

せんでした。症例が少ないのではっきりとは言えませんが、おそらく蛋白尿による影響ではないと考えられます。膜性腎症の場合、上皮下に deposit がありますが、この中に含まれている membrane attack complex による上皮細胞障害がこの疾患における蛋白尿の原因とも考えられており、このような障害によって、H-4 対応抗原の減少が生じる可能性あるいは、そこにある deposit によって mask される可能性等が考えられます。H-4 は種々の腎疾患における蛋白尿の成因を明らかにするのに有用と考えられます。またもう一つの H-13 の方ですが、膜異腎症で、polyclonal 抗フィブロネクチン抗体の染色パターンと異った染色パターンを H-13 が示す症例がありました。これは cell binding domain が欠如したフィブロネクチンがそこにあると言うよりも、むしろ立体構造の違いによって対応抗原が検出できなくなった可能性が考えられます。種々の細胞間物質に対する polyclonal および monoclonal 抗体、あるいは糸球体細胞に対する monoclonal 抗体を作製し、腎疾患における糸球体細胞の変化および細胞間物質の分布や存在様式の変化を分析する事で、腎炎の発症進展の機序がかなり明らかにされると考えられます。

司会 荒川先生どうぞ。

荒川 第二内科の荒川です。只今話しになられたように H-13 はメサンギウム基質の構成成分の一つであるフィブロネクチンに対する抗体であることがわかりました。同じように、メサンギウム基質のなかのヘパランサルフェートや他の物質、あるいはメサンギウム細胞の膜成分や細胞質物質などに対する抗体が、三つ四つ得られれば、メサンギウム増殖異腎炎におけるメサンギウム反応をより明らかにすることが出来ますし、更に腎炎の発症のメカニズムに迫ることが出来るのではないかと期待をもちています。現在までのところ、メサンギウム細胞の膜成分に対する抗原の方はなかなかできないので苦労しています。

司会 そうしますと、たとえば、その発症の stage です。staging されるというのも当然出てくる可能性はあるわけですね。

荒川 もし、メサンギウム細胞の膜抗原に対する抗体と、いくつかの基質に対する抗体ができれば、かなり clear に発症、および進展の機序がわかるのではないかと期待しています。

司会 他にございませんか。それでは、どうも有難うございました。第三席に移ります。第三席は肝疾患への応用ということで、第三内科の山舗先生、お願いいたします。

3) 肝疾患への応用

原発性胆汁性肝硬変における単クローン抗体を用いた
末梢血 T cell subsets の解析

新潟大学第3内科 山舗 昌由・市田 文弘

単クローン抗体はその高い抗原特異性から細胞膜抗原の解析にも応用され、特にリンパ球においては T 細胞の分化、亜群による抗原性の相違が、OKT シリーズとして知られる単クローン抗体により明らかにされて来た。

ここでは、自己免疫性肝疾患の一つに数えられ、多彩な臨床像を呈する原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の末梢血リンパ球 T cell subsets について、臨床像と対比させて検討したのでその概要を述べる。

対象と方法

対象は組織学的に確診した PBC 26例で、臨床的に無症候性の群 (As 群) 12例、黄疸を認めず皮膚掻痒感

のみを訴える群 (Pr 群) 6例、顕性黄疸を認める群 (Ja 群) 8例の3群に分類した。なお健常者 (N) 28名を正常対照、他の慢性肝疾患 (CLD) 30例を疾患対照とした。

方法は末梢血より比重遠心法にてリンパ球を分離し、3回の洗浄後 5×10^6 /ml 濃度に調整、その 200 μ l に Ortho 社の単クローン抗体 OKT 3 (全 T cell), OKT 4 (helper/inducer T cell), OKT 8 (suppressor/cytotoxic T cell) を各々に 2 μ l 加え、4 $^{\circ}$ C, 30分間反応させ、2回洗浄、ついで FITC 標識抗マウス・グロブリン (ヤギ) を加え、同様操作を繰り返した後、蛍光顕微鏡下で蛍光陽性細胞を算定した。

