抗 GPT (glutamic pyruvic transaminase) 抗体を 検出し得た慢性肝炎の 1 例

公立南丹病院内科

梶田 芳弘[◇] 内藤 雅裕 塩津 徳晃

京都府立医科大学第二内科学教室

間嶋 崇哉 宮崎 忠芳 吉村 学

越智 幸男 伊地知浜夫

A CASE REPORT OF CHRONIC HEPATITIS WITH ANTIBODY FOR GLUTAMIC PYRUVIC TRANSAMINASE IN SERUM

Yoshihiro KAJITA, MD, Masahiro NAITO, MD and Noriteru SHIOZU, MD

Department of Internal Medicine, Nantan Hospital, Kyoto

Takaya MAJIMA, MD, Tadayoshi MIYAZAKI, MD, Manabu YOSHIMURA, MD,

Yukio OCHI, MD and Hamao IJICHI, MD

Department of the Second Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto

概要 酵素結合性免疫グロブリンの存在は既にアミラーゼ, LDHの場合に証明され, 現在自己抗体の観点から検索がなされている. 逸脱酵素である glutamic pyruvic transaminase (以下GPT) と結合する免疫グロブリンを血中に証明した報告は, われわれの知る限り未だない. 今回¹²⁵I-ブタGPTを用いて二抗体法, ゲル濾過法および放射性免疫電気泳動法により, 血清中にGPTと結合する免疫グロブリンを認める症例を経験したので報告する. 患者は49才, 男子で, 肺結核の治療中, 肝腫大と肝機能異常に気付かれ, 肝生検により活動型の慢性肝炎と診断した. 検査所見では, GOT, GPTおよび血清 γ -グロブリンの軽度増加を示すのみで, クームステスト, 抗核抗体等自己抗体は陰性であった. ¹²⁵I-ブタGPTと患者血清を静置後, Sephadex G-200によるgel-filtrationでは放射能はvoid volumeに認めた. これは添加されたGPT(M.W. 約115,000)が免疫グロブリンと結合したためと考えられた. この抗体はIgGの κ 型と推定され, そのmonoclonalな性格は抗体産生側の失調を疑わしめた. また本患者の抗体は, その抗体を有しないGPT活性高値のヒト血清で標識ブタGPTがdisplaceされる事より, ブタおよびヒトGPT蛋白とも交叉反応を有する抗体と考えられた. この結果から, この抗体の存在時には血清GPT活性は真値を示さない事, さらに肝障害の慢性化に自己免疫的機序が関与している事が示唆された.

はじめに

自己免疫疾患の診断において, 自己抗体の検出

は臨床的に必須不可欠なものであり, かつこの抗体の意義は, 疾患の病態の解明につながる重要な問題である. 臨床的に自己抗原となり得るものとして, サイログロブリン, 磷脂質 (cardiolipin), γ -グロブリン, 赤血球膜, 核酸等が認められてお

〔昭和52年1月17日受稿〕

本論文の要旨は第16回臨床化学シンポジウム (昭和51年11月27日, 京都) において発表した.

り、これらに対する自己抗体は、血中で抗原抗体複合物 (immune complex) としても証明される場合がある。これら複合体のもつ病因的意義が注目されつつあり、糸球体腎炎、慢性関節リウマチ等の発症機序への関与が注目されている。

他方ホルモンおよび酵素に対する自己抗体の存在も近年注目されはじめてきた。血中に存在する酵素において、これが免疫グロブリンと複合体を形成する現象が、amylase(Wildingら¹⁾), lactic acid dehydrogenase (Garnot²⁾, Biewenga³⁾, Nagamine⁴⁾, Markel ら⁵⁾) において認められ、前者は macroamylasemia, 後者は LDH-isozyme anomaly と呼称され、その頻度は必ずしも少なくないと Berkら⁶⁾は報じている。

今回わたくし共は、慢性肝炎の一患者において、血清 glutamic-pyruvic transaminase(以下GPT) に対する自己抗体の存在を見出し、その抗体の性状および臨床像について検討したので報告する。

症 例

患者： 49才、男子、公務員。

主訴： 全身倦怠感。

既往歴： 特記すべきものなし。

現病歴： 昭和50年10月検診にて左肺尖部に結核様浸潤像を認め某医にて11月より、SM, PAS, INHAによる治療を受けていたが昭和51年3月肝機能検査で、GOT 90.0単位GPT 120.5単位の上昇がみられ、その後も両者の軽度高値が持続したため同年7月公立南丹病院に入院した。

