原 著

Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 反応培養により単球系細胞が分泌した 上澄の肝細胞障害性の研究

大阪市立大学医学部第三内科

東森 俊博[○] 溝口 靖紘 阪上 吉秀

門奈 丈之 山本 祐夫

大阪市立大学医学部第一生化学

森沢 成司

STUDIES ON HEPATOCYTOTOXICITY BY CULTURE SUPERNATANT OF MONOCYTES IN ANTIBODY-DEPENDENT CELL-MEDIATED CYTOTOXICITY (ADCC) REACTIONS

Toshihiro HIGASHIMORI, MD, Yasuhiro MIZOGUCHI, MD, Yoshihide SAKAGAMI, MD,
Takeyuki MONNA, MD and Sukeo YAMAMOTO, MD

The Third Department of Internal Medicine, Osaka City University Medical School, Osaka
Seiji MORISAWA, MD

The First Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School, Osaka

概要 慢性活動性肝炎においては、antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) による免疫学的肝障害の可能性が支持されている。本研究においては、慢性活動性肝炎患者の末梢血単球系細胞がADCC反応におけるeffector細胞として作用しうるか否かを検討した。その結果、慢性活動性肝炎患者血清中に存在する抗肝細胞膜抗体、または実験的に誘導した抗肝細胞膜抗体を介するADCC反応のeffector細胞として、本症患者末梢血の単球系細胞が作用することを認めた。次に諸種の肝疾患患者における末梢血単球系細胞のeffector細胞機能について、検討を加えた。急性肝炎、慢性活動性肝炎患者の単球系細胞はeffector細胞の機能を備えているが、一方、肝硬変、肝癌患者末梢血の単球系細胞は、effector細胞としての機能の低下、または欠除の状態にあることが認められた。これらの結果から、少なくとも慢性活動性肝炎の免疫学的肝障害に、単球系細胞をeffector細胞とするADCCが関与する可能性が示唆された。

結 言

最近、慢性活動性肝炎の肝細胞障害において antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) の関与が注目され、また、ADCC反応を指標とした実験系を用い、本症患者の血清中に抗肝細胞膜抗体がかなり高率に検出されている¹⁾。

このADCC反応は、抗体分子のFab部分が標的細胞に、また抗体分子のFc部分がeffector細胞に結合することによつて惹起されるが、effector細胞の細胞種に関しては議論の分かれるところであり、細胞表面にFcレセプターを有するリンパ球(K細胞)のほか、単球-マクロファージ系の細胞も場合によつてはeffector細胞となることが示唆されている²⁾³⁾。

〔昭和57年2月10日受稿〕

著者らは健常人末梢血リンパ球をeffector細胞として、慢性活動性肝炎患者の血清中に存在する抗肝細胞膜抗体をADCC反応によつて測定し、本症患者の51.2%に抗肝細胞膜抗体を検出した⁴⁾。また、ヒト末梢血リンパ球の代りに、モルモットの腹腔浸出マクロファージをeffector細胞としても、ADCC反応によつて慢性活動性肝炎患者の血清中に含まれる抗肝細胞膜抗体が検出されることを明らかにした⁵⁾。すなわち、ADCCにおいてはリンパ球のみがeffector細胞(K細胞)となるとは限らず、Fcレセプターを有するマクロファージでもeffector細胞として作用する場合があると考えられる。慢性活動性肝炎患者の末梢血には、K細胞の比率が減少しているため、抗肝細胞膜抗体が存在していても、ADCC反応が起こり難いとする報告もある⁶⁾。しかし、この場合にマクロファージがeffector細胞として働けば、antibody-dependent macrophage-mediated cytotoxicity反応が惹起される可能性が考えられる。そこで、本報においては、各種肝疾患患者の末梢血単球系細胞をeffector細胞として用いた場合に、ADCC反応が起こるか否かを検討し、antibody-dependent monocyte-mediated cytotoxicity(ADMC)の成立の可能性をしらべた。また、ADMCによつて各種肝疾患患者末梢血中の単球の機能を解析した。

