

## 2) 原 発 性 胆 汁 性 肝 硬 変

—新しい動物モデルによる病態の解析—

新潟大学医学部第三内科学教室 (主任: 朝倉 均教授)

齊藤 忠雄・朝倉 均

Primary Biliary Cirrhosis: Analysis of the Pathogenesis by  
an Animal Model of MHC Class II-disparate GVHR

Tadao SAITOH and Hitoshi ASAKURA

*The Third Department of Internal Medicine, Niigata**University School of Medicine**(Director: Prof. Hitoshi ASAKURA)*

Primary biliary cirrhosis (PBC) is supposed to be a disease entity in which auto-immune mechanisms may be operative, characterized by chronic nonsuppurative destructive cholangitis (CNSDC), cholestasis and epithelioid granuloma formation in its early stage. Thus far, although the pathogenesis of the disease remains largely unknown, there are a number of reports indicating hepatic lesions induced following graft-versus-host reaction (GVHR) in both human and experimental animals after the bone marrow transplantation. Recently, we demonstrated the bile duct lesions resembling CNSDC and the formation of epithelioid granuloma in the (B6x $\mu$ m12) F1 mice with MHC class II-disparate GVHR, postinjection of spleen cells of parental B6 mice via the tail vein. By immunohistochemical examinations, both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were found around the bile duct, and some of them were infiltrating among the bile duct epithelia on which the MHC class II antigen was aberrantly expressed. These findings indicate that MHC class II antigen might play an important role in the destruction of bile duct cells in PBC as well as in MHC class II-disparate GVHR.

---

Key words: PBC, GVHR, MHC class II antigen, animal model

---

Reprint requests to: Tadao SAITOH,  
the Third Department of Internal Medicine,  
Niigata University School of Medicine,  
Niigata 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学医学部第三内科学教室  
齊藤 忠雄

## 1. はじめに

原発性胆汁性肝硬変 primary biliary cirrhosis (PBC) は、自己免疫性肝疾患の1つと考えられており慢性非化膿性破壊性胆管炎 CNSDC と類上皮肉芽腫の形成をその病初期における組織学的特徴とし、またその末期には肝硬変の病像を呈する予後不良の疾患である。一般には、中年以後の女性に好発し、皮膚掻痒感や黄疸で気づかれることが多いが、自覚症状を欠く無症候性 PBC も存在する。一方、血清中の胆道系酵素や総コレステロールの上昇など生化学的検査値の異常や血沈の亢進、IgM の中等度以上の上昇、さらに抗糸粒体抗体 (AMA) が高頻度にみられその診断的価値は高いとされている。病理組織学的には、中等大小葉間胆管ないし隔壁胆管に CNSDC をその病初期に認めるほか、Sjögren 症候群、RA、慢性甲状腺炎などの自己免疫性疾患を合併することがある。本症の診断は、厚生省特定疾患「難治性の肝炎」調査研究班の自己免疫性肝炎分科会で作成された診断基準を基に行われている<sup>1)2)</sup>。即ち、①組織学的に CNSDC を認めるもの、②AMA が陽性で、CNSDC は認めないが PBC に矛盾しない (compatible) 組織像を示すもの、または③AMA が陽性で臨床所見並びに経過から PBC と考えられるもののいずれか1つに該当する場合を PBC と診断している。

以上述べてきたように PBC は病因不明の自己免疫性疾患でありその病因の究明とともに動物モデルの開発が年余にわたって行われてきたが、現在まで十分な成果を示すにはいたっていない。そこで我々は、CNSDC を生じる他の病態、すなわち T 細胞の直接関与する移植細胞対宿主 (GVH) 反応について<sup>3)4)</sup>、その中でもとくに主要組織適合性複合体 (MHC) 遺伝子座のある一部のみ変異を起こしたマウスを用いた、F1 hybrid 病での肝病変を検討した。その結果、GVH 反応の中でも MHC class II 抗原が標的抗原となる系で PBC と非常に類似する病変が見られることをすでに報告しているが<sup>5)</sup>、今回ここでその詳細について紹介する。

## 2. 材料と方法

マウス C57B1/6 (B6) マウス、B6 の MHC の H-2K 遺伝子座の mutant の B6. C-H-2<sup>bm1</sup> (bm1)、I-A 遺伝子座 mutant の B6. C-H-2<sup>bm12</sup> (bm12) マウスとから (B6×bm1) F1、(B6×bm12) F1 および (bm1×bm12) F1 hybrid マウスを作製し B6 脾細胞を静注すると MHC class I, class II, class (I+II)

GVH 反応を生じる。なお、donor および recipient マウスはいずれも性を一致させ H-Y 抗原の影響が無視できる条件下で10~12週令の recipient マウスを用いて細胞移入を行った。

