

実験的アレルギー性肝炎の研究

第 1 編

AKR マウス肝抽出液による C57Bl マウス長期感作後の組織学的変化

岡山大学医学部第一内科学教室 (主任：小坂淳夫教授)

平 田 弘 昭

(昭和50年 8月25日受稿)

要 旨

ヒトのウイルス性肝炎の発症および慢性化のアレルギー性機序を解明するための一手段として、AKR 肝抽出液を抗原として C57Bl に長期感作を施行し、肝グリソン氏鞘内に著明な円形細胞浸潤, piecemeal necrosis, 肝細胞壊死, 星細胞の反応を作成しえたが、リンパ濾胞の形成、肝グリソン氏鞘の結合組織の増生は認められなかった。

以上の組織変化は肝炎 B 抗原, すなわち, hetero 抗原とその抗体とのアレルギー機序によって生じると考えられるヒトのウイルス性肝炎の組織表現にかなり類似している。しかし、長期感作を中止し放置すると、組織変化は消褪した。

I. 緒 言

近年、ヒトのウイルス性肝炎は Blumberg ら¹⁾ によって発見された肝炎 B 抗原 (hepatitis B antigen; 以下 HB 抗原と略す) との関連において、その発症ないし慢性化の問題が明らかにされつつある。そして、このウイルス性肝炎の発症機序に関しては、肝炎ウイルスが直接的に感染肝細胞を障害するのではなく、感染肝細胞で産生された HB 抗原とこれに対応する抗体が二次的に HB 抗原保有肝細胞を標的細胞として反応し、肝壊死を起こさせ、発症するという仮説が問題視されている。^{2,3)}

今回、著者は以上のようなウイルス性肝炎発症に関する問題点を明らかにすることを目的として、従来報告されている同種肝抗原を用いた実験的アレルギー性肝炎^{4)~10)}を動物の雑系を用いて行うのではな

く、純系マウスを用いることによって再現し、興味ある成績を得たので、主として病理組織学的所見を中心に、ヒトの HB 抗原陽性肝炎の病理組織学的特徴と比較しながら、若干の考察を加えて報告する。

II. 実験方法

1. 実験動物：体重20~25gの純系雄 C57ブラックマウス (以下 C57Bl と略す) を130匹使用し、10匹を一纏にしてクリンケージ B (日本クレア株式会社) に分け、飼育用固形飼料 (日本クレア株式会社) および飲料水を十分に与えた。

2. 感作抗原の作成：体重25g前後の純系雄 AKR マウスをエーテル麻酔のもとで腹部の毛を充分毛取り、0.1% thimerosal で消毒し、断頭汚血し、肝門部を露出し、37℃の滅菌生理的食塩水 (以下生食水と略す) を門脈より注入し、肝内の血液を排除した。次いで、肝に出入する大血管、大胆管、結合組織を除去し、ビーカー内に肝を取り出し、大切開を加え、さらに血管、胆管、結合組織を除去し、生食水で3回血液を洗い流し、更に眼科用鉗で肝を細分し、生食水で2回洗浄後細切肝に生食水を加えて、乾燥滅菌した warning blender を使用し、50% w/u 肝抽出液を作成した。肝抽出液は滅菌試験管に分注し、滅菌した二重キャップを被せ、-20℃に凍結保存した。

3. 感作方法および対照：

第 I 群 ; 50% w/u 肝抽出液に complete Freund's adjuvant (以下 CFA と略す) を 5 : 1 の割合に混じ、water in oil emulsion にして、C57Bl 一匹あたり 0.5ml を週一回、下記のごとき注射法で感作した。

すなわち、四肢および頸部の5カ所の筋肉内に分注した筋肉注射群（以下M群と略す）40匹、腹腔内注射群（以下P群と略す）30匹、腹腔内および筋肉内に半量ずつ注射した群（以下MP群と略す）15匹の三群に分け、5回より20回まで感作した。

第II群；CFA加生食水（1：5）をwater in oil emulsion にして0.5ml を第I群のM群と同様の方法でC57Bl 30匹に筋注した。

第III群；50% w/u 肝抽出液のみを第I群のM群と同様の方法でC57Bl 15匹に筋注した。

第IV群；生食水のみ0.5ml を第I群のM群と同様の方法でC57Bl 10匹に筋注した。

第II、IIIおよびIV群の注射はいずれも週一回で、計15回施行した。

4. 病理組織学的検索方法：

感作C57Bl および対照C57Bl をエーテル麻酔のもとに断頭瀉血し、血清を分離してmicro-Ouchterlony 法およびP. C. A. 反応を施行した。

一方、直ちに開腹し、肝および脾を摘出した。肝は10%中性ホルマリンにて固定し、Haematoxylin-Eosin 染色、Azan 染色、細網線維鍍銀染色（PAP 染色）、弾力線維染色（Van Gieson 染色）、d-PAS 染色等を行って観察した。また、組織学的変化の著明な例ではMethylgreen-pyronin 染色（Brachet 法）を施行し、RNA 合成の状態を観察した。また、

一部の症例ではcryostat凍結切片にマウスr-globulin の家兎抗血清（Hyland 社）を間接法にて反応させ、r-globulin 染色を施行した。

また、9匹の長期感作C57Bl は屠殺12時間前に³H-thymidine 5μq/g を尾静脈より注射し、肝組織autoradiogram を作成した。

III. 実験成績

1. 体重変化および死因

実験過程におけるC57Bl の体重の変化を観察すると、I 群中P群は感作3～4週まではM群に比較して体重の増化は低下していたが、4～6週より腹水の貯溜をきたし、急速に体重の増加を認めた。II、III、IV群では正常無処置C57Bl と同様の体重増加を示した。

次に実験中、死亡したC57Bl の原因について検討してみると、I 群では85匹中25匹が死亡し、PおよびPM群では非化膿性腹膜炎のため腹水の貯溜をきたしたものが各5例と4例あり、腹腔内注射直後に多量の腹腔内出血を生じたP群3例、PM群1例で、いずれも肺炎を合併していた。また注射回数が増加するにつれて、注射直後に全身痙攣、失禁、注射部位よりの出血、呼吸停止を生じ死亡したものはI 群中M群に11例、P群に1例およびII、III群でも各2例と5例に認められた。

TABLE 1

Histological changes in livers of mice immediately after sensitization with homologous whole liver extract as compared with control groups.

