慢性肝疾患における末梢リンパ球の in vitro 免疫グロブリン産生能に関する研究

新潟大学医学部第三内科学教室（主任：市田文弘教授）
太　田　宏　信

In vitro synthesis of Immunoglobulin by peripheral blood lymphocytes in chronic liver disease.

Hironobu OHTA

The 3rd Department of Internal medicine, Niigata University School of Medicine.
(Director: Prof, Fumihiro Ichida)

Elevated serum immunoglobulin(Ig) levels are frequently observed in patients with chronic liver diseases. Ig synthesis by peripheral blood lymphocyte in vitro was measured in 38 patients with chronic hepatitis (CH), liver cirrhosis (LC) and primary biliary cirrhosis (PBC), using ELISA methods. Spontaneous Ig Synthesis was enhanced in patients with LC and PBC. PWM-induced and SAC-induced IgM production in these patients were decreased, in comparison with healthy controls and patients with CH. These results indicate that B cells were activated *in vivo* and the dysfunction of T cell existed in patients with LC and PBC.

Key words: Immunoglobulin synthesis Chronic liver diseases.
免疫グロブリン産生能，慢性肝疾患．

要　　旨

慢性肝疾患でみられる高免疫グロブリン血症の成立機序を解析する目的で慢性肝炎10例，肝硬変17例，原発性胆汁性肝硬変（PBC）11例，計38例の患者について末梢リンパ球免疫グロブリン産生能を ELISA サンドイッチ法を用いて検討した．Mitogen 非添加時には肝硬変群，PBC 群で免疫グロブリン産生量は高値を示す傾向にあり，これらの疾患での流血中における活性化 B cell の増加が示唆された．一方，PWM 添加による IgM 産生の増幅は健常者および慢性肝炎群に比し肝硬変群，PBC 群で低下しており，SAC 添加時にその傾向はより顕著であった．以上より，これら疾患群における IgM 産生量の異常は主としてT細胞の機能異常に起因すると考えた．

は　じ　め　に

慢性肝疾患患者にみられる高免疫グロブリン血症の成因は複雑であり，固体の有する免疫学的異常も大きく関与しているものと想定される．抗原刺激を受けた B cell

Reprint requests to: The 3rd Department of Internal medicine, Niigata University School of Medicine. Niigata, City, 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
太田宏信

は増殖・分化し，最終的に免疫グロブリンを産生するが，多くの場合 T cell や macrophage もこの反応に関与している．この一連の過程を in vitro で再現し，B cell の免疫グロブリン産生能を知る方法として抗原に替わり mitogen を用いる実験系が繁用されている．すなわち pokeweed mitogen（PWM）や staphylococcus aureus cowan 1 株（SAC）をリンパ球に添加し，その培養上清中の免疫グロブリンを定量する assay 系である．

本研究では慢性肝疾患でみられる免疫グロブリン異常の成立機序を知る手掛かりとしてこれらの mitogen を使用し，末梢血リンパ球免疫グロブリン産生能について検討した．

対　　象（表1）

血清学的所見並びに組織像から確診した原発性胆汁性肝硬変（primary biliary cirrhosis：PBC）11例（Sheuer 病期分類Ⅰ期8例，Ⅲ期3例），慢性肝炎（CH）10例（非活動性5例，活動性5例），肝硬変（LC）17例（ウィルス性11例，アルコール性6例）の計38例を対象とした．また正常対照として健常者（N）22名についても同様の検索を行った．

方　　法

1）リンパ球培養

比重遠心法により末梢血から単核球を分離し，4回の洗浄後10％ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 液中に濃度 7.5×10^5 個/ml の浮遊液を作製した．かかるリンパ球浮遊液を 24 wells マルチプレート（Dynatech 社）の各 well に 1 ml ずつ分注し，7日間培養した．PWM（GIBCO 社）および SAC（和光社）の各々を終濃度 0.4 μg/ml，0.008％で添加したリンパ球浮遊液についても同様に7日間培養を行った．