**移入細胞の調整と GVH 反応の惹起** 正常 B6 マウスから摘出した脾をステンレスメッシュでろ過し脾細胞を2% FCS を含有する Eagle MEM-HEPES 培養液中で浮遊させ2回洗浄後、1回 FCS 非含有 MEM-HEPES 培養液で洗浄し、一定の細胞数に調整した。5×10<sup>7</sup> 個の脾細胞を尾静脈より注入した後、第1週めに再度静注し、はじめの移入より2, 4, 6, 8 および10週後に屠殺した。これらの方法で GVH 反応が起こることはすでに報告され<sup>6)</sup>、我々も確認している<sup>5)</sup>。

**組織学的検索** 光顕ならびに電顕的検索のため摘出した肝は以下のごとく処理した。すなわち、光顕標本は10%リン酸緩衝液含有10%ホルマリンで固定したのちパラフィン包埋し、薄切後 H-E 染色する。また、電顕標本は2.5%グルタルアルデヒド固定、さらに2%オスミウムで後固定したのち、段階濃縮エタノールで脱水し、Epon 812 で包埋後、超薄切片を作製し検鏡した。

**免疫組織化学的検索** アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法を用いて浸潤細胞の同定や MHC class II 抗原の胆管上皮での表出について検討した。概説すると、摘出した肝は PLP 固定後または未固定のままドライアイス-アセトン-イソペンタンにて凍結し、-80℃にて冷却、保存した。4~6μm 厚さの凍結切片を作製した後 (未固定切片はアセトン固定後)、PBS にて充分洗浄し、一次抗体としては抗 I-A<sup>b</sup> 抗体、抗 CD8 (Lyt-2) 抗体、抗 CD4 (L3T4) 抗体を、二次抗体としてはヒツジ抗ラット Ig-ビオチン化抗体を用いて反応させ、さらにストレプトアビジン-HRP 添加後、0.05% DAB および0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有 0.05M トリス緩衝液 (pH 7.6) にて発色、流水停止してヘマトキシリン染色液で核染した。なお、各反応段階いずれも PBS で充分洗浄後実験に供している。

## 3. 結果

**光顕的検索** MHC class II GVH 反応でとくに CNSDC と門脈域または中心静脈周囲に類上皮肉芽腫を認め (Fig. 1A, HE, ×200)、さらに、中等度以上の炎症性細胞浸潤を観察したが、浸潤細胞の多くはリンパ球であり形質細胞や好酸球も含まれていた (Fig. 1B, HE, ×100)。また、PBC の組織学的特徴の1つに胆管の消失することが報告されているが<sup>7)</sup>、それらの所見は見られなかつ

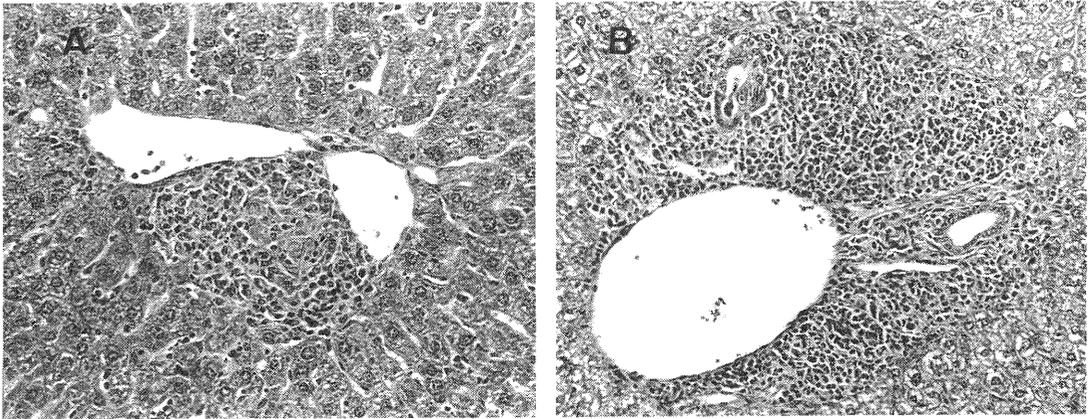


Fig. 1

- A : Epithelioid granuloma formation around the central vein of liver of (B6 xbm12) F1 mice at 6 weeks (HE, X 200).
- B : Infiltration of inflammatory cells consisting of lymphocytes, plasma cells, and eosinophils at bile ducts and in the portal area of (B6 xbm12) F1 mice at 8 weeks (HE, X 100).