Group	No. mice	Cell infiltration								Bile duct proliferation				Granuloma				Hepatic cell degeneration				Hepatic cell necrosis				Kupffer cell activation				Portal fibrosis	
		Portal areas				Sinus																									
		—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+
I	60	26	23	9	2	41	19	0	0	55	5	0	0	32	26	2	0	31	21	8	0	33	24	2	1	36	19	4	1	60	0
II	28	21	7	0	0	25	3	0	0	27	1	0	0	15	13	0	0	20	8	0	0	22	6	0	0	22	6	0	0	28	0
III	10	8	2	0	0	9	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	8	2	0	0	10	0	0	0	8	2	0	0	10	0
IV	10	10	0	0	0	9	1	0	0	10	0	0	0	9	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0

2. 病理組織学的所見

各群における肝の病理組織学的所見は表1に示すごとくである。

I 群では60例中34例においてGlisson氏鞘（以下G鞘と略す）内に主として小ないし中円形細胞、一

部に形質細胞、大型リンパ球、好中球、好酸球の細胞浸潤、胆管の軽度増生および門脈系の軽度の拡張を認めた（図1）。この内11例に円形細胞浸潤が著明で、限界層の破壊を生じ、切りくずし現象を認め（図2）、限界層付近にRNA合成の盛んな形質細胞

Fig1 Histological features of the sensitized murine liver with homologous liver extract, showing a moderate infiltration of round cells and a proliferation of bile ducts in the portal area resulting in a slight enlargement of the triad, a liver cell degeneration as well as necrosis and Kupffer cell activation in the hepatic lobules as observed in 32 of 60 mice.

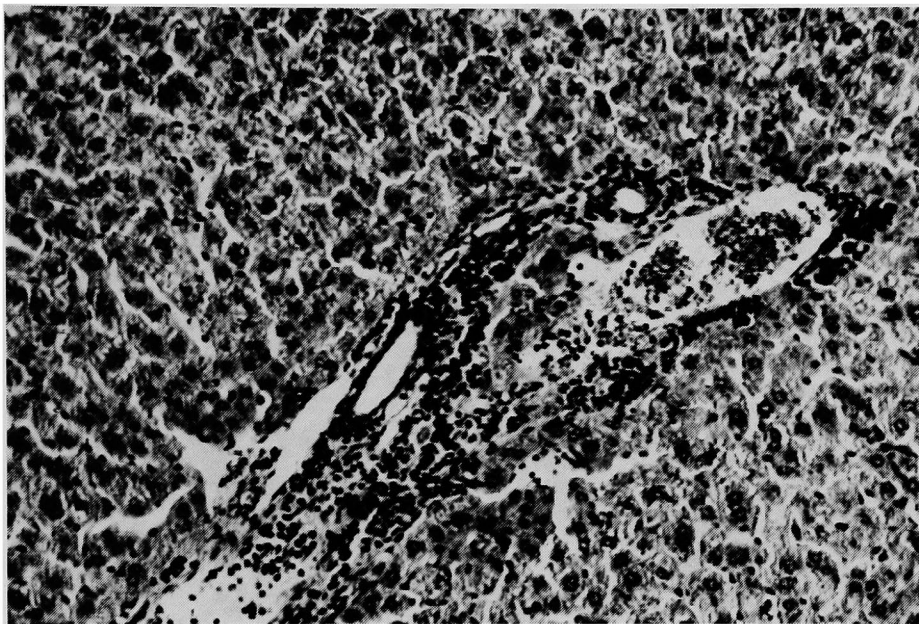


Fig2 A portal area showing an extensive infiltration of round cells and a piecemeal necrosis as observed in 11 out of 60 mice.

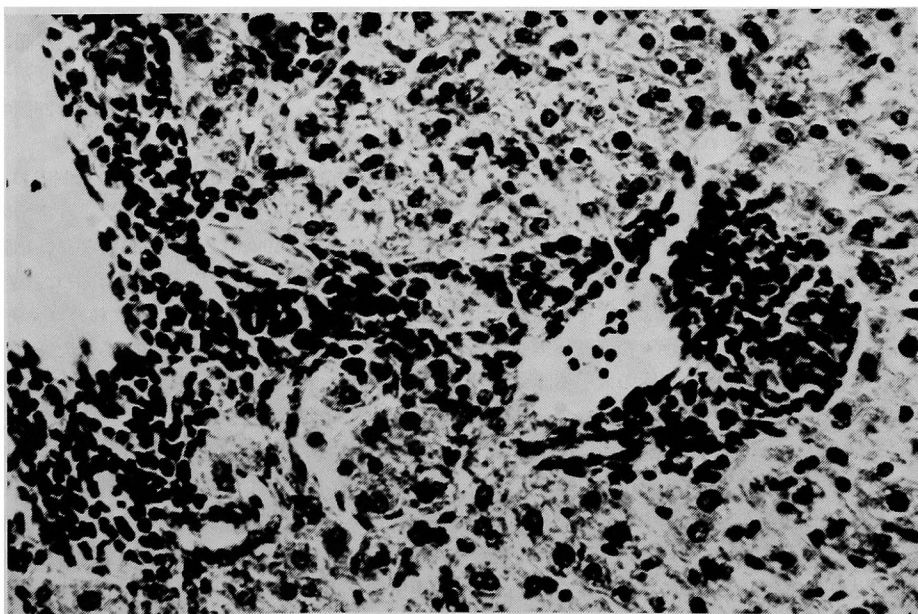
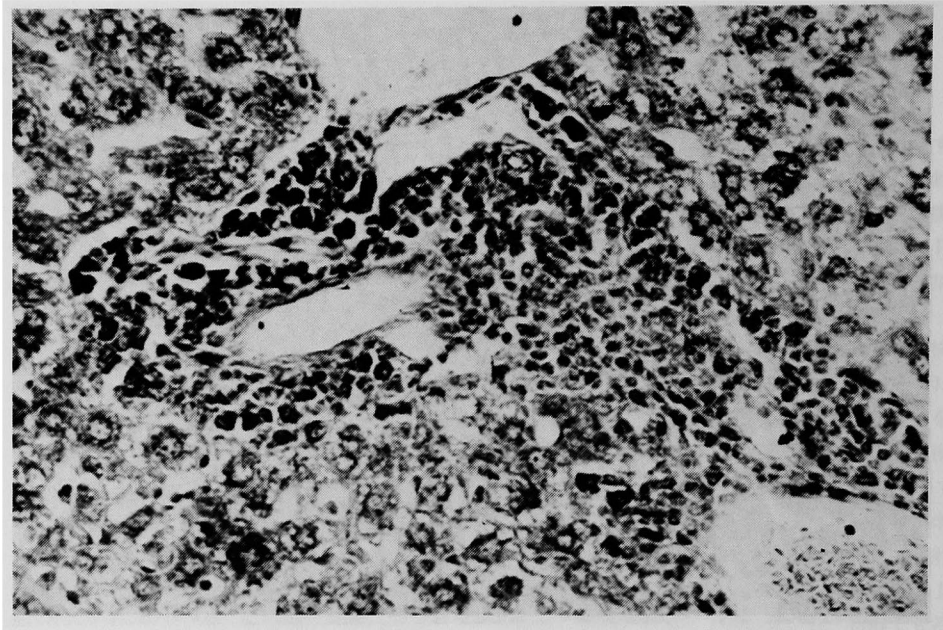