2）培養上清中免疫グロブリンの定量

培養上清中の IgG・IgA・IgM を以下の ELISA サンドイッチ法により定量した．96 wells マイクロテストプレート（Dynatech 社）にヒツジ抗ヒト IgG・IgA・IgM（Cappel 社）の各々を coating した後（室温，3時間），1％ウシ血清アルブミンにて postcoating した（4℃，over night）．かかるプレートに対して被験上清および標準液を2時間反応後洗浄し，solid phase の各抗体に対応する peroxidase 標識ヒツジ抗ヒト IgG・IgA・IgM（Cappel 社）を加え，1時間 incubate した．その後に基質液 ABTS を加えて発色，30分後 NaN_3 で酵素反応を停止させ，波長 414nm の吸光度を測定した．標準液の吸光度より最小二乗法を用いて logistic 曲線を描き，その曲線より被験試料の IgG・IgA・IgM の濃度を算出した．なおこの測定に関して免疫グロブリン各クラス相互間の交差反応はなかった．

成　　績

1）血清免疫グロブリン値（図1）

被験例全例の血清免疫グロブリンを免疫拡散法にて測定した結果，各クラス共にN群に比し肝疾患群において高値であった．特に CH 群，LC 群では IgG が，また PBC 群では IgM が各々N群に比し有意の上昇を認めた（$P<0.01$）．

2）培養上清中免疫グロブリン濃度の経時的変化（図2）

この assay 系におけるリンパ球の至適培養期間を決定するため健常者4名について培養後0日～8日まで経時的に培養上清中免疫グロブリンを定量した．各クラス免疫グロブリン共に1日目より検出可能となり，以後漸増した．リンパ球生存率との関係も考えあわせ，免疫グロブリンの定量は全て培養7日目の培養上清に対して行った．

3）Mitogen 非添加時培養上清免疫グロブリン濃度（図3～5，表2）

IgG 産生量は LC 群において最も高く PBC 群がこれに次いだが，いずれもN群との間に有意差はなかった．IgA・IgM に関しても肝疾患群が総じて高値を示す傾向があったが，N群との間に有意差を認めなかった．

表1 対象症例の概要（mean ± SD）　　n.d：not done

Diagnosis	No of patients (cases)	Age (y.o)	Sex (M：F)	Serum protein (g/dℓ) T.P	alb	γ-gl
Chr hepatitis	10	43.7±12.2	9：1	7.6±0.6	4.4±0.4	1.5±0.4
Liver cirrhosis	17	59.0± 9.1	10：7	6.9±0.6	3.2±0.7	2.3±0.9
PBC	11	58.4±11.2	4：7	7.6±0.9	3.5±0.8	2.2±0.7
Control	22	33.0± 4.5	20：2	n.d	n.d	n.d