実験対象および実験方法

1. 対象

急性肝炎9例、慢性活動性肝炎9例、肝硬変6例、肝癌6例および健常人8例について検討した。これらの患者はいずれも免疫抑制薬ないし免疫賦活剤の投与はうけていない。

2. ヒト末梢血単球由来の粘着性細胞の調製

各種肝疾患および健常人のヘパリン加末梢血をそれぞれ10ml採取し、Ficoll-conray比重遠心法によつて単球を含む単核細胞を分離し $2 \sim 3 \times 10^6$ cells/mlの細胞浮遊液を調製した。このような細胞浮遊液4mlを、前もつて非働化ウシ胎児血清(FCS)でコートした平板シャーレに加え、CO₂細胞培養器中で5%CO₂を含む高湿度の空気を通じながら、37℃で60分間培養し、非吸着性細胞を

除去した。ついで、冷却した0.2%EDTAおよび5%FCSを含むphosphate buffered saline (pH 7.4) 5mlをシャーレに加えて振盪攪拌した後、4℃で15分間静置し、遠心によつて細胞を集め、10%FCSを含むイーグルMEM液で洗浄後、同じ溶液で細胞濃度 2×10^6 cells/mlの細胞浮遊液を調製した。以下、このような単球由来の粘着性細胞をeffector細胞として、分離肝細胞に対するADMCを検討した。

3. ADMCの測定

ADMCの標的細胞としては、ラットの肝臓からBellemannらの方法⁷⁾に準じて分離した分離肝細胞を用いた。この分離肝細胞浮遊液(4×10^4 cells/ml) 0.25mlに同量のIgG型のウサギ抗ラット肝細胞膜抗体を含むイーグルMEM液、または患者あるいは健常人血清を加えて3時間培養した。ついで、前記の単球由来粘着細胞浮遊液(2×10^6 cells/ml) 0.5mlを加えて、2時間培養し、遠心によつて培養上清を分離した。さらに、このようにして分離した培養上清0.5mlを新鮮な肝細胞浮遊液(1×10^6 cells/ml) 0.5mlに添加し、³H-L-ロイシン(比活性52Ci/mmol) 1μCi加えて24時間培養し、その細胞の酸不溶性分画へのとりこみを液体シンチレーションカウンターで測定して、ADMC反応細胞培養上清中の細胞障害活性を検討した。なお、対照としては抗肝細胞膜抗体または患者血清の代りに、正常血清を添加して同様の実験を行ない、対照実験における³H-L-ロイシンのとりこみの平均値を100%として、それぞれの実験例の結果を比較し、ADMCの強度を百分率で表現した。

実験結果

1. ウサギ抗ラット肝細胞膜抗体を用いたADMC実験

健常人末梢血単球由来の粘着細胞をeffector細胞とし、ラット分離肝細胞を標的細胞として、ウサギを免疫して得たIgG型の抗ラット肝細胞膜抗体によるADCC反応による肝細胞障害性を検討した。

その結果はFig 1に示すように、健常人6例の

Fig 1. Effects of monocytes of various kinds of liver diseases on antibody-dependent monocyte-mediated cytotoxic reactions. Cytotoxicity was determined by the decreased uptake of ^3H -L-leucine into cells (AH: acute hepatitis, CAH: chronic active hepatitis, LC: liver cirrhosis).

ADMCの平均は $52.8 \pm 8.8\%$ (2288.4 ± 381.4 cpm)であり、著明な細胞障害が確認された。

2. ADMC反応による肝疾患患者血清中の抗肝細胞膜抗体の検出

慢性活動性肝炎患者5例からそれぞれ血清を採取し、ADMC反応によって血清中に含まれる抗肝細胞膜抗体を検討した。すなわち、標的細胞としてラット分離肝細胞を用い、非働化患者血清を添加して3時間培養した後、慢性活動性肝炎患者の末梢血由来の粘着性細胞をeffector細胞として加え、前記と同様にして肝細胞障害性を検討した。

その結果、Fig 2に示すように、 ^3H -L-ロイシンの酸不溶性分画へのとりこみは、正常血清を用いた対照例(100%, 4334cpm)の $58.8 \pm 18.0\%$ (2548.4 ± 780.1 cpm, $n=5$)であった。すなわち、

Fig 2. Cytotoxicity of the culture supernatant of antibody-dependent monocyte-mediated cytotoxic reaction on isolated hepatocytes. Cytotoxicity was determined by the decreased uptake of ^3H -L-leucine into cells.