Fig 3 A portal area demonstrating numerous plasma or plasmacytoid cells with abundant cytoplasmic RNA in the periphery and a remarkable infiltration of round cells throughout. (Methylgreen-pyronin stain)



が顕著に認められた(図3)。しかし、リンパ母細胞形成、結合組織の増生に伴うG鞘の延長や拡大による小葉構造の変形は認められなかった。

類洞内に細胞浸潤を生じたものは60例中19例で、いずれも軽度であったが、それはリンパ球および好中球の浸潤であった。また28例においては小葉の所々に類上皮細胞、リンパ球、形質細胞、まれに巨細胞を有する小肉芽腫の形成を認めた(図4)。

以上のようなG鞘内細胞浸潤や類洞内細胞浸潤、肉芽腫形成の比較的強い例では、主としてその周辺の肝細胞は水腫性変化を来とし、所々に好酸体や小壊死巣を認め、全体的に肝細胞および核の大小不同、所々に空胞核や脂肪変性を認めた。Piecemeal necrosisを伴う1例では広範な肝実質細胞壊死、高度の星細胞の増生および脂肪変性を認めた(図5、図6)。

星細胞の肥大・増殖・貪食は60例中24例に認め、5例に比較的強い反応を呈していた。

II群における肝組織変化は表1に示すごとく、I

群に比較して軽度であり、中等度以上の変化は1例も認められず、G鞘内および類洞内の細胞浸潤、肝細胞の変性および壊死、星細胞の反応は軽度かつ低頻度であった。しかし、小肉芽腫の形成は28例中13例とI群とほぼ同率に認められた。

III群の肝組織変化では極めて軽度の類洞内およびG鞘内の円形細胞浸潤、星細胞の肥大、肝細胞の変性を認めるものが10例中2例みられたが、肝細胞壊死、肉芽腫の形成は全例に認められなかった。逆に、肝細胞の肥大、二～三核細胞の増加、核クロマチン、RNAおよびDNAの増加傾向が認められた。

IV群においては10例中1例に極めて軽度の類洞内細胞浸潤と肉芽腫形成を認めた。

以上の肝の病理学的所見を要約すると、I群の病変は対照群に比較して明らかに強い肝炎像を呈していた。しかし、肉芽腫形成に関してはI群とII群の間に差を認めなかった。III群においては肝細胞自体の再生像を認めた。

Fig 4 Granulomas within the hepatic parenchyma consisting of lymphocytes, epitheloid cells, plasma cells and giant cells as observed in 28 out of 60 mice.

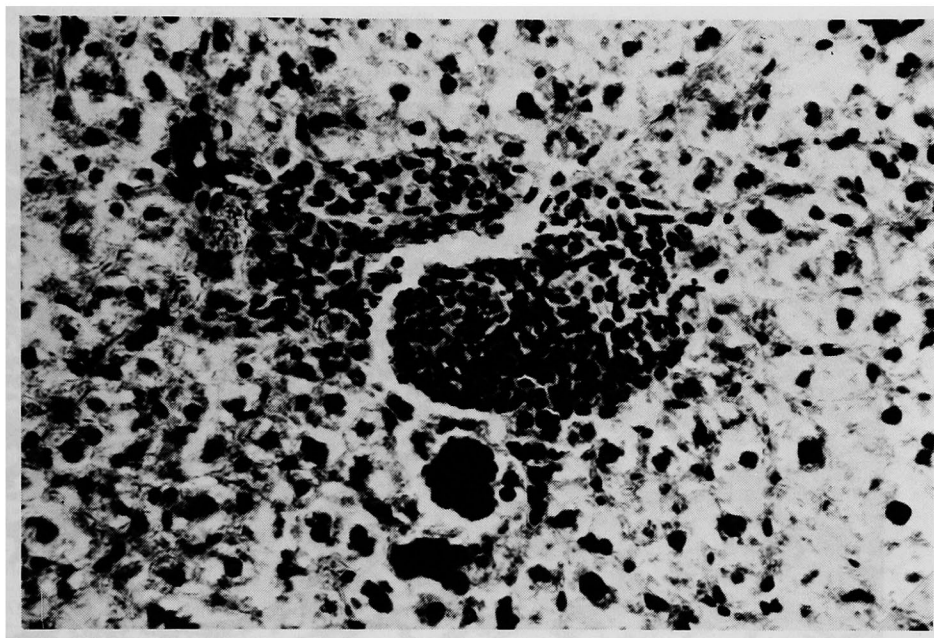


Fig 5 Extensive necrosis of liver parenchyma cells after sensitization with homologous liver extract as well as with complete Freund's adjuvant as observed in 1 out of 60 mice.