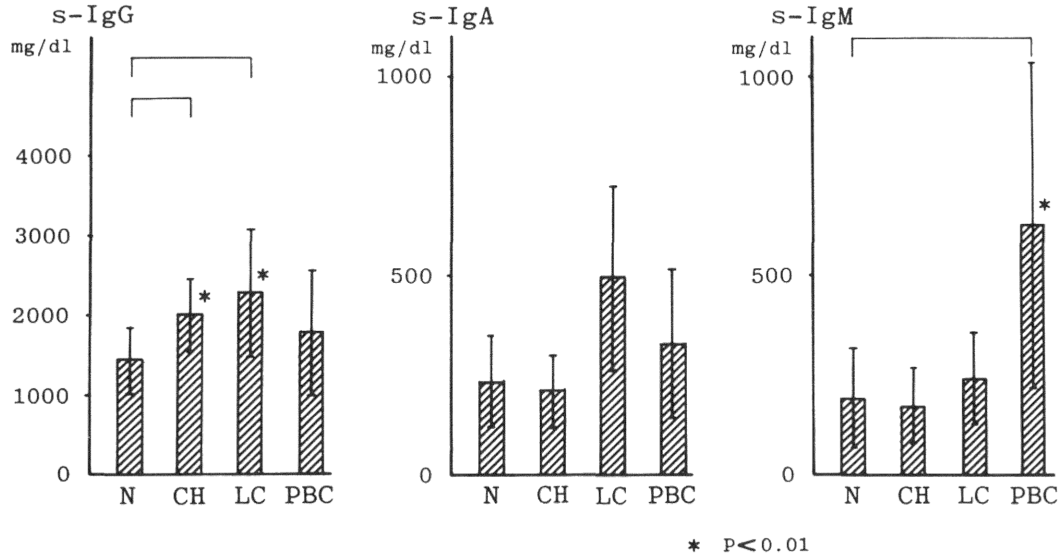
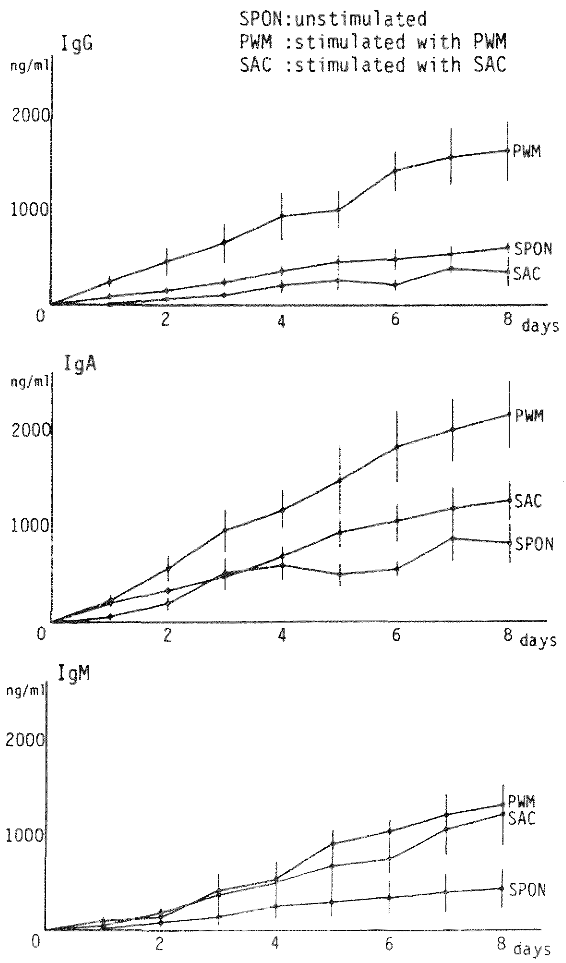


図 1 各疾患群における血清免疫グロブリン濃度（mean ± SD）



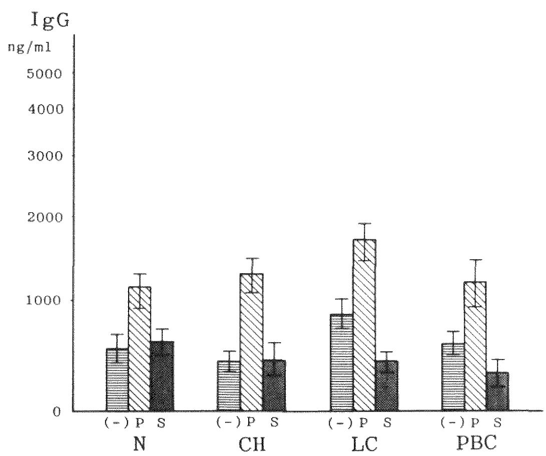


図 3 培養上清中の IgG 濃度（mean ± SD）
(−): unstimulated
P : stimulated with PWM
S : stimulated with SAC