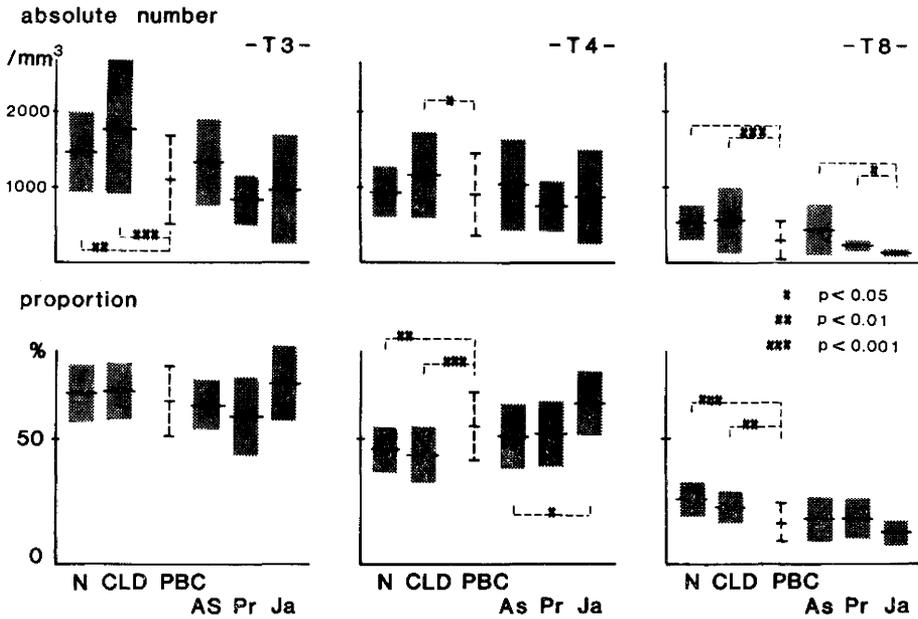


図1 末梢血リンパ球 T cell subsets

成績

OKT 3 の百分率および絶対数の比較では (図1) N 68.9±11.7%, 1447±584/mm³, CLD 69.3±11.7, 1782±915, PBC 65.0±14.0, 1101±623, そのうち As 群 63.4±10.9, 1350±622, Pr 群 593±16.5, 831±358, Ja 群 71.8±15.2, 963±710 で, PBC の絶対数は N, CLD に比し有意に減少していた (p<0.01, p<0.001).

OKT 4 の検討では, N 45.9±9.3%, 943±344/mm³, CLD 43.4±11.6, 1171±574, PBC 55.3±14.3, 913±555, そのうち As 群 50.9±13.3, 1030±599, Pr 群 52.2±13.2, 745±348, Ja 群 64.1±13.9, 880±641 で PBC は N, CLD に比し百分率が有意に増加し (p<0.01, p<0.001), 絶対数では CLD に比し有意に減少していた (p<0.05). また Ja 群は As 群に比し百分率が有意に増加していた (p<0.05).

OKT 8 においては, N 25.6±7.5%, 530±238/mm³, CLD 22.7±6.8, 573±463, PBC 16.6±8.3, 293±282, そのうち As 群 18.4±9.5, 442±374, Pr 群 18.4±8.1, 227±72, Ja 群 12.7±5.5, 137±53 で, PBC は N, CLD に比し百分率 (p<0.001, p<0.01), 絶対数 (ともに p<0.001) の両者とも有意に減少し, さらに Ja 群は As, Pr 群に比し絶対数が有意に減少していた (p<0.05).