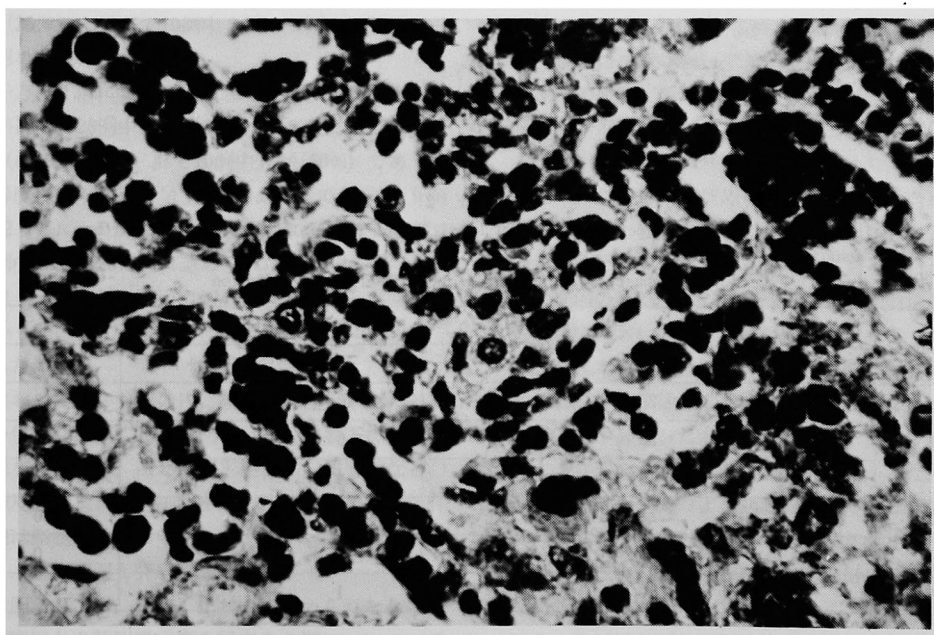


Fig 6 A peripotal area showing an extensive infiltration of round cell
piecemeal necrosis, Knpffer cell activation and fatty metamorphosis.

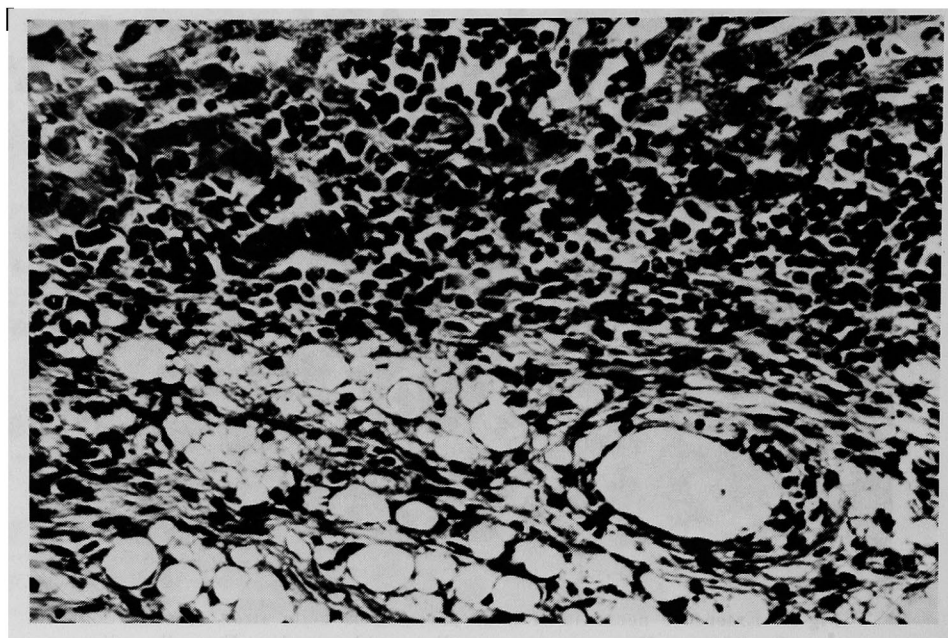


TABLE 2

Relationship between injection method of sensitization and histological changes of the sensitized murine liver.

M ; Intramuscular injection, P ; Intraperitoneal injection

Group	Injection method	No. mice	Histological changes of liver			
			—	+	⦿	⦿
I	M	28	9	10	7	2
	P	32	13	6	3	0
	MP	10	4	4	2	0
II	M	28	21	7	0	0
III	M	10	8	2	0	0
IV	M	10	9	1	0	0

なお、I 群においては肝組織変化の強い例ほど脾は腫大し、旁大動脈、腸間膜、頸部など全身各所のリンパ節の腫大が認められ、リンパ母胞では中～高度の過形成の状態がみられ、リンパ球、細網細胞、形質細胞および RNA に富む大型細胞が増生し、所々に巨細胞を有する肉芽腫形成を認めるが、膠原線維など結合組織の増生は認めなかった。II および III 群においては軽～中等度の脾および全身各所のリンパ節の腫大を認めるが、組織像は I 群に比較して軽度

の過形成の状態にとどまっていた。

以上の網内系以外の臓器変化として、I, II, III 群ともに肺および臓側肋膜下に円形細胞浸潤および小肉芽腫を少数例に認めた。心、腎、睪丸などの諸臓器には著変を認めなかった。

3. 注射部位と肝組織病変の程度

I 群における M 群, P 群, MP 群および II, III, IV 群 (いずれも M 群) における肝組織病変, すなわち G 鞘の細胞浸潤, 肉芽腫形成, 肝細胞の変性や壊死,

TABLE 3
Relationship between duration of sensitization and significant hepatic changes with more than grade ++ in Group I.