図 2 培養上清中免疫グロブリン濃度の経時的変化 (n = 4)

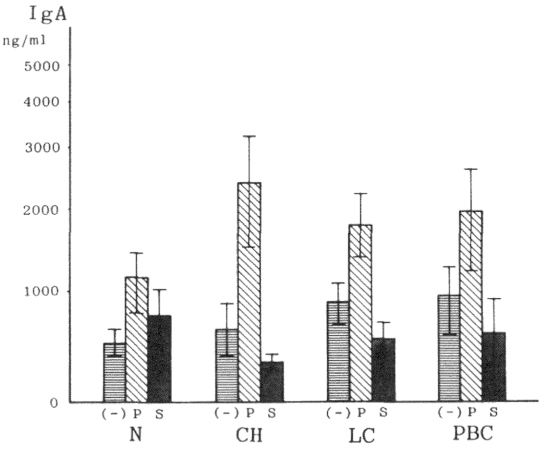


図 4　培養上清中の IgA 濃度（mean±SE）

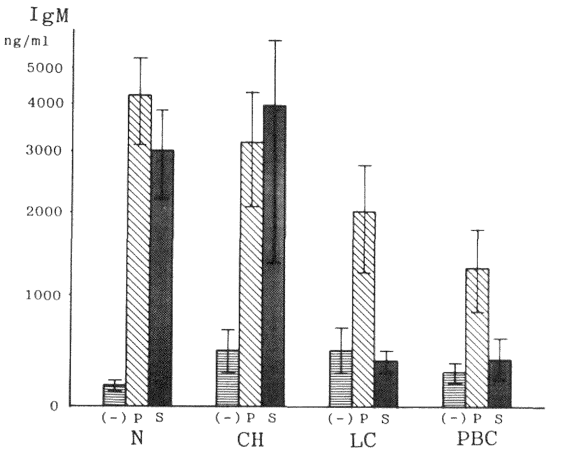


図 5　培養上清中の IgM 濃度（mean±SE）

表 2　培養上清中の免疫グロブリン濃度　(ng／mℓ)

		normal n=22	chr hepatitis n=10	liver cirrhosis n=17	PBC n=11
without mitogen					
	IgG	567±126	453±85	887±131	610±102
	IgA	538±117	656±235	889±184	957±341
	IgM	171±35	506±192	506±196	310±74
cultured with PWM					
	IgG	1122±193	1336±250	1724±196	1218±273
	IgA	1173±292	2385±82	1796±372	1951±699
	IgM	4247±1108	3118±105	2010±710	1329±461
cultured with SAC					
	IgG	621±116	465±143	452±87	341±126
	IgA	781±246	363±73	568±143	627±303
	IgM	2999±883	3747±2322	412±92	432±182

(mean±SE)

4)　PWM 添加時培養上清免疫グロブリン濃度（図 3 ～5，表 2）

Mitogen 非添加時に比較して，各クラス免疫グロブリンは何れの群においても増加していたが，この傾向は IgM において最も顕著であった．群間比較では IgG と IgA はN群で最も低値であったのに対して，IgM についてはN群が最高値を，PBC 群が最低値を示し，両群間に有意差を認めた（$P<0.01$）．これらの成績を PWM 添加時／非添加時の比でみると，IgM のみが特異の pattern を示し，LC 群と PBC 群，N群と CH 群とが各々ほぼ同値で，前 2 者と後 2 者との間には有意差を認めた（図 6）．

5)　SAC 添加時培養上清免疫グロブリン濃度（図 3～5，表 2）

IgG・IgA に関しては何れの群においても非添加時と同程度で増幅はなかった．IgM については PWM 添加時と同様に LC 群・PBC 群で低く，N群・CH 群で高値であった．この関係は非添加時に対する比でみると更に明確であった（図 7）．