Table 1 Degree of the hepatic infiltrating lymphocyte-subpopulations

Recipients	Area	Weeks	Phenotype*			
			Ia <sup>+</sup>	Lyt-2 <sup>+</sup>	L3T4 <sup>+</sup>	sIgM <sup>+</sup>
(B6 × bm12) F1	Portal	2	##	+	##	±
		4	##	+	+	±
		8	##	+	+	±
	Bile duct	2		##	##	-
		4		##	±	-
		8		##	##	-
(bm1 × bm12) F1	Portal	2	##	##	+	±
		4	##	##	##	±
		8	##	+	##	ND
	Bile duct	2		##	+	-
		4		##	+	-
		8		##	+	-

\* Grade - : 0%, ± : ~10%, + : ~20%, ## : ~30%, ### : 30% ~

た。

胆管上皮における MHC class II 抗原の表出 胆管上皮では、その lateral surface を中心に MHC class II 抗原が検出され PBC での胆管上皮と一致していた<sup>8)</sup>。

浸潤細胞の同定 細胞浸潤の見られる門脈域では、I-A 抗原陽性細胞がそのほとんどを占め、また、CD4<sup>+</sup> 細胞と CD8<sup>+</sup> 細胞は同程度に浸潤していた。胆管上皮

への侵入細胞については、CD8<sup>+</sup> 細胞が CD4<sup>+</sup> 細胞より多く侵入する傾向にあった (Table 1)。

#### 4. 考 察

予後不良の自己免疫性肝疾患と考えられる PBC の初期病像が、F1 hybrid を用いた MHC class II 抗原の異なる class II GVH 反応でみられることを示した。

PBC の病因論としては主に、感染によるもの、免疫複合体によるもの<sup>9)</sup>、抗ミトコンドリア抗体によるもの、そして慢性 GVH 反応によるもの<sup>10)</sup>とする考え方が報告されているが、障害胆管上に MHC class II 抗原が aberrant に表出されることや、浸潤細胞のほとんどが T 細胞であることなどから class II 抗原そのものが標的抗原となる可能性が高い。しかし、class II GVH 反応で PBC の初期病変に類似した像が得られることや、また、免疫組織化学的手法を用いて浸潤細胞を調べてみても、リンパ球サブセットの分布が PBC とよく類似することなどから慢性 GVH 反応と同様のメカニズムによる可能性が高い。骨髄移植後の、副組織適合抗原 (mHA) の異なるマウス GVH 反応でも CNSDC はみられるものの、類上皮肉芽腫の形成や自己抗体は出現せず、PBC モデルとは考えにくい。したがって、MHC class II 抗原を標的抗原とした GVH 反応は、少なくとも組織学的には、PBC の初期病変のモデルとなりうると思われる。ただし、現在までのところモルモット凍結切片を用いた蛍光抗体法では、抗核抗体や抗平滑筋抗体はみられるものの、PBC の診断上特に信頼度の高い抗ミトコンドリア抗体は検出されておらず、今後、AMA の対応抗原の 1 つと考えられるピルビン酸脱水素酵素 (PDH) を用いた ELISA 法などによる検討が必要と思われる。

## 5. おわりに

今回、動物モデル作製にあたり終始ご指導ご鞭撻を賜り、また発表の機会を戴きました医動物免疫学教室、藤原道夫教授に深甚な感謝の意を捧げます。また、免疫組織学的手法をはじめとする実験操作法等についてご指導下さいました松本陽講師、渡部久実助手ならびにご協力下さいました五十嵐美徳先生、富田善彦先生、河井一浩先生、伊藤聡先生に謝意を表します。さらに、病理組織学的検索ならびに臨床例についてご指導下さいました野本実助手、医療技術短大教授石原清先生に深謝致します。

## 参 考 文 献

- 1) 市田文弘：原発性胆汁性肝硬変とその周辺。日消会誌, 72: 1428, 1975.
- 2) 佐々木博, 他：原発性胆汁性肝硬変の全国統計。肝胆膵, 4: 171, 1983.
- 3) Sloane, J.P., et al.: Histopathological changes in the liver after allogeneic bone marrow transplantation. J. Clin. Pathol, 33: 334, 1980.
- 4) Snover, D.C., et al.: Hepatic graft versus host disease: A study of the predictive value of liver biopsy in diagnosis. Hepatology, 4: 123, 1984.
- 5) Saitoh, T., et al.: Hepatic lesions induced by graft-versus-host reaction across MHC class II antigens: An implication for animal model of primary biliary cirrhosis. Clin. Immunol. Immunopathol, 49: 166, 1988.
- 6) Rolink, A.G., et al.: Allosuppressor and allohelper-T cells in acute and chronic graft versus host disease. II. Flrecipients carrying mutations at H-2K and/or I-A. J. Exp. Med, 157: 755, 1983.
- 7) Nakanuma, Y., et al.: Histometric and serial section observations of the intra hepatic bile ducts in primary biliary cirrhosis. Gastrolenterology, 76: 1326, 1979.
- 8) Colucci, G., et al.: In situ characterization of the cell surface antigens of mononuclear cell infiltrate and bile duct epithelium in primary biliary cirrhosis. Clin. Immunol. Immunopathol, 41: 35, 1986.
- 9) Thomas, H.C., et al.: Is primary biliary cirrhosis an immune complex disease? Lancet, 2: 1261, 1977.
- 10) Epstein, O., et al.: Primary biliary cirrhosis is a dry gland syndrome with features of chronic graft-versus-host disease. Lancet, 1: 1166, 1980.