Duration of sensitization		5-9 w.	10-14 w.	longer than 15 w.
No mice		15	30	15
Cell infiltration	Portal area	1	4	6
	Sinus	0	0	0
Granuloma		0	0	2
Hepatic cell degeneration		3	2	3
Hepatic cell necrosis		0	1	2
Kupffer cell activation		1	2	2

星細胞の反応の程度を総合的に判定してみると、表 2 のごとくである。

II, III, IV 群においては中等度以上の肝組織変化は 1 例も認められず、軽度の変化が II 群で 28 例中 7 例 (25%), III 群で 10 例中 2 例, IV 群で 10 例中 1 例に認められた。

一方、I 群においてはなんらかの変化を呈する例は、M 群で 28 例中 19 例 (67.9%), P 群で 22 例中 9 例 (40.9%), MP 群で 10 例中 6 例 (60%) であり、中等度以上の変化を呈する例は M 群で 28 例中 9 例 (32.1%), P 群で 22 例中 3 例 (13.6%), MP 群で 10 例中 2 例 (20%) に認められた。

以上より、肝組織変化は M 群において最も高率に、しかも強い変化を生じ、ついで MP 群, P 群の順であった。

なお、I 群中 P 群の内、腹水の貯留を来とし、肺炎を併発して死亡した 3 例では、肝被膜下に多核好中球を主体とし、所々に円形細胞、形質細胞などの細胞浸潤、まれに巨細胞を認め、その部に接する肝細胞は脂肪変性におちいていた。

4. 感作期間と肝組織病変の程度

対照 (II, III, IV 群) において認められなかった中等度以上の肝組織病変を呈する I 群について、感

作期間と肝病変の程度を比較検討した (表 3)。検討例は感作期間を 5～9 週間, 10～14 週間, 15 週間以上に分けてみると、それぞれ 15, 30, 15 例であった。

その結果は、肝細胞の変性、類洞内細胞浸潤では、感作期間の長短において差が認められなかったが、G 鞘内の細胞浸潤、肉芽腫形成、肝細胞壊死および星細胞の反応においては、15 週以上の長期感作群に多く、中等度以上の肝組織変化を認めた。

次に、対照群にも認められた軽度変化を含めて検討してみると表 4 のごとくであった。即ち、感作回数が増すにつれて、肝組織変化は高率となった。特に G 鞘内の細胞浸潤、肉芽腫形成、肝細胞壊死、胆管の増生において発生頻度の差が著明であった。

一方、本実験とは別に、I 群中の M 群と同様の方法で 15 週間感作後、5 週間放置した 13 例について肝組織変化を観察したところ、対照群と同様、中等度以上の肝変化を呈した例は認められなかった。軽度の G 鞘内細胞浸潤および類洞内細胞浸潤は 13 例中 4 例、軽度の星細胞の反応 3 例、小肉芽腫 1 例に認められ、肝細胞の変性・壊死、胆管の増生は認められなかった。

5. I 群における特殊検索

TABLE 4

Relationship between duration of sensitization and hepatic changes with more than grade +, and hepatic changes long after the sensitization.

Duration of sensitization		5-9 w.	10-14 w.	longer than 15 w.	5 th. weeks post to sensitization for 15 w.
No. mice		15	30	15	13
Cell infiltration	Portal areas	5 (33%)	16 (53%)	13 (87%)	4 (31%)
	Sinus	3 (20%)	10 (33%)	6 (40%)	4 (31%)
Granuloma		0	15 (50%)	13 (87%)	1 (8%)
Hepatic cell degeneration		6 (40%)	13 (43%)	10 (66%)	0
Hepatic cell necrosis		4 (27%)	10 (33%)	13 (87%)	0
Kupffer cell activation		4 (27%)	8 (27%)	7 (47%)	3 (23%)
Bile duct proliferation		0	1 (3%)	4 (27%)	0

I 群の前記病変について、RNA、DNAの合成の状態、r-globulinの局在性の観察を施行した。

まず Methylgreen-pyronin 染色にて RNA 含有細胞の有無、局在を検索したところ、G 鞘内の細胞浸潤中に RNA 含有形質細胞が散在し、主として限界層に近接して認められた。一方、実質内の小壊死巣や肉芽腫中には RNA 含有細胞は認められなかった。

³H-thymidine による肝組織 autoradiogram を作成し、DNA 合成状態を検索したが、G 鞘内の細胞浸潤部においては、中型リンパ球に ³H-thymidine の取り込みが強く認められた。また、肝細胞や星細胞への ³H-thymidine の取り込みは軽度散在性に認められた。一方、G 鞘内の小型リンパ球、実質内の肉芽腫や小壊死巣、胆管、血管内皮細胞、線維細胞には ³H-thymidine の取り込みは認められなかった。

また、I 群の肝の cryostat 切片に家兎抗 r-globulin 血清を反応させ、r-globulin の局在性について、蛍光抗体間接法を用いて観察したところ、肝実質内の小壊死巣や肉芽腫には r-globulin の局在は認められず、G 鞘内の細胞浸潤部で限界層に接した形質細胞、リンパ球、piecemeal necrosis の部に強くその局在を証明した。

なお、I 群中15週間以上感作した C57 Bl を屠殺した際採血した血清について、肝抗原との間に micro-Ouchterlony 法および P. C. A. 法による反応を検討したところ、前者の方法では10例全部が陰性であり、後者の方法では10例中2例が弱陽性であった。

考 察

近年、ヒトのウイルス性肝炎の発生ならびに慢性化の機序に関する考え方として、肝炎ウイルスの感

染肝細胞が産生する HB 抗原と、これに対応する抗体が HB 抗原保有細胞を標的細胞として反応し、肝壊死を生じ、間質のリンパ球ならびに形質細胞の浸潤、時にリンパ母細胞の出現、線維の増生などを起すとの考えが注目されている。^{2) 3)} この抗原は本来ヒトの体内に存在しない iso 抗原の一種として認識され、かつ抗体産生が行われるものであるが、著者の同種肝抗原による感作実験も病因論的には同一と考えられるので、本実験はウイルス性肝炎の慢性化ないし遷延化の機序を明らかにする一手段ではないかと推測される。

