

ラットの実験的肝炎—組織学的ならびに免疫学的研究

岡山大学医学部第一内科教室（主任：小坂淳夫教授）

岡 莞 爾

〔昭和48年7月17日受稿〕

緒 言

古くから抗原抗体反応によって肝障害が起こることは知られており、この方面では主として血清学的研究、および異種タンパク質によるアレルギー性肝障害、hepatotoxin による逆アレルギー性肝障害などの実験的研究がなされてきた。ところが近年に至り、Mackay らの提唱した lupoid hepatitis¹⁾の概念を契機として、肝炎の慢性化とその進展の過程に自己免疫現象が関与していることが推察されるようになり、既に一連の臨床免疫学的研究からある程度の裏づけがなされてきた。しかし、慢性肝疾患に認められる多彩な自己免疫現象の病因論的役割については推察の域を出ず、これを立証するためには実験的に動物にヒト肝疾患と類似の病変を作製することが必要で、既に Freund's adjuvant 加同種肝ホモジネートによる感作実験が試みられ、若干の研究報告がみられているが^{2) 3) 4) 5) 6)}その際えられた肝組織変化には、Freund's adjuvant を使用したための問題が含まれていたり、免疫学的解析も不十分な点があ

るように思われる。また、肝疾患時に認められる血清抗肝抗体の細胞障害性については明らかでなく、むしろリンパ球を主体とした細胞性抗体の cytotoxicity が注目され、感作リンパ球による passive transfer による実験的肝炎の作製も試みられ、興味ある^{2, 3}の成績が報告されている。^{7) 8)}

著者はヒト肝炎における免疫現象を解析する目的で、Sprague-dawley 系ラットを使用して、同種肝ホモジネートに Complete Freund's adjuvant を加え一定の回数感作すること、および感作ラットの脾細胞による passive transfer により実験的肝炎を作製し、この所見がヒト肝炎の病変と類似しているところからその免疫学的検討を行ない興味ある成績をえたので報告する。

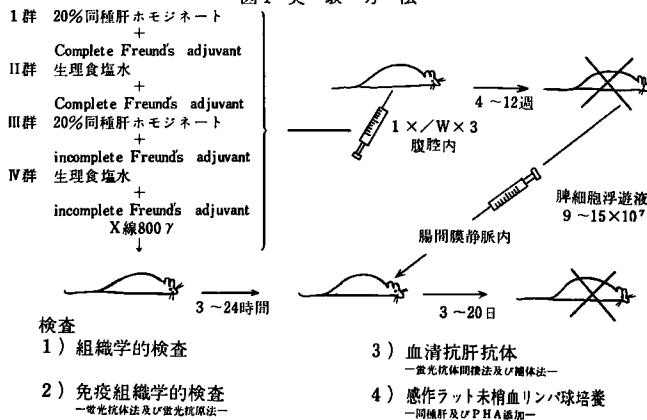
実験材料と方法

図1の如く、ラットを4群に分け感作を行ない、4ないし12週後に屠殺し、その肝臓と脾臓についての組織学的、ならびに免疫組織学的検索、および血清抗肝抗体の検索を行ない、また一部のラットについては肝抗原添加による末梢血リンパ球の invitro blast-like transformation の検討を行なった。更に、屠殺したラットより脾細胞を得て、これをあらかじめレントゲン線照射した他のラットへ経門脈的に移入し、一定時間後に屠殺し、肝臓と脾臓の組織学的ならびに免疫組織学的検索、および血清抗肝抗体の検索を実施した。以下に実験の詳細について記載する。

1. 実験動物

体重150 g 前後の Sprague-daw-

図1 実験方法



ley 系雄性ラットを使用した。

2. 肝ホモジネートの作製

股動脈より可及的に脱血したのち断頭して屠殺したラットの肝臓を無菌的に取り出し、生理的食塩水中で細切し、可及的に血球成分を除いたのち、湿重量の4倍量の生理的食塩水を加え、ホモジナイザーで乳化し、5回凍結融解したものを肝ホモジネートとして用いた。

3. 感作方法

ラットを4群に分け、下記の抗原物質を各群につき1回1ml宛、1週間隔で計3回、エーテル浅麻酔下で腹腔内に注入した。

I 群：20%ラット肝ホモジネート0.5ml+

Complete Freund's adjuvant 0.5ml

II 群：生理的食塩水0.5ml+ Complete

Freund's adjuvant 0.5ml

III 群：20%ラット肝ホモジネート0.5ml+

incomplete Freund's adjuvant 0.5ml

IV 群：生理的食塩水0.5ml+ incomplete-

Freund's adjuvant 0.5ml

(adjuvant は Difco 社製のものを使用した。以下、Complete Freund's adjuvant を CFA, incomplete Freund's adjuvant を IFA と略記する。)

4. 脾細胞の移入

脾細胞の分離は Janowsky ら⁹⁾の方法に準じて実施した。すなわち、屠殺後直ちに脾臓を無菌的に取り出し、生理的食塩水中で2本の注射針により細胞を遊離させ、得られた脾細胞浮遊液を2枚のガーゼで濾過し、1,500 r.p.m. 5分間遠沈し、得た沈渣に0.35%食塩水10mlを加えよく混合したのち90秒間放置し、次に5%食塩水1.2mlを加えて1,500 r.p.m. 5分間遠沈した。えられた沈渣に再び0.35%食塩水10mlを加えて溶血を完全に起させ、90秒後に5%食塩水1.2mlを加え、1,500 r.p.m. 5分間遠沈して得た沈渣を1mlの生理的食塩水に浮遊し、2枚のガーゼで濾過したのち、これを注射器に移し、可及的速やかに、あらかじめレントゲン線800r 全身照射し、エーテル浅麻酔下で無菌的に開腹したラット腸間膜静脈内にゆっくり注入したのち閉腹した。なお、最終的に得られた脾細胞浮遊液を0.1%エオジン液による超生体染色を行なったのち算定した結果、一匹のラットより 9×10^7 ないし 1.5×10^8 の生きた脾細胞を得た。

5. 検索方法

1) 組織学的検索

肝臓と脾臓を Carnoy 氏固定のうち、型の如く Hematoxylin-Eosin 染色、ならびに Methylgreen-Pyronin 染色を施し観察した。

2) 蛍光抗体法

(a) 抗ラット γ グロブリン蛍光標識抗体液の作製：正常ラットより採取した血清を飽和硫酸アンモニウム液の50%濃度で塩析し、更に同液の34%濃度で塩析を3回行ない、生理的食塩水で透析し、20mg/ml のラット γ グロブリン溶液を作製し、同量の IFA を加え、water in oil の状態になるまでよく攪拌したものを1回1ml宛1週間隔で計3回健常白色家兎に筋肉内注射し、最終感作の4週のちに booster 注射し、4日後に全採血し Ouchterlony 氏法による抗体価1:50の免疫血清を得た。この血清を飽和硫酸アンモニウム液の50%濃度で塩析し、0.005 M phosphate buffer saline (PBS pH 7.2) にて透析して得た γ グロブリンに0.5 M Carbonate bicarbonate buffer pH 9.5) を使用して、タンパク質：色素が80:1の割合で fluorescein isothiocyanate (BBL 社) を加え6時間攪拌したのち、sephadex-G-25 Column で遊離色素を除去し、次いで非特異染色物質除去の目的で DEAE Column chromatography を用いて0.005 M PBS (pH 7.2) で蛍光標識抗体液を溶出し、F/P ratio 1.5—2.0のものを-20℃にて凍結保存し、用に臨んで rabbit liver acetone powder で吸収したのち12,000 r.p.m. 30分間遠沈して使用した。