入院時現症： その主なるものは、右季肋下部に、やや硬い肝を3横指触知する事で、貧血、黄疸もなく手掌紅斑、くも状血管腫等その他の異常所見もなかった。

検査成績： その主なるものは表1の如くであり、血沈、血液検査は正常、肝機能ではGOT 62単位、GPT 74単位、LAP 220単位とやや高値、ジアグノグリーントテストも12.5%とやや異常を認めた。脂質、電解質、尿、便はいずれも正常であったが、血清 γ -グロブリンは約1.7g/dlとやや高値を示した。免疫学的検査は表2に示す。IgG

表1. 入院時一般検査成績

Blood			β -Lipoprotein	285
RBC	443 $\times 10^4$		Serum Na	145
Ht	42.0		K	4.7
WBC	6000		Cl	102
ESR	6		Ca	4.6
Biochemical			P	3.0
GOT	62		Total protein	7.2
GPT	74		Alb	47.5
Al-P	8.7		α -gl	4.5
LAP	220		α -gl	13.0
r-GTP	26		β -gl	11.0
Ch-E	15		γ -gl	24.0
TTT	2.5		Urinalysis protein	(-)
ZTT	14.3		sugar	(-)
ICG(15mins)	12.5		urobilinogen	normal
Cholesterol	152		Stool occult blood	(-)
Triglyceride	76			

表2. 免疫学的検査成績

Ig G	2200	mg/dl
A	187	
M	131	
α -FP	5.6	mg/ml
HBs Antigen	(-)	
Antibody	(+)	
Coombs Direct	(-)	
Indirect	(-)	
LE cell	(-)	
LE test	(-)	
ANF	(-)	
Thyroid test	(-)	
Microsome test	(-)	
CRP	(-)	
R A	(-)	
ASLO	100	Todd U
Tuberculin R.	8.4 $\times$ 4.6	cm
DNCB Score	+3	
STS	(-)	

2200mg/dl, IgA 187mg/dl, IgM 131mg/dlであり、 α -fetoproteinは正常範囲、HBs抗原陰性で、HBs抗体は陽性であった。その他の自己抗体は陰性であった。

腹腔鏡および肝生検所見： 腹腔鏡では、肝臓は腫大し、表面は白色斑状肝を呈し、慢性肝炎を疑わしめた。肝生検像では、小葉間結合組織中に著明なリンパ球浸潤像を認め、そのリンパ球は限界板をこえ、又一部piecemeal necrosisを含んだ、いわゆる活動型の慢性肝炎の像を示していた(図1)。

入院後安静および高蛋白食、糖質輸液にて経過観察をした。GOT, GPTは徐々に低下傾向を示したが、なお軽度高値を持続した(図2)。

抗GPT抗体の証明方法

Boehringer社製のブタ心臓GPTを、クロラミンT法にて¹²⁵Iで標識して使用した(比放射能250 mCi/mg蛋白)。

図1. 肝生検組織像, HE染色, ×100

図2. 抗GPT抗体の経時的変動

$$\frac{B}{T} = \frac{\text{Bound}}{\text{Total}}; \text{ } ^{125}\text{I-ブタGPT結合率}$$

(1) 患者血清の $^{125}\text{I-GPT}$ 結合能の検討

患者血清0.01mlに $^{125}\text{I-GPT}$ 0.1ml (pH 7.4 phosphate bufferで10,000~15,000cpmに希釈して使用), pH 7.4 phosphate buffer 0.8mlを加え4℃48時間で静置後, 抗ヒト $\gamma\text{-gl}$ 羊血清 (自家製) を0.1ml加え4℃24時間静置した。その後4℃30分3,000rpmで遠心分離し, その上清および沈渣の放射能を測定し, bound%を求め正常血清の場合と比較した。

(2) 血清中のGPT結合蛋白のgel-filtrationによる証明

$^{125}\text{I-GPT}$ (500,000cpm) と患者血清または正常人血清の0.5mlと, pH 7.4, 0.1M phosphate bufferを加えて全量1.0mlとして, 4℃24時間静置した後, Sephadex G-200でgel-filtrationを行なった。カラム (1.3×90cm) に全量1.0mlの試料を添加した後, pH 7.4, 0.1M phosphate bufferにて溶出