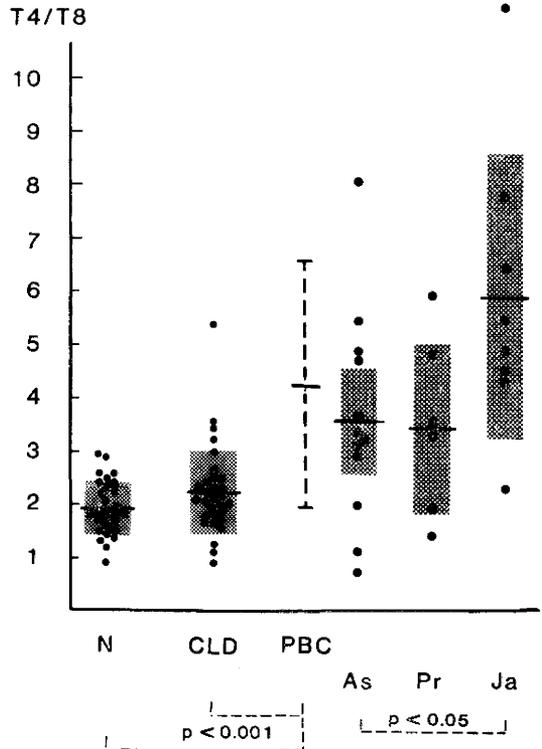


図2 末梢血リンパ球 T4/T8 比

次に T4/T8 比, すなわち suppressor T cell に対する helper T cell の比を検索すると, N 1.93±0.51, CLD 2.24±0.84, PBC 4.23±2.37 で PBC は両対照に比し有意に高値であり ($p < 0.001$), さらに As 群 3.54±1.99, Pr 群 3.44±1.70, Ja 群 5.83±2.73 と Ja 群は As 群に比し有意に高値であった ($p < 0.05$, 図2).

考 按

PBC は臨床的には幅広い病像スペクトルを有する慢性疾患である。一般に皮膚掻痒感または黄疸の有無により症候性 PBC と無症候性 PBC とに臨床分類されている。症候性 PBC は皮膚掻痒感をもって発症し, 続いて黄疸が出現して進行性の経過をとるが, 長期間皮膚掻痒感のみで経過する例も少なくない。黄疸出現例の予後は一般に悪く, 経過中慢性胆汁うっ滞に基づく黄色腫や骨障害など多彩な臨床症状を呈し, 発症後 5~10 年の経過で食道静脈瘤破裂や肝不全により死の転帰をとる¹⁾。他方, 無症候性 PBC は偶然の機会に胆道系酵素の高値により発見される例が多く, 最近の血清学的診断法の普及と本疾患に対する認識の高まりによりその症例数は増加している。そして従来は無症候性 PBC は症候性の前段階と認知されてきたが, 最近では長期間観察しても症候性 PBC へとは進展せず, 良好な経過をとる症例の多いことが知られるようになった²⁾。

PBC の成因および進展機序に関する研究は多方面よりなされ, そのうち注目される仮説としては次のような報告がある。すなわち, (1) 糸粒体内膜抗原と交叉反応を示すある種の微生物感染症³⁾, (2) 胆汁または胆管由来の抗原と門脈血中抗体あるいは浸潤形質細胞の産生抗体とで免疫複合体が形成され, 補体系を活性化し胆管破壊や肉芽腫形成をもたらすとする免疫複合体病説⁴⁾, (3) 胆汁中の蛋白成分に対する DTH effector T cell による胆管障害説⁵⁾, (4) 慢性 GVH 病と共通の基盤をもつ cytotoxic T cell 誘導説⁶⁾, (5) suppressor T cell の機能低下による免疫調節機構異常説⁷⁾, 以上の5つの仮説が代表的であるが, いずれも立証までには至っていない。

しかし著者らの臨床的, 組織学的, 免疫学的検討^{8) 9) 10)}からも明らかなように, 免疫応答の異常が主因であるとする考えには異論がない。すなわち臨床的には中年女性に好発し, Sjögren 症候群や慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患の合併率が高く, 組織学的には形質細胞浸潤を伴う慢性非化膿性破壊性胆管炎 (CNSDC)