ところで、ヒトの慢性肝炎では血清学的に、また組織学的に自己免疫現象がしばしば証明されている。^{17) 18) 19)}

既に、同種肝抗原を用い、ヒトの肝炎に類似した病変を作成しようとする試みは、1959年 Behar⁴⁾ にはじまり、Glodgraber,⁵⁾ Jahiel,⁶⁾ Norkin,⁷⁾ Soergel,⁸⁾ Scheiffarth^{9) 10)} 坂倉,¹¹⁾ 小坂,¹²⁾ 太田(五)¹³⁾ 若月,¹⁴⁾ 岡¹⁵⁾ らによりなされ、報告されている。

同種肝抗原によるアレルギー性肝炎作成の史的考察としては、Behar ら (1959) ⁴⁾ は CFA 加10% 同種肝抗原を用いて、モルモットおよびハムスターを感作し、広範な肝実質の凝固壊死巣を作成し、これが特徴的な反応であると報告した。しかし、Goldgraber ら^{5) 8) 15)} は Behar らの実験を追試し、肝実質に非特異的な小肉芽腫、小壊死、好酸体、脂肪変性、星状細胞の反応などの組織変化を認めたが、それらは対照に比較して組織学的および免疫学的に特有の変化とは認め難いと報告し、対立した。

Scheiffarth ら (1965) ⁹⁾ は家兎を用いて、CFA 加10% 同種肝抗原で長期間感作を施行し、門脈領域

の単核細胞浸潤と軽度の線維化、肝細胞壊死、星状細胞の増生、胆管の増生などヒトの慢性肝炎に近い肝組織像を呈する病変の作成に成功した。時を同じくして、小坂ら¹⁰⁾ (1966) は Sprague-Dawley 系ラットを用いて、短期間の感作を施行し、23例中9例にG鞘内に多数のピロニン好性細胞を含む円形細胞浸潤を認め、その9例中2例にリンパ母細胞様細胞浸潤を確認し、これはヒトの濾胞性肝炎に類似しており、自己免疫学的組織表現と考えた。

ついで、Scheiffarth ら¹⁰⁾ (1967) は近交系マウスを用いて、同種他系の肝抗原を週一回で計6回の感作後10~14日で肝組織を検索し、89例中58例にG鞘内の円形細胞浸潤および星状細胞の増殖を認め、その内12例に肝実質細胞の広範な壊死を示し、明らかに対照群と有意の差を認めた。

著者は以上のような史的考察の上にたって、さきのHB抗原とウイルス性肝炎発症の要因を明らかにすることを目的とし、Scheiffarth ら¹⁰⁾と同様の方法でCFA加50% AKRマウス肝抗原を用いて、近交系マウス C57Bl を Scheiffarth より長期の遷延感作を施行し、CFAを附加する意義、感作期間と病変の程度、注射部位と病変の程度などを検討し、ヒトのウイルス性肝炎との組織学的比較を試み、ほぼ類似の病変を得たことは興味深い成績と考えられた。

Complete Freund's adjuvant (以下CFAと略す)の意義については、現在までの報告では、同種臓器抗原を用いて自己免疫疾患類似の病変を作成するにはCFAが不可欠であるとされている。その理由として、CFA中に流動パラフィンおよび表面活性剤が含まれており、抗原をwater in oil emulsionの状態にすることにより、抗原を除々に放出して抗体産生を助長すること²¹⁾、およびCFA中の主要成分である結核死菌が実験動物の網内系を刺激し、Burnet²²⁾の“forbidden clone”の存続に適当な条件を与え、同種臓器抗原を強化して、抗体産生を促進する^{20), 21)}などが考えられている。後者の条件を採用した実験としては石井、辻野の実験²⁴⁾が挙げられるが、彼らは家兎を用いて、CFA加同種肝抗原を3日間隔で5~6回感作した後、上腸間膜動脈に結核死菌を注入し、1週間で門脈に著明な細胞浸潤、30日で門脈周囲の線維化の出現、60~90日で偽小葉形成を認めたが、CFA加同種肝抗原による感作のみでは線維化の出現を認めていない。

著者の実験においても以上の報告と同様に、同種肝抗原のみの感作では10例中2例に極めて軽度の間

質および実質変化を認めるにすぎなかったが、ついでCFAのみの注射群とCFA加同種肝抗原による感作群を比較検討した成績では、後者は前者に比較して、G鞘内および類洞内細胞浸潤、肝細胞の変性および壊死、星細胞の反応は明らかに高率であり、中等度以上の変化も認められた。しかし、小肉芽腫の形成については前者で28例中13例(46.4%)、後者で60例中28例(46.7%)とほぼ同率であった。

この肉芽腫に関しては、古くよりadjuvant diseaseの組織所見の一つとしてラットの肝、肺にその形成を認め、家兎やモルモットではCFAのみの注射でも肝、肺、脾に肉芽腫および小壊死を認めている^{9), 11), 20), 21)}しかし、Laufer ら²¹⁾の実験によると、マウスではadjuvant diseaseは生じ難く、肉芽腫形成は家兎やモルモットに比して軽度で少ないと報告しているが、著者は3~4カ月の近交系C57Blを使用し、CFA量を通常使用する量の1/2以下にとどめたが、小肉芽腫の形成をCFAのみ注射した対照群と、CFA加同種肝抗原による感作群いずれにも認めており、両群間には差を認めなかった。したがって肉芽腫の形成にはCFAが主体となっていると考えられた。

肉芽腫以外の組織学的変化に関して Goldgraber ら^{21), 22)}は、モルモット使用による実験で、組織学的および免疫学的に非特異的変化しか得られなかったとしているが、著者の実験ではCFAのみの注射群および肝抗原のみの注射群と、CFA加肝抗原による感作群の間には組織学的に明らかな差を認めており、従って本実験にみられるアレルギー性肝炎の作成にはCFAは不可欠であると考えられる。