6)　血清免疫グロブリン値との関係（図 8）

N群をも含め全例を対象として血清免疫グロブリン値と培養上清中免疫グロブリン量との関係をみると，mit-

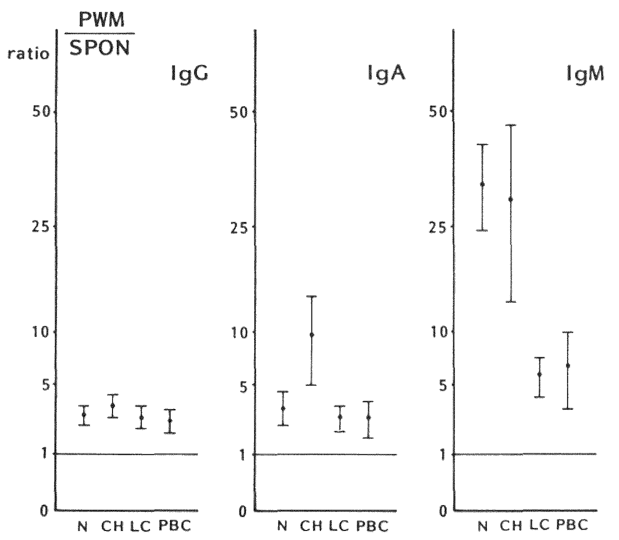


図 6 Mitogen 非添加時に対する PWM 添加時の培養上清中免疫グロブリン濃度の比（mean±SE）

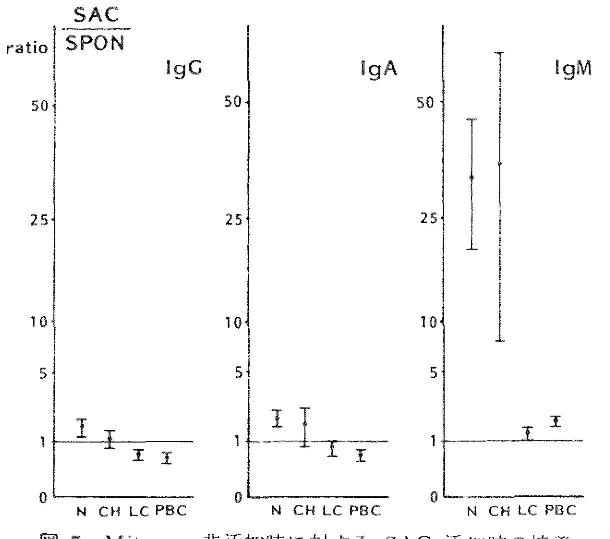


図 7 Mitogen 非添加時に対する SAC 添加時の培養上清中免疫グロブリン濃度の比（mean±SE）

ogen 非添加時および PWM 添加時の IgG において両者の間に弱い正の相関がみられた．しかし，IgA や IgM においては mitogen の有無やその種類を問わずこの様な関係はみられなかった．また両者の関係を個々の群別でみた場合にもいずれのクラスの免疫グロブリンとも全ての群において一定の関係は認めえなかった．