(b) 抗モルモット補体蛍光標識抗体液の作製：モルモット乾燥補体(東芝化学工業株式会社)をグリーン氏液にて溶解し、飽和硫酸アンモニウム液の50%濃度で塩析したのち、同液の34%濃度で塩析し、生理的食塩水でよく透析し粗グロブリン分画を得た。この100mgを IFA と混じって1週間隔で計4回健常白色家兎に筋肉内注射し、最終感作後15日目に booster 注射し、4日後に全採血し、Ouchterlony 法による抗体価1:32の免疫血清を得た。この血清を(a)と同様の方法により fluorescein isothiocyanate と conjugate した。

(c) 蛍光抗体直接法による肝臓と脾臓組織内 γ グロブリンの検索：肝臓と脾臓の小组織片を dry ice と acetone により-70℃に冷却しておいた isopentane 中で急速凍結したのち-20℃の deep freezer に保

存したものから厚さ 6μ の Cryostat 凍結切片を作製し、直ちによく乾燥させたのち、冷アセトンで固定し、PBS (pH 7.2) で洗い、抗ラット γ グロブリン蛍光標識抗体液 1 滴を切片上加え、 37°C 湿潤室中で 30 分間染色したのち、PBS でよく洗い、10% グリセリン緩衝液で封入し、蛍光顕微鏡 F (NIKON) で観察した。

(d) 蛍光抗体間接法による血清抗肝抗体の検索：正常ラット肝より(c)で述べた方法により凍結切片を作り、冷アセトンで固定したのち PBS で洗い、被検血清 1 滴を切片上加え 37°C 湿潤室中で 30 分間反応させ、そのあと PBS で洗い、次いで抗ラット γ グロブリン蛍光標識抗体液を 1 滴切片上加え、 37°C 湿潤室中で 30 分間染色したのち PBS でよく洗い、10% グリセリン緩衝液で封入し、蛍光顕微鏡 F で観察した。

(e) 蛍光抗体補体法による血清抗肝抗体の検索：(c)で述べた方法で作製した切片を冷アセトンで固定し PBS で洗い、30 分間 56°C に加温し非働化した被検血清 1 滴と 2 倍に希釈したモルモット血清（乾燥補体をグリーン氏液にて溶解したもの）1 滴を切片上加え、 37°C 湿潤室中で 30 分間反応させ、その後 PBS にてよく洗ったのち、抗モルモット補体蛍光標識抗体液 1 滴を切片上加え、 37°C 湿潤室中で 30 分間染色し、PBS でよく洗ったのち 10% グリセリン緩衝液で封入して蛍光顕微鏡 F で観察した。

3) 蛍光抗原法

(a) 蛍光標識抗原液の作製：2 に記した方法で作製した凍結融解後の肝ラットホモジネートを 12,000 r.p.m. 30 分間遠沈して得た上清をタンパク質濃度 1 g/dl にしたのち、2(a)に記した方法により fluorescein isothiocyanate を conjugate し、sephadex-G-25 Column で遊離色素を除去し、更に rabbit liver acetone powder および正常ラット脾細胞で吸収したのち、12,000 r.p.m. 30 分間遠沈して得られた上清を蛍光標識抗原液として使用した。

(b) 蛍光抗原法による肝および脾組織内抗肝抗体の検索：2(c)で述べた方法により作製した肝臓と脾臓の凍結切片を冷アセトンで固定したのち、PBS でよく洗い、蛍光標識抗原液 1 滴を切片上加え、 37°C

湿潤室中で 30 分間染色し、そのあと PBS でよく洗ったのち、10% グリセリン緩衝液で封入して蛍光顕微鏡下で観察した。

4) 感作ラット末梢血リンパ球の blast-like transformation

(a) リンパ球の分離：I 群、および II 群のラットより、ヘパリン 1 ml を入れた注射器で無菌的に心穿刺して 5 ml の血液を採取し、以下 Coulson らの方法¹⁰⁾によりリンパ球を分離した。すなわち、得られた血液を 3% ゲラチン液 2 ml と混じって試験管に入れ、 37°C の恒温室中で 30 分間垂直に保持して、上清の灰白色の層を取り、これを Hank 氏液 (pH 7.4) にて 3 回洗ったのち 1,500 r.p.m. 5 分間遠沈して得られた沈渣を細胞数 $1 \times 10^6/\text{ml}$ になるように培養液中に浮遊させた。得られた細胞の 90% 以上はリンパ球であり、トリパン青による超生体染色の結果、95% 以上の細胞は生きていることを証明した。

(b) 培養液の作製：Eagle 氏液 2 ml に仔牛血清 0.5 ml を加え、重炭酸ナトリウムにて pH 7.4 に調製し、これにペニシリンナトリウム 200 単位、およびジヒドロストレプトマイシン 100 γ を加えたものを培養液として使用した。

(c) リンパ球の培養：細胞数 $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調製した培養液に 1% ラット肝ホモジネートを 1,500 r.p.m. 5 分間遠沈して得た上清 0.1 ml を加えた試験管に二重キャップを施し、 37°C の恒温室中で 15° の傾斜を保ったまま 72 時間静置培養した。また対照として phytohaemagglutinin (PHA-M Difco 社製) 0.1 ml を加えたもの、および Hank 氏液 0.1 ml を加えたものも同様に培養した。

(d) blast-like cell の観察：培養後 1,000 r.p.m. 5 分間遠沈して細胞を集め塗抹標本を作り、Giemsa 染色を施したのちリンパ球 500 を観察し、そのうち blast-like cell の占める率を算出した。

実験成績

表 1 に各群の組織学的、ならびに免疫学的所見を示し、各群の組織変化の頻度を表 2、および表 3 に示した。

表 1—①

実験群	動物番号	最終感受作後週	肝組織像			脾組織像		蛍光抗体直接法							蛍光抗原法							血清抗肝抗体								
			円形細胞浸潤	グ鞘類	肝細胞壊死	星細胞反応	リンパ濾胞肥大	髓索細胞反応	肝					脾		肝					脾		蛍光抗体間接法	蛍光抗体補体法						
									グ鞘浸潤細胞	類洞	壊死巣	星細胞	リンパ濾胞	髓索細胞	グ鞘浸潤細胞	類洞	壊死巣	星細胞	リンパ濾胞	髓索細胞										
I	IR 101	4	+	±	#	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	IR 102	4	±	±	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IR 103	4	±	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IR 104	4	#	±	+	+	±	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	IR 105	4	#	±	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	IR 106	4	卅	±	+	-	±	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
	IR 107	4	±	±	+	-	+	±	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
	IR 108	4	±	±	-	-	+	±	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
	IR 109	4	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IR 110	7	#	+	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	IR 111	7	-	±	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IR 112	7	±	±	+	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IR 113	9	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IR 114	9	±	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IR 115	9	-	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IR 116	12	卅	#	#	±	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 117	12	#	#	#	±	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	IR 118	12	±	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 119	5	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	IR 120	5	-	-	+	-	+	#	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	IR 121	5	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	IR 122	5	#	+	+	±	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 123	5	+	-	-	-	+	±	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 124	4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	IR 125	4	+	#	±	±	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 126	4	-	-	-	±	±	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	IR 127	4	+	±	+	±	±	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
	IR 128	4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
IR 129	4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
IR 130	4	±	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
IR 131	4	#	+	#	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
IR 132	4	+	-	+	±	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IR 133	4	#	±	#	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
IR 134	4	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	
IR 135	4	±	-	±	-	±	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IR 136	4	±	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
IR 137	4	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	
IR 138	4	#	+	+	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IR 139	4	+	±	±	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
IR 140	4	±	±	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	
IR 141	4	-	-	±	-	±	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IR 142	4	-	-	-	-	±	±	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	