長期感作の意義については、岡林²³⁾が遷延感作過程において、前半期の抗体産生組織のヒペルギーの状態から、後半期の動き続けたあとの抗体産生組織の分化喪失、すなわち疲憊状態があり、後半期の状態にさいしてはBurnet²³⁾のforbidden cloneの発生を生じうると考え、報告している。ヒトのウイルス性肝炎の慢性化の機序に関しても同様の過程が考えられ、Dudley ら²¹⁾小坂一辻²⁾は細胞性免疫を重要な慢性化の課題として研究し、HB抗原の産出と、抗原を認識する能力のある胸線由来のリンパ球(T細胞)の認識能が折り合っている場合、感染因子(B型肝炎ウイルス)は完全に除去されず、反応が持続するため、慢性化するのではないかと考えている。

そこで著者はCFA加同種肝抗原を用いた長期感作による組織変化の程度および長期感作後に放置した

場合の変化がどのように変化するかを観察した。その結果、肝変化の中等度以上の変化は長期感作群に高頻度に認められ、変化の強い例では脾腫大、各所リンパ節の肥大および組織像でもリンパ細胞の増生を認めた。また、長期感作後放置していると肝の組織変化は消失した。すなわち慢性化による非可逆的变化を作成するには至っていない。このことは前記の仮説を必ずしも支持する結果ではない。今後さらに長期の感作実験を行ってみる必要がある。

長期感作実験の報告として、太田(五)ら¹³⁾はウイスター系ダイコクネズミの自己の壊死肝抽出液にCFAを加え、週一回、10~11回の感作を行った結果、肝小葉中心部に凝固壊死巣の多発を認めている。また、若月¹⁴⁾は純系ウイスター系ダイコクネズミにCFA加同種肝乳剤を5日に1回筋注射し、6回感作群と15回感作群の間に著明な差を認め、長期感作群では不完全な偽小葉形成を伴う高度の肝線維症の発生を報告している。これらの報告は実験動物の種類、感作方法など各種の要因の相違があり、著者の実験結果と比較することは難しいが、長期遷延感作実験により、ヒトの慢性肝炎ないし肝硬変に近い状態を作成し得ることを示唆している。

なお、感作に際して皮内、皮下、筋肉内、経静脈および腹腔内注射が施行されているが、著者は実験動物の大きさ、抗原の性状および量的関係より筋肉内、腹腔内および両者併用の注射を施行し、腹腔内より筋肉内注射の方が肝変化が強いことを知り得た。長期遷延感作の場合、抗原をできる限り多くの場所に分注することが必要である。また、長期にわたる腹腔内注射の場合、非化膿性腹膜炎を呈し、衰弱死亡する例が多いことも認められた。

血中抗体と肝組織変化との関係については、一般に、ヒトの肝炎においては自己肝抗体が検出され、炎症所見が増強し、慢性化するにつれて高率に証明される。特に、自己免疫機序の関与が強いと考えられるルポイド肝炎、胆汁性肝炎などにおいては、抗肝抗体が高頻度かつ抗体価が高い。一方、同種または自己肝抗原による感作実験^{11) 24) ~ 26)}においても、抗肝抗体を証明したと報告しているが、Norkinら²⁾ Soergelら³⁾ 若月¹⁴⁾などは証明できないか、または極めて低い抗体価しか検出できなかったと報告している。著者はmicro-Ouchterlony法とP. C. A.法に依って検索しているが、後者の方法で10例中2例に陽性所見を得たにすぎなかった。したがって、血清抗体と組織変化の間には相関関係は認められないと

考えられた。

最近、辻ら²¹⁾はヒトの慢性肝炎活動型や、亜急性肝炎の肝組織をHB抗原を用いて蛍光抗原法で観察し、切りくずし現象を呈している部に浸潤するリンパ球の細胞膜や、細胞周囲にHB抗体を証明し、ウイルス性肝炎の遷延化はHBウイルスの肝細胞内持続、それに対応する体液性抗体と細胞性抗体およびHBウイルス消失後もhostの免疫過反応の生体防禦機構の反応によって生ずるものと考えている。著者の使用した抗原は同種肝抗原で、ヒト肝炎のHB抗原、すなわちiso抗原との相違はあるが、長期感作群ではG鞘内の細胞浸潤部で限界層に接した肝質細胞、リンパ球、piecemeal necrosisの部に強いr-globulinの局在を証明し、病因論的には作用機序は相似していると考えられる。しかしながら著者の作成した実験的アレルギー性肝炎では、既に述べたように感作を中止するとG鞘内の変化は時とともに減退、消失しており、慢性肝炎に相似した実験的アレルギー性肝炎作成にはなお長期の感作が期待される。

結 論

ヒトのウイルス性肝炎の成立および慢性化に、アレルギー反応機序の関与が強く類推されるので、その実証の手段として著者は、AKR肝抽出液 (complete Freund's adjuvant (CFA) 添加) を抗原として、C57 Blに長期感作を試み、次の結果を得た。

1) 本実験群は対照群に比較してG鞘に著明な円形細胞浸潤および切りくずし現象、胆管の増生を認めたが、リンパ細胞の形成、結合組織の増生に伴うG鞘の延長や拡大による小葉構造の変形は認められなかった。同時に、肝細胞の変性、壊死、星細胞の増生、類洞内の細胞浸潤を認め、ウイルス性肝炎の肝病変に類似した所見が得られた。なお、小肉芽腫の形成は対照のCFAのみ感作群においても同率に出現を認めた。

2) 本実験群の肝組織ではG鞘内の細胞浸潤中にRNA含有肝質細胞が散在し、主として限界層に近接しており、また³H-thymidineの取り込みの強い中型リンパ球が混在し、それらの細胞およびpiecemeal necrosisの部にr-globulinの局在を証明した。

3) この実験的アレルギー性肝炎作成には、CFAの併用が不可欠であり、感作が長期に行われるほど組織変化は高度であった。しかし、感作を中止放置すると組織変化は消褪した。なお、抗原注射には腹腔内注入よりも各所筋肉内分割注射の方法がより有