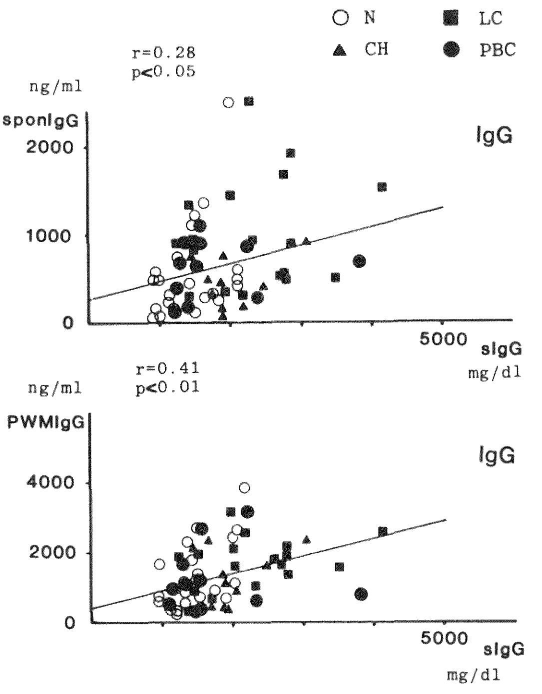


図 8 血清免疫グロブリン濃度と培養上清中免疫グロブリン濃度の関係

考 察

一般に慢性肝疾患患者にみられる血清免疫グロブリン値の上昇は肝網内系細胞の数量的ならびに機能的異常や，portal-systemic shunt の結果と考えられている[1)2)]．すなわち腸管由来の外来抗原が肝臓での処理を免れ，全身循環系からさらに抗体産生組織へと達し，これが高免疫グロブリン血症を招来するという考えである．しかし，自己免疫性肝疾患であるルポイド肝炎や PBC においては病初期よりかかる高免疫グロブリン血症がみられることから，この様な機序だけでは説明しがたく，背景にある免疫学的異常も関与していると推定される．本研究においては各種慢性肝疾患における末梢血リンパ球の mitogen 非刺激時および刺激時の免疫グロブリン産生能を検討し，これらと血清免疫グロブリン値との関係を検討した．

In vitro での免疫グロブリン産生能の assay 系においては一般にリンパ球を T cells・B cells に分画後両者を一定比に調整し，培養上清中の免疫グロブリンを定量する方法や[3)]，あるいは未分画のリンパ球を用いる方法[4)] が施行されている．多くの肝疾患患者において末

梢血 T cells・B cells の subpopulation に異常がないこと[5]を考えあわせ，本研究においては未分画の単核球を使用した．

Mitogen 非添加時の免疫グロブリン産生量は，in vivo での B cell activation の程度を反映するものと考えられるが[6]，IgG・IgA・IgM ともに LC 群，PBC 群で高値を示す傾向にあり，これらの疾患群での流血中における活性化 B cell の増加が示唆された．

PWM は T cell 存在下で B cell を増殖ならびに分化させる mitogen であるが[7]，PWM 添加時の IgG・IgA 産生に関しては健常群に比し肝疾患群で高値を示す傾向が見られた．しかし IgM 産生に関してはN群・CH 群に比し LC 群・PBC 群で有意に低下していた．

一方 SAC は PWM と異なり T cell 非依存性に B cell を増殖させるが，それに続く抗体産生細胞への分化誘導には T cell が必要と考えられている[8]．また産生される免疫グロブリンのクラスも PWM に比し SAC は比較的特異的に IgM 産生を誘導するといわれている[9]．本研究では SAC に対する IgG・IgA 産生の増幅は何れの群においてもみられず，IgM 産生反応はN群・CH 群でみられたものの LC 群・PBC 群では欠損していた．これら疾患群における IgM 産生の障害は B cell 自身よりむしろそれを調節する T cell の機能異常に起因するものと考えた．それは mitogen 非添加時の IgM 産生が保持されていること，PWM はもとより SAC 添加による IgM 産生の誘導にも最終段階では T cell 依存性であることからである．

各種肝疾患に関する mitogen 非添加時，PWM や SAC 添加時の各々の免疫グロブリン産生に関しては現在までに数多くの研究が報告されているが，必ずしも一定の見解は得られていない．肝疾患群において PWM に対する反応が亢進しているとする報告や[10]，本研究と同様逆に低下している報告[6]もある．その理由については明らかではないが，対象症例の相違や，添加する mitogen の量，ロット差等もその一因と推測される．