させた。また患者血清と $^{125}\text{I-GPT}$ を上記と同様の条件で静置後, IN-HClでpH 3.0とし30分静置しカラムに添加した。次いでpH 3.0 glycine bufferにて酸性解離をした。また患者血清と $^{125}\text{I-GPT}$ に, cold pig GPT 1mgを加え上述の如く静置後, pH 7.4, 0.1M phosphate bufferにて溶出させた。

(3) GPT結合免疫グロブリンのClassおよびL鎖Typeについての検討

この場合の結合グロブリンのclassの決定のためSigma社製抗ヒトIgG, 抗ヒトIgA, 抗ヒトIgMウサギ血清を使用して, (1)の方法に準じ行なつた。L鎖typeの決定には, Hoechst社製抗ヒト κ 鎖, 抗ヒト λ 鎖ウサギ血清を使用し, さらに抗ウサギ $\gamma\text{-gl}$ ヤギ血清 (自家製) 0.1mlを加えて一昼夜静置し, 沈殿分画の放射能を測定した。

(4) 放射性免疫電気泳動法によるGPT結合蛋白の分析

患者血清と $^{125}\text{I-GPT}$ を混じ, 6時間保生後, 免疫電気泳動をHoechst社製抗ヒトIgGウサギ血清で展開した。染色後, ラジオオートグラフィーを施行した。

(5) 血中抗体のヒトおよびブタGPTとの交叉反応性

患者血清 0.01ml, $^{125}\text{I-GPT}$ 0.1ml (10,000~15,000cpm), pH 7.4 phosphate buffer 0.8mlにブタ心臓GPTを0.05, 0.1, 0.2, 2.0 μg 加え4℃48時間静置後, 上述の抗ヒト $\gamma\text{-gl}$ 羊血清を0.1ml加えさらに4℃24時間静置した後, 沈殿分画の放射能から, displaceされる $^{125}\text{I-GPT}$ の値を求め交叉反応性を検討した。

またヒト血清GPTによりdisplaceされるか否かをさらに検討するため次の実験を行なった。患者血清0.01ml, $^{125}\text{I-GPT}$ 0.1mlの反応系に抗GPT抗体陰性のGPT活性高値 (390単位および810単位) の血清を0.01mlずつ加え静置後, 抗ヒト $\gamma\text{-gl}$ 羊血清を0.2ml加え再び静置後, 遠心分離し沈殿分画の放射能を検討した。

抗GPT抗体にかんする諸成績

(1) 患者血清の $^{125}\text{I-GPT}$ 結合能

正常人血清での ^{125}I -ブタGPTとの結合率は10%以下であるのに反し、患者血清では毎回20%以上を示した。2～3週間々隔で採血した患者血清の結合率を同時assayして、GPT活性との関連をみた。初診時より現在まで結合率は28%前後で著変を認めないが、7月の入院時より血清GPT活性は著明に低下傾向を示した(図2)。すなわち逸脱酵素としての酵素活性は漸減傾向を示すのに反し、GPTの結合能は高値を持続した。この成績は、患者血清中にGPT結合蛋白が高濃度に存在する事を示すもので、さらに次の検討を行なった。

(2) ^{125}I -GPT 結合蛋白の gel-filtration による 証明

Sephadex G-200を用いて蛋白の分画を行なった結果、正常人血清を対象とした場合 pH 7.4 phosphate bufferによる溶出では放射能は殆ど2nd peak (7S) に認めたのに反し、この患者血清では void volumeに放射能のほとんどを認め、他方酸性glycine bufferの場合には放射能は2nd peakに検出された。この事は、ブタGPTの分子量が約115,000であり、未結合のGPTが第2分画に溶出されるのに反し、結合されたGPTはvoid volumeに溶出される事を示すものである。さらにcold pig GPTの添加により放射能は2nd peakに移行する(図3)。以上より、本患者血清中には、GPTと結合する蛋白が存在し、そのGPTと結合蛋白は酸性で解離し、cold pig GPTによりdisplaceされる事を示す。よつてこの結合能を示す蛋白についてさらに次の検討を行なった。