と呼ばれる特異な自己免疫性胆管炎像や肉芽腫形成がみられ, 免疫学的には抗糸粒体抗体 (AMA, anti-M2) の特異的検出¹¹⁾ や免疫複合体の高頻度出現¹²⁾, 血清 IgM の高値などの液性免疫異常や, T 細胞機能の低下, suppressor T cell 活性の低下¹³⁾, natural killer cell 活性の低下¹⁴⁾ 等の細胞性免疫異常が認められる。

Suppressor T cell を中心とする免疫調節機構の研究に関連して, 単クローン抗体を用いての PBC における T cell subsets についての報告も多い。1980年 Routhier ら¹⁵⁾ は, 当初 T4/T8 比が PBC では著しく減少していると発表したが, その後共同研究者の Thomas ら¹⁶⁾ はむしろその比は上昇すると訂正し, Bahn らも同様の成績を報告した。著者らの検討でも, PBC は健常者および他の慢性肝疾患に比して有意の上昇を認めたのに加え, 症例によるばらつきも顕著であった。そこで今回, PBC を臨床所見より3群に分類して比較したところ, Ja 群は As 群に比して T4 は増加し T8 は減少しており, その結果 T4/T8 比は有意に上昇していた。以上の成績は他の自己免疫疾患における報告と類似しており, PBC の臨床像と T cell subsets の数量変化との間に, 一定の関係があることが示唆された。しかしながらかかる T cell subsets の変化は疾患特異性に乏しく, 自己免疫疾患共通の所見であることから PBC の発症機序に直接関与しているとは考え難い。この変化が病像進展における原因の一つなのかそれとも結果, すなわち2次的な現象にすぎないのかについては今後の検討が必要である。

結 語

1) PBC 患者は健常者, 他の慢性肝疾患患者に比し, 百分率で T4 の増加, T8 の減少を有意に認め, その結果 T4/T8 比は有意に高値であった。

2) PBC においては, 黄疸を有する臨床群が無症候群に比し T4/T8 比が有意に高値であり, 病像進展と T cell subsets の数量変化との間に関連性のあることが示唆された。

なお今回後段で発表した OKT/1 強陽性細胞および DR⁺, Leu 12-細胞については, 紙面の都合上, 他稿¹⁷⁾を参照されたい。

参 考 文 献

- 1) 市田文弘: 第61回日本消化器病学会特別講演. 原発性胆汁性肝硬変とその周辺. 日消会誌, 72: 1428, 1975.
- 2) 渡辺悟志, 山舘昌由, 市田文弘, 他: 原発性胆汁性肝硬変の経過と予後, 肝胆膵, 7: 217, 1983.
- 3) Thomas, H.C. and Epstein, O.: Immunologic