PBC における高 IgM 血症の存在は従来より指摘されているが，今回の研究からこれを説明するに足る成績は得られなかった．また PWM 添加時および非添加時の IgG において血清 IgG 値との間に弱い相関がみられたが，他は何れの組み合わせにおいても一定の関係はなかった．高免疫グロブリン血症を示す症例に in vitro での免疫グロブリン産生能低下を示す例も少からずみられた．これらの例においては shunt や Kupffer cell の機能低下により抗体産生細胞は量的に増加し，これが質的異常を凌駕することや，後天性免疫不全症にみられる様な非特異的抗体の増加が高免疫グロブリン血症を招来するものと想定した．

結　　語

慢性肝疾患患者における末梢血リンパ球免疫グロブリン産生能について検討し，以下の成績を得た．

1) Mitogen 非添加では IgG，IgA，IgM 産生とも肝硬変群，PBC 群で高値を示す傾向にあった．

2) PWM 添加により慢性肝疾患群では IgG，IgA 産生が健常人に比し高値を示す傾向がみられた．しかし IgM 産生は健常人，慢性肝炎群に比し肝硬変群，PBC 群で有意に低下していた．

3) SAC 添加による IgG，IgA 産生の増加は各群ともみられなかった．IgM 産生の増強は健常人，慢性肝炎群のみでみられ，肝硬変群 PBC 群では認められなかった．

4) 血清免疫グロブリン値と末梢血リンパ球免疫グロブリン産生能の間には mitogen 非添加および PWM 添加時の IgG 産生において弱い正の相関を認めた．

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜った新潟大学第三内科，市田文弘教授に深甚なる謝意を捧げると共に，直接御指導戴いた新潟大学医療短期大学，石原清教授および御協力戴いた免疫グループの諸兄に深謝いたします．

なお本文の要旨は第22回日本肝臓学会総会において発表した．

参 考 文 献

1) **平山千里，周防武昭:** 肝疾患と免疫グロブリン．最新医学，**32**: 693～699, 1977.

2) **Stobo, J.D.:** Cirrhosis and hypergammaglobulinaemia. Dig Dis Sci, **24**: 737～740, 1979.

3) **村口　篤，岸本忠三:** Helper, suppressor 活性の測定．新リンパ球機能検査法．矢田純一・藤原道夫編，中外医学社，東京，pp. 156～168, 1987.

4) **榎本博光，伊藤喜久，河合　忠:** リンパ球による抗体産生能検査―培養上清中免疫グロブリンの測定．細胞性免疫機能検査のすべて，Medical Technology 編，医歯薬出版 KK，東京，pp. 182～188, 1985.

5) **石原　清，山舗昌由，吉田俊明，他:** 原発性胆汁性

肝硬変患者における suppressor T cell の動向と臨床像との関係．原発性胆汁性肝硬変，島田宣浩，粕川禮司編集，日本医学館，東京，pp. 27～32, 1985.

6) **Holdstock, G., Ershler, W.B. and Krawitt E.L.:** Demonstration of non-specific B-cell stimulation in patients with cirrhosis. Gut; **23**: 724～728, 1982.

7) **Fauci, A.S., Pratt, K.R.:** Activation of human lymphocytes. I. Direct plaque-forming cell assay for the measurement of polyclonal activation and antigentic stimulation of human B cells. J. Exp. Med. **114**: 674～684, 1976.

8) **Saiki, O, peter, R.:** INDUCTION I. Synergistic Effect of B cell Mitogen Cowan I Plus T cell Mitogen or Factors. J. Immunol. **127**: 1044～1047, 1981.

9) **Pryjma, J., Munoz, J., Virella, G., et al:** Evaluation of IgM, IgG. IgA, IgD, and IgE secretion by human peripheral blood lymphocytes in cultures stimulated with pokeweed mitogen and Staphylococcus aureus Cowan I. Cell. Immunol. **50**: 115～124, 1980.

10) **Nouri-aria, K.T., Hegarty, J.E., et al.:** In vitro studies on the mechanism of increased serum IgM lebels in Primary biliary cirrhosis. Clin Exp Immunol. **61**: 297～304, 1985.

〔特別掲載〕　（昭和63年1月20日受付）