(3) GPT結合蛋白の性状

上述の成績から本患者血清中にはブタGPTと結合能を示す免疫グロブリンの存在が示されたので、そのclassおよびL鎖typeを求めるため、 ^{125}I -ブタGPTと患者血清を混和した後抗IgG、抗IgA、抗IgM、抗 κ 、抗 λ 抗体を添加し沈降反応をおこしめ、沈殿物中の放射能を検討した。その成績は表3の如く、正常人血清の場合には約10%前後の値を示すのに反し、本患者血清では抗IgA、抗IgM抗体の場合には沈殿分画中の放射能は正常人

図3. Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィー

表3. 抗GPT抗体の免疫学的性質

Rabbit Serum	B/T (%)	
	Patient Serum (1976.6.10)	Normal Serum
Anti-IgG	25.4 %	10.8 %
Anti-IgM	8.5 %	10.2 %
Anti-IgA	11.8 %	9.5 %
Anti- κ	26.3 %	10.6 %
Anti- λ	11.0 %	10.1 %

• Sheep antiserum against rabbit γ -globulin was added.

血清の場合と近似の値を示すが、抗IgG抗体の場合は患者血清において著明に沈殿分画中の放射能は増加した。又抗 κ 抗体の添加により著明な結合率の増大がみられたが、抗 λ 抗体では正常人血清の場合の値と近似の値に止まった。この実験により、この結合蛋白はIgG(κ)と推定され、この抗体はmonoclonalな性格を持つと想定された。

(4) 放射性免疫電気泳動法による抗体の検出
患者血清のIgGに ^{125}I -GPTの放射活性が認められた。なお正常人血清のIgGには放射活性は認められなかつた(図4)。また図には示さなかつた

図4. 患者血清の免疫電気泳動(上段)および放射性免疫電気泳動(下段)患者血清のIgGに放射性活性が認められる。

が患者血清のIgA, IgMにも認められなかつた。抗 κ 抗体の場合には抗IgGよりも弱い放射活性を認めたが、抗 λ 抗体では認めなかつた。この事は、抗L鎖抗体の抗体価が弱いと推定され、放射性免疫電気泳動法よりも前述の実験の如く、被検血清と抗L鎖抗体を加えさらに第二抗体を加えて沈殿させる方法が定量的検索にすぐれていた。

(5) ブタ心由来のGPTに対する抗体とヒトおよびブタGPTの交叉反応性について

ヒトおよびブタ由来の非標識GPTを反応系に多量添加する事により結合率が低下するが、この成績はGPTと結合能を示す免疫グロブリンと ^{125}I -ブタGPTとの結合を、この両者が阻害する事により ^{125}I -GPTがdisplaceされたものと考えられた(図5)。本患者血清の抗GPT抗体は、 ^{125}I -ブタGPTとの結合能より上述の方法で測定したが、ここに述べた如くヒトGPTでもある程度のdisplaceが起こる事より、この抗体はヒトおよびブタGPTの両者

図5. 非標識ブタGPTおよびヒトGPTによる患者血清からの ^{125}I -ブタGPTの解離

と反応する事を示唆する。故に、この抗体はヒトおよびブタGPTと交叉反応性を有するものと思われる。

考 案

酵素結合性免疫グロブリンの存在を証明した臨床例は、Wildingら¹⁾がglobulin-bound amylaseの症例を報告して以来、数多くの報告がある。当初macroamylasemiaと呼ばれていたが、現在ではamylase結合性免疫グロブリンの病因的意義が検索されている。しかしHansenら²⁾が述べた様に、特定の疾患との関連は少ないものと推定され、かつ本症と自己免疫疾患との直接的関連も現時点では不明である。

Garnot²⁾により、LDH結合性免疫グロブリンの存在が、LDH-isozymeの分画異常から見い出された。それ以前にも、この異常ザイモグラムを示す症例⁸⁾⁹⁾が報告されていたが、自己抗体の面からは言及されてなかつた。しかしGarnotの報告例がlupoid cirrhosisであつた事より注目され、この様な抗酵素抗体およびその免疫複合体が、病因論の立場において如何なる意義をもつものであるかの課題のもとに研究されつつある。

今回わたくし共は、肝臓および心臓などからの逸脱酵素の一つであり、臨床的に有力な指標の一つとして評価されているGPTの抗体が一慢性肝疾患患者の血清中に存在する事を、 ^{125}I -ブタGPTを用いての二抗体法、ゲル濾過法および放射性免疫電気泳動法で証明した。またヒトGPTとも反応する事から、哺乳動物のGPTの共通の抗原に対してできた抗体かも知れない。この抗GPT抗体が免疫複合体として血中に存在するか否かは明らかでないが、Sephadex G-200を用いたgel-filtrationによる解析では ^{125}I -GPTの大部分がvoid volumeに溶出される事から、免疫複合体として体内に存在する可能性も大きいものと推定される。