- aspects of the pathogenesis and treatment of primary biliary cirrhosis. In Berk PD, Chalmers TC (eds): *Frontiers in liver disease*. Thieme-Stratton, New York, 1981, p. 269.
- 4) **Thomas, H.C., Sherlock, S. and Potter, B.J.:** Is primary biliary cirrhosis an immune complex disease? *Lancet*, **ii**: 1261, 1977.
 - 5) **McFarlane, I.J., Wojcicka, B.M., Tsantoulas, D.C., et al.:** Leukocyte migration inhibition in response to biliary antigens in primary biliary cirrhosis, sclerosing cholangitis and other liver disease. *Gastroenterology*, **76**: 1333, 1979.
 - 6) **Epstein, O., Thomas, H.C. and Sherlock, S.:** Primary biliary cirrhosis is a dry gland syndrome with features of chronic graft-versus-host disease. *Lancet*, **i**: 1166, 1980.
 - 7) **James, S.P., Elison, C.O., Jones, E.A., et al.:** Abnormal regulation of immunoglobulin synthesis in vitro in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*, **79**: 242, 1980.
 - 8) **山舖昌由, 石原 清, 市田文弘:** 原発性胆汁性肝硬変. 免疫と疾患, **8**: 377, 1984.
 - 9) **市田文弘, 山舖昌由, 本田一典, 他:** PBC 100 例における AMA を中心とした血清学的検討. 厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究班, 昭和59年度報告, 1984.
 - 10) **山舖昌由, 太田宏信, 荒川謙二, 他:** 原発性胆汁性胆硬変患者末梢血における OKT 11 ヒストグラムの flat pattern について. *肝臓*, **26**: 1294, 1985.
 - 11) **Nagai, S., Manns, M., Meyer, zum Büschenfelde, K.H., et al.:** Detection of mitochondrial antibodies directed against the primary biliary cirrhosis (M2) antigen by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Immunol Methods*, **60**: 677, 1982.
 - 12) **市田文弘, 山舖昌由, 石原 清:** 原発性胆汁性肝硬変における anti-antibody 法を用いた circulating immune complex の検討. 厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究班, 昭和55年度報告, 1980, p. 171.
 - 13) **石原 清, 山舖昌由:** 原発性胆汁性肝硬変患者における suppressor T cell と臨床像の関係について (会). *日消会誌*, **80**: 1359, 1983.
 - 14) **石原 清, 山舖昌由, 吉田俊明, 他:** 原発性胆汁性肝硬変と免疫異常. *肝臓*, **7**: 175, 1983.
 - 15) **Routhier, G., Epstein, O., Thomas, H.C., et al.:** Effect of cyclosporin A on suppressor and inducer T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *Lancet*, **ii**: 1223, 1980.
 - 16) **Thomas, H.C.:** T cell subsets in patients with acute and chronic HBV infection, primary biliary cirrhosis and alcoholic induced liver disease. *Int J. Immunopharmac*, **3**: 301, 1981.
 - 17) **山舖昌由:** 原発性胆汁性肝硬変における末梢血リンパ球の表面形質に関する研究, *肝臓*, **27**(1): (掲載予定), 1987.
- 司会 有難うございました. 今のお話は, 前段と後段に分かれておまして, 前段の方は, 主に PBC を中心として, 主なパラメータ T 4, T 8 ratio を用いてお話しになっていますし, 後段の方は11の意義についてお話しになったわけですが, ご発言 ございましょうか. はい, どうぞ.
- 藤原 臨床のことはよくわからないのですが, PBC の時に Ia プラスの T 細胞が増えてくるというわけですね. それはどうして増えてくるかということは, 大変興味をもっているのですが, たとえば, 抗原が何かあって, それに会って区別されるという可能性が一つあると思うのですけれども, その Ia プラスの T 細胞が局所に増えているという証拠は何かありますか. あの ril で染めたというのがありましたね.
- 山舖 PBC を含めた肝生検組織における T cell subset に関する増告は数多く見られますが, Ia 抗原陽性 T 細胞に関する報告は, 組織中においては現在まだないように思います.
- 藤原 そうですか. 抗原特異的以外に, Ia が表現されるというのは, たとえば, γ -インターフェロンが何かでも, かなり Ia がプラスになるというわけですね. そういう時に, この疾患で γ -インターフェロンが増えているとかそういうことはありますでしょうか. それからも一つ, activate した T cell があると免疫異常がかなり広汎にあるとおっしゃったのですが, B cell の異常がその時に出てくるような証拠はありますか. たとえば免疫グロブリンを産生している細胞が増えてくるとかですね. 一つだけ Immune complex の level が上がるというデータがありましたね. そういう T cell が上昇しているということと他の B cell の活性化が何か比例しているとか, そういうことはありますか.