実験群	動物番号	最終感作後週	肝組織像		脾組織像		蛍光抗体直接法						蛍光抗原法						血清抗肝抗体			
			円形細胞浸潤	肝細胞壊死	星細胞反応	リンパ濾胞肥大	髄索細胞反応	肝				リンパ濾胞	髄索細胞	肝				リンパ濾胞	髄索細胞	蛍光抗体間接法	蛍光抗体補本法	
								グ鞘浸潤細胞	類洞	壊死果	星細胞			グ鞘浸潤細胞	類洞	壊死果	星細胞					
																						グ鞘結核
I	IR 143	4	±	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 144	4	-	±	-	±	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 145	4	≠	≠	+	±	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	IR 146	4	+	+	-	±	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 147	4	±	+	-	±	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 148	4	±	±	-	±	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 149	5	±	±	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 150	5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 151	5	≠	≠	≠	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	IR 152	5	+	±	-	-	+	+	±	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	IR 153	4	+	+	+	+	±	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	IR 154	5	≠	+	+	±	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 155	5	±	±	±	±	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
	IR 156	5	≠	+	+	±	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
	IR 157	5	+	≠	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 158	4	±	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 159	4	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
IR 160	4	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
IR 161	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
IR 162	4	-	-	±	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
IR 163	4	±	+	+	±	+	±	±	±	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
IR 164	4	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
II	IR 201	4	+	±	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 202	4	≠	+	≠	±	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 203	4	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 204	4	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 205	9	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 206	9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 207	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IR 208	4	+	-	+	-	+	-	-	-												

表 1—④

実験群	動物番号	最終感作後週	肝組織像				脾組織像		蛍光抗体直接法								蛍光抗原法								血清抗肝抗体	
			円形細胞浸潤		肝細胞壊死	星細胞反応	リンパ濾胞肥大	髄索細胞反応	肝					脾		肝					脾		蛍光抗体間接法	蛍光抗体補体法		
			グ鞘	類洞					グ鞘浸潤細胞	類洞浸潤細胞	壊死果	星細胞	リンパ濾胞	髄索細胞	グ鞘結核	類洞壁	グ鞘浸潤細胞	類洞浸潤細胞	壊死果	星細胞	リンパ濾胞	髄索細胞				
Ⅲ	IR 319	4	+	+	+	+	+	+																		
	IR 320	5	—	—	—	—	—	—																		
	IR 321	5	—	—	—	—	—	—																		
	IR 322	5	+	±	±	±	+	±																		
	IR 323	5	±	—	±	—	—	—																		
	IR 324	5	—	—	—	—	—	+	—																	
	IR 325	5	—	—	—	—	—	—																		
Ⅳ	IR 401	4	—	—	—	—	+	—																		
	IR 402	4	—	—	—	—	+	—																		
	IR 403	4	—	—	—	—	+	—																		
	IR 404	4	—	—	—	—	±	±																		
	IR 405	4	—	±	±	±	±	+																		
	IR 406	4	+	+	±	+	+	+																		
	IR 407	4	±	+	±	±	±	+																		
	IR 408	4	±	+	—	±	—	+																		
	IR 409	4	—	—	—	—	+	—																		
	IR 410	4	—	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
	IR 411	4	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—
	IR 412	4	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	IR 413	4	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	IR 414	4	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
	IR 415	4	—	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—
	IR 416	4	±	—	+	—	+	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	IR 417	4	±	±	—	—	+	—																		
	IR 418	4	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
	IR 419	4	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
	IR 420	4	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
	IR 421	4	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
	IR 422	4	+	±	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
	IR 423	5	—	—	—	—	±	+																		
	IR 424	5	—	—	—	—	—	—																		
	IR 425	5	—	—	—	—	±	+																		
	IR 426	5	—	—	±	—	+	+																		
	IR 427	5	±	—	—	—	—	+	+																	
	IR 428	5	±	—	±	—	—	+	+																	
	TR 112	3	—	—	—	—																				
	TR 114	13	—	—	—	—																				
	TR 115	14	—	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+			
	TR 116	3	—	—	—	—	+	+																		
	TR 117	20	—	+	+	±	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
	TR 118	20	#	#	#	±	+	—	+	+	—	—	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—			
	TR 102	6	—	—	—	—	+	+																		
	TR 119	7	—	—	—	—	+	+																		
	TR 124	4	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—

表—1—⑥

実験群	動物番号	脾細胞移行後日数	肝組織像				脾組織像		蛍光抗体直接法								蛍光抗原法						血清抗肝抗体				
			円形細胞浸潤	肝細胞壊死	星細胞反応	リンパ濾胞萎縮	髄索細胞減少	肝					脾			肝					脾		蛍光抗体間接法	蛍光抗体補体法			
								グ鞘結核	類洞壁	グ鞘浸潤細胞	類洞浸潤細胞	壊死果	星細胞	リンパ濾胞	髄索細胞	グ鞘結核	類洞壁	グ鞘浸潤細胞	類洞浸潤細胞	壊死果	星細胞	リンパ濾胞			髄索細胞		
B	TR 242	4	±	±	—	—	—	—																			
C	TR 309	4	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+										—	—
	TR 310	4	±	±	±	—	+	+	+	+	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	TR 311	4	—	±	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+									—	—	
	TR 313	4	—	—	—	—	+	+	+																—	—	
	TR 314	4	—	—	—	—	+	+																	—	—	
	TR 315	4	+	+	+	+	—	—																	—	—	
	TR 316	4	±	±	±	+	±	+	—	+	—	—	+	—	+										—	—	
	TR 317	4	+	+	+	+	—	—																	—	—	
	TR 318	4	±	±	±	+	—	—	+	+	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	TR 319	4	±	±	+	+	—	—	+	+	—	—	+	—	—	+								+	—	—	
	TR 320	4	±	+	+	+	+	—																			
	TR 323	4	—	—	—	—	+	+																			
	TR 324	4	—	+	—	—	+	±																			
D	TR 405	4	+	+	±	+	—	+																	—	—	
	TR 406	4	±	+	+	+	+	+																	—	—	
	TR 408	4	—	±	—	—	+	—	+	+	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	
	TR 409	4	±	+	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	TR 411	4	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	
	TR 413	4	—	±	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	
	TR 414	4	+	±	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	
	TR 416	4	—	+	+	—	±	+	+	+	—	—	+	—	+								+	—	—	—	
	TR 417	4	±	±	±	—	—	—																			
	TR 419	4	—	—	—	—	—	—																			
	TR 421	4	—	—	—	—	—	—																			
	TR 422	4	+	±	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	TR 425	4	±	±	—	—																					
	TR 427	4	—	—			±	—																			

