シンポジウム 自己免疫性疾患

発言 自己免疫性肝疾患の発生機転と自己抗体の病因的意義

熊本大学医学部第三内科教授

長島 秀夫

SYMPOSIUM ON AUTOIMMUNE DISEASE. STUDIES ON MECHANISM OF LIVER CELL DAMAGE AND SIGNIFICANCES OF AUTOANTIBODIES IN AUTOIMMUNE LIVER DISEASES

Hideo NAGASHIMA

Professor of the Third Department of Internal Medicine, Kumamoto University Medical School

肝細胞障害の免疫機構を明らかにするためには、humoral immunityとcell mediated immunityからの検討が必要であるが、それには臓器特異抗原および抗体の検索が重要である。活動性慢性肝炎や肝硬変のような慢性肝疾患ではしばしば流血中に各種の肝細胞成分に対応する抗体が比較的持続して出現するようになる。in vitroの実験からはこれらの循環抗体のうち肝細胞膜ないしcell surface antigensに対する抗体（以下膜抗体と略す）が肝細胞障害を起こす可能性があることを示唆した。肝細胞膜の分離、精製はラット肝細胞よりTakeuchi, H. & Terayama, H. らの方法(Exptl. Cell Research, 40 : 32, 1965), 肝細胞成分(mitochondria, nuclei, homogenate上清)の分離はHogeboom, G.H. らの方法に準じた。これらの各抗原にFreund's complete adjuvantを加え、型の如くウサギを免疫してそれぞれの抗血清をえた。これらの抗血清は何れもplate gel chromatographyで γ G分画の増量がみられた。

膜抗体の検出には、先づラット肝をRinaldini氏液で充分灌流し、同液中で肝を細断し、4℃でゆつくり4～5時間攪拌し、200メッシュのステンレス製ネットで濾過し、500 rpm, 10分、低温下で遠沈し、遊離細胞を集め、TC- 199で細胞数を

2×10^5 /mlに調製する。これをsingle cover slip methodで37℃に24時間静置した。さらに、cover slipに附着した肝細胞を0.5%のlactoalbumin hydrolysate加生食水で3回洗浄後、抗血清をcover slipが充分覆われるだけ加え、室温2時間放置後、上述の生食水で2回洗浄、過剰の抗体を除去する。次いで、タンニン酸処理血球に蛋白量10 mg/mlに希釈した肝抗原〔homogenate上清成分(35,000 G, 4時間遠沈)〕を赤血球に被覆したものをcover slipが覆われるだけ加え、室温2時間放置後、前と同様に2回洗浄後、鏡検すると、肝細胞に赤血球がロゼット状に粘着し、homogenate上清に対する抗体（以下homogenate抗体と略す）にも一部膜抗体が含まれることを明らかにした。また、膜抗体の肝細胞障害性をみるために、肝細胞浮遊液（細胞数 5×10^4 /ml）1.0mlに抗血清0.5 ml, Hanks液を1.0ml加え、37℃, 60分incubateし、対照として正常血清、非働化した補体(56℃, 30分)を加えたものにつき、1,000rpm, 10分遠沈後の上清についてイソクエン酸脱水素酵素（ICDH）、グルタミン酸脱水素酵素（GDH）の活性を比較検討すると、膜抗体を含む抗血清の場合はICDHの肝細胞よりの遊出が対照にくらべて2～3倍高く、mitochondriaに主として含まれるGDHの遊出は有意の差がみられない。

Fig. 1. Photomicrograph of immunofluorescence experiment. (Original magnification $\times 400$).

Left: Liver cell suspension has been exposed to anti-membrane serum followed by fluorescein conjugated anti-rabbit γ -globulin goat serum. The periphery of the cell display intense fluorescence characteristic of cell membrane localization of the antigen.

Right: Control experiment performed on the same cell suspension exposed to normal rabbit serum. The cell failed to show ring like staining.

このさい 0.5% trypan blue による可染細胞の増加は released enzyme activity の増加と平行するが、ワールブルグ検圧法による肝細胞の酸素消費量の測定には有意の差がみられず、mitochondria には直接の作用がないと考えられた。同様の条件で mitochondria 抗体を肝細胞に作用させた場合には、肝細胞膜への抗体の結合および肝細胞よりの酵素の遊出はみられない。さらに、immune adherence 法を応用して膜抗体を検出した。臨床例については肝生検でえた肝組織より肝細胞を分離し、遊離肝細胞 glucose gelatin veronal buffer (gl-GVB) 浮遊液(細胞数 $10^5/\text{ml}$) 0.2ml に患者血清(56°C, 30分非働化) 0.2ml を加え、37°C, 30分ついで 0°C, 30分 incubate し、冷 gl-GVB で 2 回洗浄後、O 型ヒト正常血清(20倍希釈) 0.2ml に浮遊し、37°C, 5分 incubate し、ヒト O 型 Rh+ 赤血球 ($2 \times 10^8/\text{ml}$) 0.1ml を加え、37°C, 10分 incubate 後鏡検する。肝細胞の膜面に赤血球が粘着し、ロゼットを形成するものを陽性とする。また、この方法に準じて、前述の各抗血清のラット肝細胞膜への親和性を検討し、この方法でも膜抗体以外に homogenate 抗体中にも膜抗体が含まれることを示した。さらに、Neville, D.M. の方法

(Biochim. Biophys. Acta, 154: 540, 1968) により肝細胞浮遊液 0.1ml に抗血清(膜抗体) 0.1ml を加え、4°C, 30分後、22% sucrose-1 mM MgCl_2 で 2 回洗浄後、fluorescein conjugated anti-rabbit γ -globulin goat serum と 30分、室温で incubate し、前と同様に洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。膜抗体では明らかに肝細胞の周辺にリング状の強い蛍光がみられ、homogenate 抗体でも同様の所見がえられるものがあつた(写真 1)。

臨床例につき immune adherence 法で膜抗体の出現率を検討した。経時的観察では、急性肝炎 41.1% で、同時に homogenate 抗体や mitochondria 抗体の出現率も高いが、急性肝炎(遷延型) 7.6%、慢性肝炎(非活動型) 3.6% にくらべて慢性肝炎(活動型) 18.4% と高いことが注目され、homogenate 抗体や mitochondria 抗体とはかならずしも平行して出現しない。以上から、抗肝抗体のうちでも膜抗体が免疫学的肝細胞障害因子の一つとして重視され、再検討される必要があることを指摘した。

文 献

- 1) 長島秀夫：肝臓に関する問題への新しいアプローチ 6) 免疫の面から、日消会誌, 66, 1171, 1969.