効であった。

した恩師小坂淳夫教授，終始御指導，御教示賜りま

4) 体液性肝抗体の検出は極めて困難であった。

した辻孝夫講師に深謝致します。

稿を終るにあたりまして御指導，御校閲下さいま

文 献

- 1) Blumberg, B. S., Alter, H. J. and Visnich, S. : A "new" antigen in leukemia sera. *J. A. M. A.*, **191** : 541, 1965.
- 2) 辻孝夫, 野崎肇 : Au 抗原と肝炎発症機序に関する試論とその問題点について. *臨床免疫*, **5** : 479, 1973.
- 3) Dudley, F. J., Fox, R. A. and Sherlock, S. : Cellular immunity and hepatitis-associated, Australia antigen liver disease. *Lancet*, **I** : 723, 1972.
- 4) Behar, A. J. and Tal, C. : Experimental liver necrosis produced by the injection of homologous whole liver with adjuvant. *J. Path. Bact.*, **77** : 591, 1959.
- 5) Goldgraber, M. B. and Kirsner, J. B. : The hypersensitive state and the liver : a critical review. *Am. J. Med. Sci.*, **241** : 109, 1961.
- 6) Jahiel, R. I. and Koffler, D. : Hepatic granulomas induced in guinea pigs by Freund's adjuvant with and without homologous liver. *Brit. J. Exp. Path.*, **42** : 338, 1961.
- 7) Norkin, S. N., Gottlieb, L. S. and Zamcheck, N. : Effects of liver homogenate and Freund's adjuvant on guinea pig liver and other organs. *Am. J. Digest. Disease*, **7** : 824, 1962.
- 8) Soergel, K. H. and Friedell, G. H. : Nonspecific effects of liver extract-adjuvant injection in guinea pigs. A morphologic and immunologic study. *J. Lab. Clin. Med.*, **64** : 51, 1964.
- 9) Scheiffarth, F., Warnatz, H. and Niederer, W. : Tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese der chronischen Hepatitis. *Virchows Arch. path. Anat.*, **339** : 358, 1965.
- 10) Scheiffarth, F., Warnatz, H. and Mayer, K. : Studies concerning the importance of mononuclear cells in the development of experimental hepatitis. *J. Immunol.*, **98** : 396, 1967.
- 11) 坂倉武彦 : X線照射された動物の血清及び臓器の同種動物に対する抗体性についての実験的研究. *アレルギー*, **15** : 75, 1966.
- 12) 小坂淳夫, 太田康幸, 辻孝夫, 岡莞爾 : 肝炎の免疫病理学的研究 (第4報) ラットの実験的肝炎とその解析の試み. *アレルギー*, **18** : 386, 1969.
- 13) 太田五六, 土井下健治 : 実験的自己免疫性肝壊死. *医学のあゆみ*, **63** : 517, 1967.
- 14) 若月寿之助 : アレルギー性肝障害に関する実験的研究. *金沢大学十全医誌*, **76** : 198, 1968.
- 15) Heymann, W., Hackel, D. B. and Hunter, J. L. P. : Autoimmune nephrosis in rats. *Federation Proc.*, **19** : 195, 1960.
- 16) 岡莞爾 : ラットの実験的肝炎. *岡山医誌*, **85** : 277, 1973.
- 17) Mackay, I. R., Taft, L. I. and Cowling, D. C. : Lupoid hepatitis. *Lancet*, **2** : 1323, 1959.
- 18) Paronetto, F., Schaffner, F., Mutter, R. D., Kniffen, J. C. and Popper, H. : Circulating antibodies to bile ductular cells in various liver diseases. *J. A. M. A.*, **187** : 503, 1964.
- 19) Tsuji, T., Ogawa, K. and Kosaka, K. : An immunofluorescent study of circulating antiliver antibodies in chronic liver diseases. *Acta. Path. Jap.*, **15** : 273, 1965.
- 20) Steiner, J. W., Langer, B. and Schatz, D. L. : The local and systemic effects of Freund's adjuvant and its fractions. *Arch. Path.*, **70** : 424, 1960.
- 21) Laufer, A., Tal, C. and Behar, A. J. : Effect of adjuvant and its components on the organs of

- various animal species ; a comparative study. Brit. J. Exp. Path., 40 : 1, 1959.
- 22) 岡林篤：異常免疫過程と感作病の概念. 臨床アレルギー学 P. 67, 朝倉書店, 東京. 1967.
- 23) Burnet, F. M. : Autoimmune disease. II. Pathology of the immune response. J. Brit. Med., 2 : 720, 1959.
- 24) 石井潔：肝炎における自家抗体に関する研究. 日消会誌, 54 : 537, 1957.
- 25) 和泉正昭：臓器アレルギーに関する研究, 第 1 編肝同種並に自己抗体の産生について. 岡山医誌, 71 : 6407, 1959.
- 26) 太田康幸：肝炎に関する免疫学的研究. 第 2 編肝自己並に同種抗体に関する免疫組織学的研究. 岡山医誌, 71 : 6645, 1959.
- 27) Freund, J. and Lipton, M. M. : Experimental allergic encephalomyelitis after the excision of the injection site of antigen-adjuvant emulsion. J. Immunol., 75 : 454, 1955.

I. Histological Studies on Experimental Hepatitis after Sensitization with Homologous Liver Extract

Hiroaki Hirata

First Department of Internal Medicine, Okayama

University Medical School, Okayama, Japan

(Director : Prof. Kiyowo Kosaka)

ABSTRACT

In an attempt to evaluate histologically an allergic phenomenon involved in the development of chronic hepatitis in man, the inbred strain C57BL mice were sensitized for prolonged durations from 5 to 19 weeks with a homologous liver extract from AKR mice as well as with complete Freund's adjuvant.

Histological changes in the liver of the sensitized mice immediately after the treatment comprised a marked round cell infiltration in the portal areas, piece-meal necrosis, various types of liver cell necrosis and degeneration, and an activation of the Kupffer cells as compared with control groups. These histological changes somewhat resembled the findings of chronic hepatitis in human liver disease, but they have greatly subsided in 5 weeks post to the last sensitization.

It may be assumed on the basis of the present experiment that a persistent sensitization for a longer duration is necessitated for the establishment of a chronic murine hepatitis similar to a human chronic hepatitis.