表2 感作ラットの肝脾組織所見

実 験 群	検 索 例 数	肝										脾					
		グリソン氏鞘内 細胞浸潤				類洞内細胞 浸潤			肝細胞壊死			星細胞 反応		濾胞 肥大		髄索細胞 反応	
		冊	冊	+	±	冊	+	±	冊	+	±	+	±	+	±	+	±
I (L+CFA)	64	2	12	15	18	5	14	22	7	24	8	11	16	27	12	24	7
II (P. S+CFA)	51	0	2	10	9	0	5	10	1	11	6	3	2	19	6	12	6
III (L+IFA)	25	0	0	3	4	0	5	4	0	6	5	1	3	9	5	7	6
IV (P. S+IFA)	28	0	0	3	6	0	5	3	0	4	4	2	3	14	5	12	1

表3 脾細胞移入ラットの肝脾組織所見

実 験 群	検 索 例 数	肝										脾					
		グリソン氏鞘内 細胞浸潤				類 洞 内 細胞浸潤			肝細胞壊死			星細胞 反 応		リンパ濾 胞萎縮		髄索細胞 減少	
		冊	冊	+	±	冊	+	±	冊	+	±	+	±	±	±	+	±
A	31	1	2	3	4	2	6	3	2(2)	9(1)	1	6	7	25	1	21	1
B	23	0	0	2	1	0	4	2	0	1	1	0	2	14	1	13	1
C	13	0	3	2	2	3	4	2	2(1)	4	1	6	0	8	1	7	1
D	14	0	0	3	4	0	4	6	1	4	1	2	0	4	2	5	0

() 内は piecemeal necrosis

1. 感作実験

a) 組織学的検索：肝組織変化についてみると、I 群においてグリソン氏鞘内、ならびに類洞内の円形細胞浸潤、肝細胞の巣状壊死および星細胞の反応が他群に比して著明に認められた（図2）。64例中2例においては、芽中心こそ認められないが、中心にピロニン好性の大型の細胞を含むリンパ濾胞様円形細胞集簇をグリソン氏鞘内に認めた（図3図4）。浸潤細胞は主として門脈枝周辺に認められ、多くはリンパ球様細胞であり、その他ピロニン好性細胞もかなり観察されたが、好中球、好酸球はほとんど見られなかった（図5）。また、細胞浸潤の著明な例においては、肝細胞壊死、ならびに星細胞反応も顕著であり、各組織変化には互に関連があるように思われる。肝細胞の壊死は小さく、リンパ球、組織球などの浸潤を伴ない、ヒト肝炎において認められる spätknötschen (Büchner¹¹⁾) に類似している。piecemeal necrosis (Popper¹²⁾) あるいは massive ないし submassive necrosis は全く認められなかった。星細胞反応としては動員像が認められ、肥大像や喰食像はほとんどみられなかった。II 群においてもI 群より軽度であるが、III 群、IV 群に比すとかなり顕著な組織変化が認められた。脾臓は一般にリンパ濾胞が肥大し髄索細胞も増加の傾向が認められたが、各群の間に有意の差は認められず、また個々の例についても肝組織変化との間に有意の相関は認められなかった。

表4 リンパ球の Blast-like transformation と肝組織所見

動物番号	Blast-like cell (%)			グ鞘細胞浸潤	類洞内細胞浸潤	肝細胞壊死	星細胞反応
	肝抗原	PHA	対照				
IR 151	0.2	21.0	0.2	冊	冊	冊	+
IR 153	1.0	38.5	0	+	+	+	+
IR 154	1.8	22.6	0	冊	+	+	±
IR 155	1.4	11.6	0	±	±	±	±
IR 156	0.8	10.2	0	冊	+	+	±
IR 157	3.0	14.4	0	+	冊	+	+
IR 158	0.8	14.6	0	±	—	+	—
IR 159	0.2	28.0	0	+	+	±	±
IR 160	4.4	13.6	0.2	+	+	+	±
IR 161	0.6	11.6	0	—	—	—	—
IR 162	3.2	7.2	0	—	—	±	—
IR 163	2.0	14.6	0	±	+	+	±
IR 164	1.6	9.4	0	—	—	±	—
IR 238	0		0.2	+	+	+	+
IR 239	0	11.8	0	—	—	—	—
IR 240	0	12.8	0	冊	+	+	+
IR 241	0.4	2.6	0.6	—	—	—	—
IR 242	0	4.6	0	+	+	±	+
IR 245	0	7.4	0	±	—	—	—
IR 246	0	9.0	0	—	—	—	—
IR 247	0	13.8	0	—	—	±	—
IR 248	0.4	19.0	0	—	—	—	—
IR 249	0.6	7.2	0.8				
IR 250	0.2	3.2	0	±	±	±	—
IR 251	0	7.8	0	—	—	—	—

b) 免疫組織学的検索

(i) 蛍光抗体直接法による組織内γ グロブリン局在の検索：肝においては各群ともグリソン氏鞘内、ならびに類洞壁に多くγ グロブリンが認められた（図6）。I 群のうち6例にはグリソン氏鞘内浸潤細胞が4例には類洞浸潤細胞が特異蛍光陽性所見を示し、またI 群の3例とIII 群のI 例においては星細胞内に

も γ グロブリンが認められた。その他、各群において少数例では肝細胞壊死巣にも特異蛍光が観察された。しかし、各組織変化の著明な例に必ずしも特異蛍光が認められず、細胞浸潤、肝細胞壊死、ならびに星細胞反応の軽度な例においても特異蛍光が各部位に強く認められるものがあった。脾臓ではリンパ濾胞周辺、髄索細胞に多く γ グロブリンが認められたが、各群の間に有意の差は認められなかった。また、個々の例についてみても、リンパ濾胞肥大、および髄索細胞反応の程度とは関係なく、肝臓の所見との間にも一定の相関々係を認めなかった。

(III) 蛍光抗原法による、いわゆる抗肝抗体局在の検索：肝臓では主として、類洞内浸潤細胞に特異蛍光が認められ、その他類洞壁、星細胞、グリソン氏鞘内浸潤細胞、およびグリソン氏鞘結合織に少数例において特異蛍光が認められた(図7)。それらはI群において他群より高頻度に認められたが、特異蛍光陽性の類洞浸潤細胞は全体の浸潤細胞のうちの極く少数であった。また肝細胞壊死巣には全く特異蛍光が認められなかった。個々の例についてみると、これらの成績と蛍光抗体直接法による γ グロブリン局在との間に一定の相関が認められず、肝組織変化の程度とも関連がなかった。脾臓においては各群とも主として周辺赤髄の細胞に多く特異蛍光が認められたが、一部の例ではリンパ濾胞にも特異蛍光が認められるものがあった。しかし、それらは蛍光抗体法の所見とは関係なく、脾組織変化との程度、ならびに肝臓のいわゆる抗肝抗体局在との間にも相関はみられなかった。

c) 血清抗肝抗体：I群の検索例31例のうち、蛍光抗体間接法により8例に、蛍光抗体補体法により9例に抗肝抗体を証明した(図8図9)。そのうち5例では両法により証明されたが、蛍光抗体間接法のみで認められたものが3例、蛍光抗体補体法のみで証明されたものが4例あった。血清抗肝抗体と肝、脾組織変化、肝、脾組織内 γ グロブリン、ならびに蛍光抗原法で認められた組織内抗肝抗体との間には一定の相関は認められなかった。II群では23例中1例のみに蛍光抗体間接法により抗肝抗体を認めたがIII群、IV群では全例において抗肝抗体は認められなかった。

d) 肝抗原添加培養によるリンパ球の in vitro blast-like transformation：I群、およびII群について検索した成績は表4の通りである。I群13例についてみると、肝抗原添加培養により0.2%ないし

