparison and combination of the starch-gel and filter-paper electrophoretic methods applied to human sera. Two-

dimensional electrophoresis. Biochem. J. 68 : 636, 1958. —11) Soergel, K.H. and Friedell, G.H.: Nonspecific effects of liver extract-adjuvant injection in guinea pigs. A morphologic and immunologic study. J. Lab. clin. Med. 64 : 51, 1964. —12) Wallenius, G., Trantman, R., Kunkel, G. and Franklin, E.C.: Ultracentrifugal studies of major non-lipide electrophoretic components of normal human serum. J. biol. Chem. 225 : 253, 1957.