山舖 T-B 間の検索は、現在まだ検討中の段階ですが。文献的には PBC に特異的な血清 IgM 値の高値異常とかそういうのをすべて、B cell だけの異常だとする者もいます。

司会 他にございませんか。前段の方のお話では、一般論ですけども、T4, T8 ratio と他のパラメータとかなり矛盾する点がありましたね。それをどうお考えでしょうか。

山舖 最初、con A induced suppressor activity と suppressor T cell の数が相関すると思ったのですが、あの方法、すなわち con A induced suppressor activity は、むしろ、その潜在能をみているのであって、すでに suppressor 活性が生かされた後であるために、suppressor T cell の数との間に有意な相関がみられなかったのかもしれませんが、一般的には数と機能は一致しないとする報告が多いようです。

司会 その問題について、一般論になりますが、ちょっと藤原先生に教えていただきたいのですが、免疫疾患、あるいは免疫異常があると推定されるような病気で、T4, T8 ratio というものの信頼性というか、いったいどの程度の重きがおけるのか、一般論で結構ですが、先生のご意見を伺いたいのですが。

藤原 色々な疾患の例で ratio をやっておられる方がいるのですが、非常に学きな問題は、それが疾患の primary の意義を持っているかどうかということに関してなのですが、例えば、SLE の場合、T 細胞の異常というこがかって非常に言われたのですけれど、むしろ、今 B 細胞の異常がバックにあって、僕は T 細胞などは二次的でないかと考えているのです。柴田先生の言われる一般性、信頼性ですが、例えば、神経性の MS なんかもよく調べられていて、T 細胞が日によって違ってくるというデータもあるのです。一人の人をとってみても、食餌前と食餌のあととか、寝の前、夜中、起きた後とか、そういうものもありますし、一点だけとって ratio がどうなっているというのは、僕はあまり意味がないといつも思って聞いているのでけれど、例えばそれが follow up して確実にそうだとか、疾患の動態との関係をきちんとだしているデータというのが以外と少ないものですから、そういうのが必要なと思うのです。

司会 演者はその点について何かお考えをお持ちですか。

山舖 PBC の T4, T8 ratio を follow しますと、

そんなに変化はない、すなわち高値のものはそのまま経過するように思われましたが、急性肝炎の中で症例により病初期には、T4, T8 ratio が非常に高値であるけれども、臨床像の改善とともに正常化したという症例もありました。しかし全くそういう傾向のない症例もありました。

司会 他にございませんでしょうか。はい、どうぞ。

渡部 一般的に T 細胞例の異常を調べる時に、リンホカイン、特にインターロイキン2の活性について測定されたことがございましょうか。

山舖 教室での IL-2 に関する検討では、PBC では幅広い分布を示し、一定傾向がないというデータを得ていますが、詳細は現在検討中です。

司会 どうも有難うございました。他にありませんか。はい、どうぞ。

品田 今の speculation でいいのですが、activated T cell が脾臓で高く、T8 が末梢血に少なく、肝臓に多いという3者をどういうふうに考えていますか。

山舖 末梢血の T8 というのは、主に suppressor T cell ではないかといわれてきましたが、肝臓の組織中の場合、suppressor T なのか cytotoxic T cell なのか、その両者の区別は現状では不可能ですが、T8 が肝臓中に動員されたが為に、末梢血では減少しているとも考えられると思います。それから、品田先生にお聞きしたいのですが、果たして HLA-DR と Leu 12 の差を activate T と想定たのですが、あれでいいのかどうかお聞かせ下さい。

品田 私はわかりません。ただスペクトラムⅢによれば客観性の数量が出ますので、一つのパラメーターとして使えると考えます。仮説が正しいかどうかは、今後ソーテングした細胞のダブルステイニングや function とのつき合わせが必要であり、各疾患ごとにやるべきだと思います。PBC で認められた HLA-DR マイナス Leu 12 が activated T cell であるといえるかは不明です。

司会 他にございませんか。今、演者のお出しになった疑問について、どなたか、俺はこう思うというような方はいませんか。どうも有難うございました。それでは時間の関係で次へ進ませていただきます。第4席は皮膚科の伊藤先生から皮膚科領域への応用、特に抗毛ケラチン単クローン抗体についてお願いします。