4.4%の blast-like cell の出現を認め(図10)、II群の場合0ないし0.6%であるのに比較すると有意の差を示した。PHA添加培養では両群の間に有意の差が認められなかった。次に個々の例についてみると、blast-like cell の出現率と肝、脾組織変化との間には一定の相関々係が認められなかった。

2. 脾細胞移入実験

I, II, III, およびIV群を屠殺後、脾細胞を移入したラットをそれぞれA, B, C, およびD群とし例えばIR 110より移入したものをTR 110, IR 405より移入したものをTR 405と記載した。

a) 組織学的検索：A群において、グリソン氏鞘、ならびに類洞内の円形細胞浸潤、肝細胞壊死、ならびに星細胞反応が、B群に比較して高頻度かつ高度に認められた。31例中2例においては著明な piecemeal necrosis が観察され、focal necrosis も数多く認められた(図11図12図13)。星細胞の動員像も認められたが、肥大像や喰食像はみられなかった。C群においても、B群、D群に比較して組織変化は強く、13例中1例に顕著な piecemeal necrosis が認められた。しかし、これら recipient の組織変化と donor のそれとの間には一定の相関がみられなかった。脾臓は各群ともレントゲン照射によるリンパ濾胞萎縮、ならびに髄索細胞の減少傾向がみられたが、肝組織変化との間に一定の相関がみられなかった。

b) 免疫組織学的検索

(i) 蛍光抗体直接法による組織内 γ グロブリン局在の検索：肝においては各群とも、グリソン氏鞘、類洞壁に γ グロブリンが観察される例が多く、グリソン氏鞘、ならびに類洞内浸潤細胞、肝細胞壊死巣、および星細胞に γ グロブリンが認められたものも少数あった(図14)。肝細胞壊死巣には著明な特異蛍光が認められたが(図15)、細胞浸潤の著明な例において必ずしも浸潤細胞に特異蛍光は認められなかった。脾臓においては各群ともリンパ濾胞、ならびに髄索細胞に γ グロブリンが認められる例が多かった。しかし、これら肝臓、脾臓の所見は各群の間に有意の差はみられなかった。

(II) 蛍光抗原法による抗肝抗体局在の検索：各群とも肝臓では類洞壁、ならびに類洞内浸潤細胞に、脾臓では髄索細胞に特異蛍光が観察されたものが少数例あったが、各群の間に有意の差は認められなかった。また、肝、脾組織変化、ならびに γ グロブリン局在との間にも一定の相関はみられなかった。

(Ⅳ) 血清抗肝抗体：A群16例，B群12例，C群10例およびD群10例について検索した結果全例において蛍光抗体間接法，ならびに蛍光抗体補体法において血清抗肝抗体は証明されなかった。

考 按

近年，肝疾患における免疫学はオーストラリア抗原（Au 抗原）に関する問題も含めて急速の進歩を遂げており，現在血清学的には高 γ グロブリン血症，抗胆管細胞質抗体¹³⁾，¹⁴⁾抗肝細胞質抗体¹⁴⁾，¹⁵⁾抗核抗体¹³⁾，¹⁴⁾，¹⁶⁾抗平滑筋抗体¹⁷⁾，抗胃壁細胞抗体¹⁸⁾，抗糸球体抗体¹⁸⁾ならびにリウマチ因子などの諸種のいわゆる自己抗体の出現が証明され，組織学的には間質にリンパ球，ならびに形質細胞の浸潤がみられ，時にグリソン氏鞘内に芽中心を有するリンパ濾胞がみられるなど，他の自己免疫疾患類似の組織像が認められている²⁰⁾。また，糖質コルチコイド，6-MP，ならびに azathiopurine が治療薬として有効な例が多く¹⁹⁾，²⁰⁾，²¹⁾これらのことから肝疾患のある種のもを自己免疫疾患として把握しようとする動きはある程度当を得ているものと云えよう。しかし，多彩な自己免疫現象を認めても，真に自己免疫疾患であることを証明するためには自己または同種の組織抗原で感作することにより，ヒト疾患と類似の病変を動物実験的に作製する必要がある。

この目的のために行なった著者の実験では，Complete Freund's adjuvant（CFA）加同種肝ホモジネートで腹腔内感作することにより，CFAと生理的食塩水で感作した対照群に比し，肝臓におけるグリソン氏鞘内，ならびに類洞内の円形細胞浸潤，肝細胞壊死，および星細胞の反応が著明に認められた。しかし，incomplete Freund's adjuvant（IFA）を使用した場合には，肝組織変化はCFAと生理的食塩水で感作した群よりもさらに軽度で，対照群との間に有意の差がみられず，CFA中に含まれる mycobacterium の働きが重要な役割を演じていることが強く示唆された。

現在，adjuvant の免疫増感作用としては，抗原を water in oil の状態にすることにより抗原注射部位からの遊離を緩慢にし，特異抗体増加を助長すること，および尾首越²²⁾の主張するごとく adjuvant によるリンパ球の非特異的増殖作用が知られている。しかし，遅延型アレルギー反応における adjuvant の作用についてはなお不明な点が多く，経験的に実験的甲状腺炎²³⁾，実験的脳脊髄炎²⁴⁾などの作製実験に

において IFA の使用では成功せず，CFA を必要とするところから，自己免疫ないし異常免疫のための forbidden clone の産生促進作用が推察されている。

さて，今回の CFA と肝抗原で感作した場合の多くの実験例では肝グリソン氏鞘内における血管周囲性円形細胞浸潤が認められ，少数例にはリンパ濾胞様構造さえみられた。これら浸潤細胞の意義づけとしては，注入された肝抗原や adjuvant がグリソン氏鞘に達し，その刺激により血管から浸出したもの，あるいは同時に認められる巣状壊死に続く二次的現象，すなわち単なる炎症に基づいたものなどが考えられるが，今回の成績の場合，芽中心こそ認められないがリンパ濾胞様構造の中にかなり大型の幼若細胞が観察されたことより，木原の云うごとく²⁵⁾肝臓がリンパ球産生予備組織としての働きを有し，抗原刺激による個体の免疫学的反応として局所の細網細胞が分化したことも考えられる。さらに，小坂，太田ら²⁶⁾はヒトの慢性化したウイルス性肝炎例において，グリソン氏鞘内に明らかな芽中心をもつリンパ濾胞が観察される症例があるところから，濾胞性肝炎なる病名を提唱し，自己免疫現象の組織表現の一つであると報告しているが，その理念は Mackay ら²⁷⁾の主張する autoimmune hepatitis のそれと軌を一にするものであり，細胞性抗体を重視した考えである。その後，教室の太田，竹原²⁸⁾は H^3 -tritiated thymidine による肝組織の in vitro autoradiography により，グリソン氏鞘内にリンパ球の増殖像が認められるという成績を報告している。この増殖像を，直ちに肝抗原による刺激で起る局所の immunocyte の増殖像と解するにはまだ問題があるが，近年個体が特定の抗原に対して感作状態にある時，その個体の末梢リンパ球を特定の抗原を加えて培養することにより，リンパ球の blast-like transformation が起ることが知られており，このことをさきの autoradiography の成績と併せ考えると興味深く，immunologically competent cell から immunologically performing cell への移行現象として把握できよう。