一方酵素活性測定面に限って考えると、抗GPT抗体を保持する症例では、この抗体が阻害因子となる事も推定され、この場合の血清GPT酵素活性は真値ではなく、血清GPT活性を逸脱酵素量

として肝機能の指標とみなすのは、一つの問題点となるであろう。

この様な血中抗GPT抗体を検出した症例は、われわれが調べた限り類似の報告を見出し得なかつた。現在この様な抗酵素抗体の産生機序は明確ではないが、この自己抗体がκ型であるらしい事から、もしmonoclonalなものと考えるならば、抗体産生側の異常が原因とも推定される。自己免疫性溶血性貧血時の抗赤血球膜抗体¹⁰⁾やインスリン自己免疫症候群¹¹⁾の時にも、monoclonalな抗体が出現するという報告があり、この際抗体産生組織に変調が起こつたためと理解されており、わたくし共の報告した症例も、これらの疾患と同一の機序での発病も否定できない。

他方この様な血中に常時存在する逸脱酵素に対する抗体産生が起こる事は、肝障害を生じる何等かのtriggerによつて、GPT酵素蛋白自体の変性が起こり、GPT蛋白構造のconformationの変化により抗原性の獲得が惹起されたとも推論される。

この症例の場合の抗GPT抗体は、精製されたヒトGPT製品が入手出来なかつたので、精製ブタGPT製品を用いて二抗体法で検討した。本患者の抗ブタGPT抗体は、その抗体を有しないGPT活性高値のヒト血清で標識ブタGPTがdisplaceされるので、ヒトGPT蛋白とも交叉反応を有する抗体と考えられる。この事より本症の抗体は、ブタおよびヒトGPT蛋白の共通抗原性部分へ出来たと推定される。

何れにしても慢性肝障害時の病因論に、この自己抗体の関与する意義を証明する事は、諸疾患時の慢性化機序ならびに自己免疫現象の病態生理の究明に役立つものと思われる。

結 語

肺結核で治療中、肝機能異常を示した49才の男性患者の血清中に、ブタGPTと結合性を有する免疫グロブリンの存在を見出した。この免疫グロブリンのclassはIgGで、L鎖のtypeはκと思われ、ヒトGPTで結合グロブリンとブタGPTとの結合が解離される事より、この抗体はヒトGPTに対する自己抗体と思われる。この抗体の病因論的および臨床的意義にかんして考察した。

文 献

- 1) Wilding P, et al: Globulin-bound amylase. *Ann Intern Med* 60: 1053, 1964. —2) Garnot PO: Lupoid cirrhosis with serum lactic acid dehydrogenase linked to an γA immunoglobulin. *Experimentia* 23: 593, 1967. —3) Biewenga J: Serum lactate dehydrogenase isoenzymes linked to immunoglobulin A. *Clin Chim Acta* 40: 407, 1972. —4) Nagamine, M: Lactate dehydrogenase isoenzymes linked to immunoglobulin A in two cases. *Clin Chim Acta* 36: 139, 1972. —5) Markel SF and Janich SL: Complexing of lactate dehydrogenase isoenzymes with immunoglobulin A of the kappa class. *Amer J Clin Pathol* 61: 328, 1964. —6) Berk JE, et al: Macroamylasemia. *New Engl J Med* 277: 941, 1967. —7) Hansen HR: Macroamylasemia due to binding by protein. *Amer J Med* 52: 712, 1972. —8) Kreutzer HH: Lactate dehydrogenase isoenzymes: irregularities in electrophoretic mobility. *Clin Chim Acta* 11: 159, 1965. —9) Lundh B: A macromolecular serum lactate dehydrogenase activity in a case of leukemia. *Clin Chim Acta* 16: 305, 1967. —10) 見坊 隆, 平田幸正: インスリン自己免疫症候群におけるインスリン結合抗体のimmunoglobulin classならびにlight chain typeについて. *糖尿病* 19: 53, 1976. —11) 深瀬政市, 他: 血液の生化学 (吉川春寿, 中尾喜久編集) 朝倉書店, 東京, 1974, p 662.