司会 最初に臨床例をずっと挙げられて、臨床でみられる PBC の病因論として GVH 反応が考えられており、それを考慮して実験してみたところ、非常に類似した病変ができた、という所まで来ている訳です。何かありませんでしょうか…。

野本 第三内科の野本です。標本を何枚か見せてもらって大変きれいな仕事だったと思うのですが、初期病変としては非常にいいと思う。これを PBC のモデル動物とした場合ですけど、本当に胆管がああいう変化で消失して行ってしまう後の変化というのは引続いて起こって来るとは思うのですが。もう少し長期にやった場合どうだったかという事をお伺いしたい。それと、最初に実験の途中で2週間ぐらいから脾臓が大きくなったということですが、その原因といえますか、どうして大きくなったかということをお伺いします。

齋藤 一番最初の質問から答えたいと思いますが、GVH反応、一般に proliferative な GVH 反応が起こる場合には、splenomegaly、これは古典的に Simonsen の assay と呼ばれ、いわゆる GVH 反応そのものの指標としているのです。我々も細胞が実際増えているかどうか、重さは非常に重くなるのですが細胞数はどうか、ということで確認してみますとある程度は細胞数は増えています。しかし実際肉眼的にあれ程大きな物が見える割には細胞は増えていない。ですが lymphoproliferative な1つの指標になるのではないかと考えております。それといわゆる初期像だけではないかという事ですが、経過を追ってみて長期にはやはり現在24週齢と、その他放っておいたマウスが6ヶ月以上経っておりますが、現在のところ PBC の様な、肝硬変の様な像は呈しておりません。従いまして、あくまでも granuloma と CNSBC とするものの形成機序、破壊機序、そういったメカニズムの1つのモデルと考えております。

司会 よろしいでしょうか。ヒトのモデルを考える時に、確かに野本先生がおっしゃったように初期病変でな

くて全体像が似てくれば非常に理想的なのです。その点で齋藤先生、AMA のことはあまりおっしゃらなかったけれど、AMA も今のところは検出されてないけれど、ずっと後になれば恐らく出てくるのではないのでしょうか。

齋藤 実は他のグループで、外国のグループなのですが、AMA が陽性であったという、…GVH を追いかけてまして、それで出たという……報告があります。ただ我々 IF で検討いたしております。切片はホルモットの凍結切片を用いているのですが、それで検出すると非常に難しい。で今回 pyruvate dehydrogenase がどうも AMA の対応抗原ではないかということで、現在 ELISA で検討中であります。

司会 それではこれから解析が進んでいくと思いますので、どうも有難うございました。時間の都合で次に移らせて頂きます。次は3番目の演題、自己免疫性心筋炎—新しい動物モデルの確立—第一内科、小玉先生お願いいたします。

### 3) 自己免疫性心筋炎：新しい動物モデルの確立

新潟大学医学部内科学第一教室 小玉 誠・和泉 徹  
柴田 昭  
同 医動物学教室 松本 陽・藤原 道夫

#### A Novel Experimental Model of Autoimmune Myocarditis

Makoto KODAMA<sup>\*,\*\*</sup>, Tohru IZUMI<sup>\*</sup>, Akira SHIBATA<sup>\*</sup>,  
Yoh MATUMOTO<sup>\*\*</sup> and Michio FUJIWARA<sup>\*\*</sup>

*First Department of Internal Medicine\* and Department of  
Immunology\*\*, Niigata University School of  
Medicine, Niigata, Japan*

Acute myocarditis has been suspected that its pathogenesis may be related to autoimmunity in part. Some of the experimental myocarditis by coxsackievirus B-3 were revealed that postinfection autoimmunity was an important mechanism of the diseases.

Reprint requests to: Makoto KODAMA,  
First Department of Internal Medicine,  
Niigata University School of Medicine,  
Niigata, 951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通り1番町754番地  
新潟大学医学部内科学第一教室 小玉 誠