また，活動型の慢性肝疾患患者の末梢血リンパ球の肝抗原添加培養により，blast-like transformation が起ることが証明されているが，著者もこれにヒントを得て，感作ラットの末梢リンパ球に肝抗原を添加して培養した。CFA と肝抗原で感作した群では blast-like cell の出現率は低いながらも，対照群との間に有意の差を認め，感作ラット末梢血リ

ンパ球のうちに CFA 中の mycobacterium 以外の肝抗原に対する immunologically competent cell が含まれていることを証明した。

この成績に関するものとして、さきに Tobias²⁹⁾ はヒトの chronic active hepatitis の 2 例中 1 例、および primary biliary cirrhosis の 4 例中 2 例に blast-like transformation を認めており、穴戸ら³⁰⁾は肝における細胞浸潤、肝細胞壊死と blast-like transformation との間かなりの相関があると報告している。また、最近太田、辻ら³¹⁾はリンパ濾胞を有する慢性肝疾患では濾胞を有さない症例に比較して自己肝抗原添加培養により高率の blast-like transformation を認めたと報告している。しかしながら、このリンパ球の blast-like transformation と肝組織所見、とくに円形細胞浸潤に関しては、今回の実験からは一定の相関を見出し得なかった。

一方、血清抗肝抗体については、可溶性タンパク質に対するものと不溶性タンパク質に対するものとの二種類の抗体が知られているが、細胞性抗体についても不溶性タンパク質に対する別の反応様式が考えられないことはない。また、末梢血リンパ球の blast-like transformation から、その個体の特異抗原に対する感作状態を推察できるとしても、肝臓の組織アレルギーが他の免疫臓器に伴う組織変化のみでなく、免疫臓器、すなわちリンパ球産生予備臓器としての肝組織反応も関与していることも著者の実験から考えたい。

また、今回の実験では、肝組織変化と血清抗肝抗体との間には一定の相関を認めていないが、ヒト慢性肝疾患において、肝組織変化と諸種の自己抗体出現との間に相関を認めないという太田ら³²⁾の報告と併せ考えると興味深い。

次に、免疫現象解析のための肝組織内免疫グロブリンの検討については Cohen ら³³⁾により蛍光抗体法による肝組織内 γ グロブリン局在の研究が手掛けられ、ヒト慢性肝炎で間質内に γ グロブリンを含む多数の細胞の出現が証明されており、Popper ら³⁴⁾は局所における抗原抗体複合物により起る piecemeal necrosis と肝疾患の self-perpetuation の機序であると報告している。著者の同種肝による感作実験では、肝内グリソン氏鞘、類洞壁、浸潤細胞、星細胞、ならびに肝細胞壊死巣に γ グロブリンを観察したが、対照群においても類似の所見を得ており、ただ肝抗原と CFA で感作した群では肝組織変化が

強くそれに比例して γ グロブリンも対照群より多く認められるという程度の差のみ認め、個々の例については、組織変化の程度と γ グロブリン局在の程度との間には必ずしも相関がなく、従って局所における γ グロブリンの意義づけはなし得なかった。

次に肝臓の可溶性タンパク質を抗原とした蛍光抗原法の結果では、類洞浸潤細胞、星細胞などに特異蛍光を認めたが、CFA のみで感作した対照群においても特異蛍光が認められる例があり、いわゆる局所の抗肝抗体の解析と意義については今後の問題を残していると考えられる。

さて、Scheiffarth ら^{35) 36) 37)}は感作マウスのリンパ節、ならびに脾細胞の移入、および parabiosis による実験的肝炎の passive transfer に成功しており、autoradiography により donor の細胞が recipient の肝臓内に多く集まることを証明しているが、今回の著者の実験でも CFA 加同種肝ホモジネートで感作したラットの脾細胞の移入により対照群に比して著明な細胞浸潤、肝細胞壊死、ならびに星細胞反応を認め、31例中 2 例においては顕著な piecemeal necrosis ならびに focal necrosis を認めた。また IFA 加同種肝ホモジネートで感作したラットの脾細胞移入によっても、対照群に比べて著明な組織変化を認め、13例中 1 例に顕著な piecemeal necrosis と focal necrosis がみられたことから、IFA 加同種肝ホモジネートによる感作では、肝組織の変化は軽度にしかなかったが、脾臓内には肝抗原で感作された clone が出現することも考えられる。なお尾首越³⁸⁾は家兎に同種リンパ節細胞を経静脈的に注入することにより、肝グリソン氏鞘、ならびに類洞内に顕著なリンパ球の集簇を来すと報告しているが、著者の実験では移入細胞が少ないためか、グリソン氏鞘におけるリンパ球の著明な塊状集簇はみられなかった。

以上のことから、肝疾患においてみられるグリソン氏鞘の lymphoid focus ならびに piecemeal necrosis が自己免疫現象の組織表現であろうという想定が或る程度動物実験的に裏付けられたと考えられる。今回は、実験的アレルギー性肝炎のみを問題にし、肝炎ウイルスそのものや薬物などとの関係はとりあげなかったが、最近辻ら³⁹⁾が、B 型肝炎の病原性ウイルスそのものか、ないしはウイルスに極めて密接な関連を持つオーストラリア抗原 (Au 抗原) を用いて、蛍光標識精製 Au 抗原液を調製し、ヒトの慢性ウイルス性肝炎活動型や亜急性肝炎の肝生検

組織を蛍光抗原法を用いて観察し, piecemeal necrosis の部位に浸潤するリンパ球の細胞膜や細胞周囲に deposit 様局在, すなわち特異的 Au 抗体を証明したとの成績を考える時, 著者の使用した肝抗原が同種抗原であり, Au 抗原は iso 抗原の一種と考えられる相違はあっても, その病因論的機序は同じであり, ウイルス性肝炎の遷延化や慢性化などに関連して本実験は興味深いものとする。また最近リンパ球そのものが胸腺由来細胞 (thymus derived lymphocyte : T細胞) と骨髄由来細胞 (bone-marrow derived lymphocyte : B細胞) とに区別され,^{40) 41)} 抗体産生系に二つの path-way が考えられつつあり, 著者の脾細胞分離方法では, 主としてT細胞の分離が考えられるとしてもB細胞も含まれており, かつT細胞, B細胞そのものについても現在多くの問題があるので, この方面の検討については今後の課題として残されよう。