慢性活動性肝炎患者血清に抗肝細胞膜抗体が存在することをADMC反応を用いて検出することができた。なお、対照として健常者の末梢血由来の粘着細胞をeffector細胞とし、健常者非働化血清とともに培養した肝細胞を添加しても、 ^3H -L-ロイシンのとりこみは $98.7 \pm 8.7\%$ (4277.7 ± 377.1 cpm, $n=3$)であり、健常者血清中には抗肝細胞膜抗体は認められなかった。

3. 各種肝疾患患者末梢血から分離した粘着性細胞のeffector細胞としての機能

各種肝疾患患者末梢血から単球に由来する粘着性細胞を分離し、これを前もって抗肝細胞膜抗体で処理したラット肝細胞浮遊液に加えてADMCを検討した。

その結果、Fig 1に示すように、急性肝炎、慢性活動性肝炎、肝硬変および肝癌患者の単球分画を用いたADMCは、それぞれ $65.3 \pm 12.8\%$ (2830.1 ± 554.8 cpm), $62.3 \pm 15.2\%$ (2700.1 ± 658.8 cpm), $87.2 \pm 11.8\%$ (3779.2 ± 511.4 cpm) および $100.4 \pm 7.6\%$ (4351.3 ± 329.4 cpm) であり、急性肝炎および慢性活動性肝炎患者の末梢血単球系細胞はADMCのeffector細胞として作用するが、一方肝硬変および肝癌患者の末梢血単球

ではeffector細胞機能は著しく低下しているか、または欠如している状態にあることが示唆された。

考 案

慢性活動性肝炎の発症に肝特異抗原に対する免疫応答が関与する可能性は、本症患者の末梢血リンパ球が肝特異抗原刺激に应答してリンパ球幼若化反応を示し、MIFやLMIFなどのリンホカインを産生することによつて示唆されている^{8)~13)}。また、患者の末梢血中に肝細胞に対して障害的に作用するリンパ球が存在することは、Cochrane¹⁴⁾、およびParonettoら¹⁵⁾によつて報告されており、前者は、これらのリンパ球が非T細胞性のリンパ球であり、その肝細胞障害性が重合IgGによつて抑制されることから、cytotoxicityの発現はADCC反応にもとづくものとしている。また、後者はbiopsyで得られた自己肝細胞に対し末梢血リンパ球が障害的に働くことを認めており、ADCC反応によつて起こる肝細胞障害が自己免疫的な性格を有することを支持している。

これらの実験はいずれもADCC反応によつて誘導される肝障害には、リンパ球系のK細胞がeffector細胞となることを示唆するが、肝特異抗原を被覆した赤血球を標的細胞とした場合、ADCC反応にあずかるeffector細胞はマクロファージであるとの報告もある¹⁶⁾。マクロファージ細胞表面にはFcレセプターが存在するので、単球-マクロファージ系の細胞がリンパ系のK細胞と同様、effector細胞となる可能性は否定できない。

本研究の実験結果によると、慢性活動性肝炎患者の血清中に抗肝細胞膜抗体が証明され、その抗体を介して、単球系のeffector細胞が標的細胞に結合すると、K細胞-標的細胞の場合と同様のcell-mediated cytotoxicityが発現することが示された。しかも、このcell-to-cell contactによる反応は、effector細胞から肝細胞障害因子を分泌することによつても成立する可能性が示唆された。この肝細胞障害は分離肝細胞の蛋白合成抑制を指標として検討しているがtrypan blue exclusion testでviabilityを検討しても同様の結果を得ているの

で、cytotoxicなものと考えられる。

また、本実験においては、標的細胞としてラット分離肝細胞を用いているので、effector細胞としてヒトの単球系の細胞を用いた場合は、種による主要組織適合抗原の差異が問題になると考えられる。しかし、Meyer zum Büschenfeldeらの詳細な研究によると肝特異抗原は臓器特異性が強く、種特異性の問題はin vitroの実験に関する限り、余り問題にならないようである。この問題に関しては、さらに、biopsyによつて得た肝細胞を標的細胞としてautologousな系で検討する予定である。