結 論

1. Sprague-dawley 系ラットに Complete Freund's adjuvant (CFA) と共に同種肝ホモジネートを用いて腹腔内感作を行ない, 対照群に比較して著明な肝グリソン氏鞘内, ならびに類洞内の円形細胞浸潤, 肝細胞壊死, および星細胞反応を認めた。64例中2例では, 中にピロニン好性の大型幼若細胞を含むリンパ濾胞様構造が観察された。これらの所見は incomplete Freund's adjuvant (IFA) を使用した際には殆んど認められなかった。

2. CFA 加同種肝ホモジネートで感作したラットの末梢血リンパ球の肝抗原添加培養実験では, 対照群に比較して有意の blast-like transformation

を認めたが, 個々の実験例では肝組織変化と blast-like transformation との間に有意の相関を認めなかった。

3. CFA あるいは IFA と共に同種肝ホモジネートで感作した脾細胞をあらかじめレントゲン線照射したラットに経門脈的に移入することにより, 肝グリソン氏鞘, ならびに類洞内における円形細胞浸潤, 肝細胞壊死, および星細胞反応を認め, 少数例においては piecemeal necrosis を観察した。

4. CFA 加同種肝ホモジネートによる感作では, 蛍光抗体間接法, ならびに蛍光抗体補体法で認められる血清抗肝抗体を32例中8例に証明した。しかし血清抗肝抗体と肝組織変化との間には一定の相関はみられなかった。

5. 感作ラット, ならびに感作脾細胞移入ラットの肝臓と脾臓内の γ グロブリン, および抗肝抗体をそれぞれ蛍光抗体直接法, 蛍光抗原法により検索した結果, 肝組織変化との間には有意の相関を認めず, また対照群においても類似の所見を得た。

6. 以上の実験成績から, ヒト慢性肝炎にみられる肝グリソン氏鞘内の lymphoid focus および piecemeal necrosis が, ヒトの iso 抗原ないしは, 肝炎ウイルスに極めて関連したオートスラリア(Au) 抗原に関する新しい知見を考慮して, 広義のいわゆる自己免疫現象の組織表現であるという推定がある程度裏付けられたと考える。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲下さいました恩師小坂淳夫教授, 終始御指導, 御教示を賜りました教室太田康幸講師, 辻孝夫博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Mackay, I.R., Taft, L.I. and Cowling, D.C. : Lupoid hepatitis. *Lancet* **2**, 1323, 1956.
- 2) Behar, A.J. and Chloe Tal : Experimental liver necrosis produced by the injection of homologous whole liver with adjuvant. *J. Path. & Bact.* **77**, 591, 1959.
- 3) Scheiffarth, F., Warnatz, H. und Niederer, W. : Tiereexperimentielle Untersuchungen zur Pathogenese der chronischen Hepatitis. *Virchows Arch. Path. Anat.* **339**, 358, 1965.
- 4) Norkin, S.N., M.D., Gottlieb, L.S., Md and Zamchek, N., m.d. : Effect of liver homogenate and Freund's adjuvant on guinea pig liver and other organs. *Am. J. Digest. Dis.* **7**, 824, 1962.
- 5) Konrad, H., Soergel and Gilbert H. Friedell : Nonspecific effects of liver extract-adjuvant injection in guineapigs, a morphologic and immunologic study. *J. Lab. and Clin. Med.* **64**, 51, 1964.

- 6) Scheiffarth, F., Warnatz, H. and Schmidt, H.J. : immunological studies on the development of experimental hepatitis in the thymectomized mice. *Int. Arch. Allergy* **32**, 308, 1967.
- 7) 畔柳武雄, 栗栖明, 杉山始, 斉藤昌信 : 実験的アレルギー性肝炎の研究(3). *アレルギー* **13**, 543, 1964.
- 8) 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.
- 9) Janowsky, D.S., Rosenau, W., and Moon, H.D. : Isolation of immunologically competent lymphocytes from sensitized mouse spleens. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **115**, 77, 1964.
- 10) Coulson, A.S. and Chalmes, D.D. : Effects of phytohaemoagglutinin on leucocytes. *Lancet*, **11**, 819, 1964.
- 11) 飯島宗一, 円山英昭 : 肝の病態生理 Kupffer 星細胞の機能異常. 高橋忠雄編, 肝臓. 医学書院, 東京, P. 544, 1971から引用.
- 12) Popper, H., Paronetto, F., and Schaffner, F. : Immune processes in the pathogenesis of liver disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **124**, 780, 1965.
- 13) Paronetto, F., Schaffner, F., Mutter, R.D., Kniffen, J.C. and Popper, H. : Circulating antibodies to bile ductular cells in various liver diseases. *J. Am. Med. Ass.*, **187**, 503, 1964.
- 14) Tsuji, T., Ogawa, K. and Kosaka, K. : An immunofluorescent study of circulating antiliver antibodies in chronic liver diseases. *Acta. Path. Jap.* **15**, 273, 1965.
- 15) Walker, J.G. : Serological test in diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet*, **1**, 827, 1965.
- 16) Bouhier, I.A.D., Rhodes, K. and Scherlock, S. : Serological abnormality in patients with liver diseases. *Brit. J.* **1**, 592, 1964.
- 17) Whithingham, S., Irwin, J., Mackay, I.D. and Smalley, M. : Smooth muscle autoantibody in " autoimmune " hepatitis. *Gastroenterology*, **51**, 499, 1966.
- 18) Whithingham, S., Mackay, I.R., Irwin, J. : Autoimmune hepatitis. *Lancet*, **2**, 1335, 1965.
- 19) 小坂淳夫, 太田康幸 : 肝疾患のステロイド療法. *臨床と研究*, **44**, 1852, 1967.
- 20) 小坂淳夫, 太田康幸ほか : 6-Mercaptopurine による肝疾患の治療効果. *日本臨牀*, **24**, 1174, 1966.
- 21) 太田康幸, 辻孝夫ほか : Imuran による慢性肝疾患の治療. *臨床科学*, **4**, 1435, 1968.
- 22) 尾曾越文亮 : リンパ球の動態, 特に抗原刺激に対する増殖反応. *岡山医学会雑誌*, **78**, 1, 1966.
- 23) Nose, N.R. and Witebsky, E. : Study on organ specificity. V. Changes in the thyroid glands of rabbits following active immunization with rabbit thyroid extract. *J. Immunol.* **74**, 417, 1956.
- 24) Kabat, E.A., Wolf, A. and Berger, A.E. : The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvant. *J. Exp. Med.* **85**, 117, 1947.
- 25) 木原卓三郎 : 血液討論会報告, **6**, 12, 1964.
- 26) 小坂淳夫, 太田康幸ほか : 自己免疫としての組織表現をもつビールス性肝炎——濾胞性肝炎なる病名の提唱——. *肝臓* **6**, 74, 1965.
- 27) Mackay, I.R., Weiden, S., Hansker, J. : Autoimmune hepatitis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **124**, 767, 1965.
- 28) 太田康幸, 竹原謙三 : invitro autoradiography による肝疾患動態の研究, 診断と治療, **57**, 398, 1969.
- 29) Tobias, H., Safran, A.P. and Schaffner, F. : Lymphocyte stimulation and chronic liver disease. *Lancet*, **1**, 193, 1967.
- 30) 穴戸英雄, 奥田正治, 川口尚志 : 肝疾患におけるリンパ球の自己肝抗原添加培養による blastoid cell transformation について. *日本臨牀*, **25**, 2583, 1967.
- 31) 太田康幸, 小林敏成, 辻孝夫ほか : follicular hepatitis と肝における自己免疫機転の組織学的表現. *日本臨牀*, **28**, 238, 1970.