本研究における重要な知見の一つは、急性肝炎および、慢性活動性肝炎患者由来の単球系細胞がeffector細胞として機能するのに反し、肝硬変および肝癌患者末梢血の単球系細胞がその機能を低下しているか、または欠除している点である。この原因は現時点では明らかではないが、すでに著者らは、lipopolysaccharideによつて活性化される単球系細胞の性質が、肝硬変および肝癌患者の末梢血単球においては、低下または欠除することを認めており¹⁷⁾、今回の結果はそれをうらずけるものと考えられる。しかし、その実態は今後の詳細な検討に待たねばならない。

ま と め

1. 末梢血単球系細胞はADCC反応のeffector細胞として作用することを認めた。
2. 急性肝炎、慢性活動性肝炎患者末梢血単球系細胞はADCC反応のeffector細胞の機能を備えていた。
3. 肝硬変、肝癌患者末梢血単球系細胞は、ADCC反応のeffector細胞の機能は著しく低下していた。

文 献

- 1) Kawanishi H: In vitro studies on IgG-mediated lymphocyte cytotoxicity in chronic active liver disease. *Gastroenterology* 73: 549, 1977.
- 2) Zighelboim J, et al: Evidence for several cell populations active in antibody dependent cellular cytotoxicity. *J Immunol* 111: 1737, 1973.
- 3) Wisloff F, et al: Antibody-dependent cytoto-

- xicity mediated by human Fc-receptor-bearing cells lacking markers for B-and T-lymphocytes. *Int Arch Allergy* 47: 139, 1974.
- 4) 溝口靖紘, 他: 慢性活動性肝炎における肝特異抗原をめぐる免疫学的肝細胞障害の発性機構—特に活性化マクロファージおよびADCC反応を中心に—, *日内会誌* 69: 1609, 1980.
  - 5) 溝口靖紘, 他: 慢性活動性肝炎の免疫性肝障害におけるantibody-dependent macrophage-mediated cytotoxicityの関与について, *肝臓* 20: 79, 1979.
  - 6) 銭谷幹男, 他: 慢性肝疾患における末梢リンパ球中K-cell population—マイクロプレート法による検討—, *肝臓* 19: 1188, 1978.
  - 7) Bellemann P, et al: An improved method for the isolated of hepatocytes from liver slice. Selective removed of trypan blue-dyeable cells. *Analytical Biochem* 81: 408, 1977.
  - 8) Miller J, et al: Cell-mediated immunity to a human liver specific antigen in patients with active hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Lancet* II: 296, 1972.
  - 9) Reed WD, et al: Immunopathology of viral hepatitis in man. *Prog Med Viral* 17: 38, 1974.
  - 10) Meyer zum Büschenfelde KH, et al: Celluläre Immunreaktionen Gegenüber homologen lever-spezifischen Antigen (HLP) bei chronischen Leverentzündungen. *Klin Wschr* 52: 246, 1974.
  - 11) Lee WM, et al: Cell-mediated immunity to hepatitis B surface antigen in blood donors with persistent antigenaemia. *Gut* 16: 416, 1975.
  - 12) 川合弘毅: 肝特異抗原 (Meyer) に対する細胞性免疫, *肝臓* 15: 555, 1974.
  - 13) 川合弘毅: 肝疾患におけるHB抗原および肝特異抗原に対する細胞性免疫の研究, *大阪市医学会雑誌* 24: 611, 1975.
  - 14) Cochrane AM, et al: Antibody-dependent cell-mediated (K-cell) cytotoxicity against isolated hepatocytes in chronic active hepatitis. *Lancet* I: 441, 1976.
  - 15) Paronetto F, et al: Cytotoxicity of lymphocytes against autochthonous and allogeneic liver cells in patients with chronic hepatitis. *Immune reactions in liver diseases*, ed. Eddleston ALWF et al. Pitman Medical Publishing Co. Ltd, England 1979, p21.
  - 16) Vogten AJM, et al: Cell-mediated cytotoxicity in chronic active liver disease: A new system. *Gastroenterology* 74: 883, 1978.
  - 17) 東森俊博, 他: 肝疾患患者末梢単球のlipopolysaccharideに対する応答能について, *日消誌* 79: 1298, 1982.