- 32) 太田五六, 若槻寿之助: 慢性肝疾患の肝内間質反応と抗肝抗体. 医学のあゆみ, **62**, 843, 1967.
 - 33) Cohen, S., Ohta, G., Singer, E.J. and Poper, H.: Immunocytochemical studies of gammaglobulin in liver in hepatitis and postnecrotic cirrhosis. *J. Exp. Med.* **111**, 285, 1960.
 - 34) Popper, H., Paronetto, F., Schaffner, F.: Immune process in the pathogenesis of liver disease. *Ann. N.Y. Acad. Science*, **124**, 781, 1965.
 - 35) 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.
 - 36) Warnatz, H., Scheiffarth, F., Wolf, F. and Schmidt, H.J.: Autoradiographic experiments concerning the importance of mononuclear cells in experimental hepatitis. *J. Immunol.* **98**, 402, 1967.
 - 37) Warnatz, H., Scheiffarth, F. und Liebelt, E.: Studien zur Übertragbarkeit der experimentellen Hepatitis im Parabioseversuch. *Zeitschrift für Immunitätsforschung. Allergie und Klinische Immunologie*, **136**, 60, 1968.
 - 38) Bunske, O.: Transplantation of hematopoietic tissue in to the circulating blood. *Anat. Rec.* **107**, 193, 1950.
 - 39) 辻孝夫, 野崎肇: 肝炎の遷延化に関する Au 抗原とその抗体 (体液性抗体と細胞性抗体) とのかかり合いについて, 日消会誌. **70**, 391, 1973.
 - 40) 矢田純一: cell mediated immunity とリンパ球の種類 (T cell, B cell). 臨床免疫, **4**, 303, 1972.
 - 41) 北川正保, 浜岡利之: T細胞とB細胞. 代謝 **9**, 1090, 1972.
 - 42) Lamelin, J.P., Lisowska-Bernstein, B., Matter, A., Ryser, J.E. and Vassalli, P.: Mouse thymus-independent and thymusderived lymphoid cells. 1. immunofluorescent and functional studies. *J. Exp. Med.* **136**, 984, 1972.
-

Histological and Immunological Studies on Experimental Hapatitis in Rat

kanji OKA

The First Department of Internal Medicine Okayama University Medical
School Okayama, Japan (Director : Prof. Kiyowo Kosaka)

ABSTRACT

In an attempt to study auto-immune phenomenon in the course of development of chronic hepatitis, the sensitization with homologous liver and Freund's complete adjuvant as well as the passive transfer of sensitized spleen cells were conducted with rats. As a result it was found that by the sensitization with homologous liver and Freund's complete adjuvant a marked round cell infiltration and the stellate cell reaction were observed in Glisson's capsule and sinusoid of the liver as compared with control group, and with a few cases there was observed lymphoid focus in Glisson's capsule. By the passive transfer of sensitized spleen cells, there could be detected the infiltration of round cells in Glisson's capsule and sinusoid of the liver and in a few cases liver cell necrosis mainly of piecemeal necrosis.

In the subsequent observations on blood anti-liver antibody, intratissue γ -globulin as well as the localization of anti-liver antibody, there could be recognized no significant correlations to the above-mentioned histological changes of liver, but in the culture of sensitized rat peripheral lymphocytes conducted in the presence of liver antigen there was observed a significant blast-like transformation as compared with control group.

From these experimental results with rats it seems that the lymphoid focus and piecemeal necrosis observable in Glisson's capsule of the liver in human liver diseases can also be said fairly safely to be the histological expression of auto-immune phenomenon.

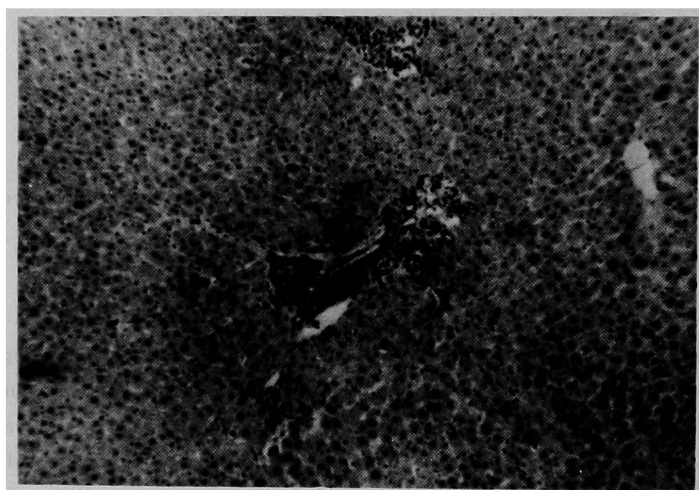


図2．ラットIR 110同種肝ホモジネートとCFAで感作後の肝組織像．グリソン氏鞘ならびに類洞内の円形細胞浸潤，肝細胞壊死，および星細胞動員像がみられる。



図3．ラットIR 116同種肝ホモジネートとCFAで感作後の肝組織像．グリソン氏鞘内にリンパ濾胞様構造をみる。

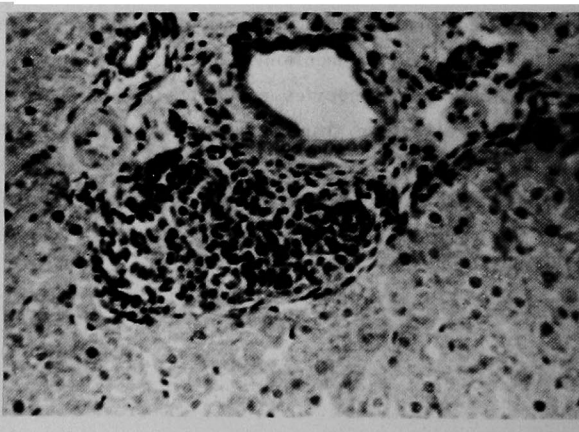


図4．ラットIR 122同種肝ホモジネートとCFAで感作後の肝組織像．グリソン氏鞘内にリンパ濾胞様構造をみる。

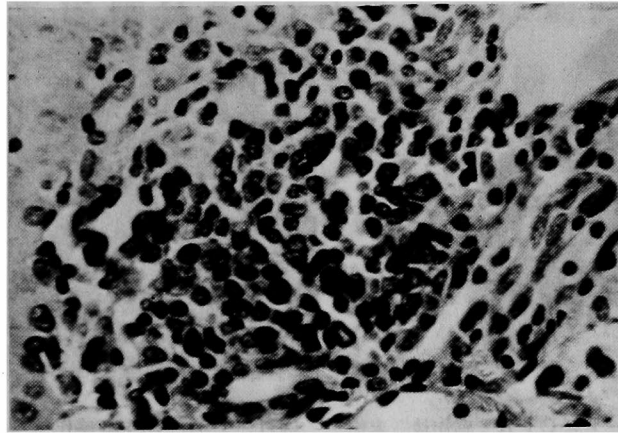


図 5. グリソン氏鞘内リンパ濾胞様構造の拡大像

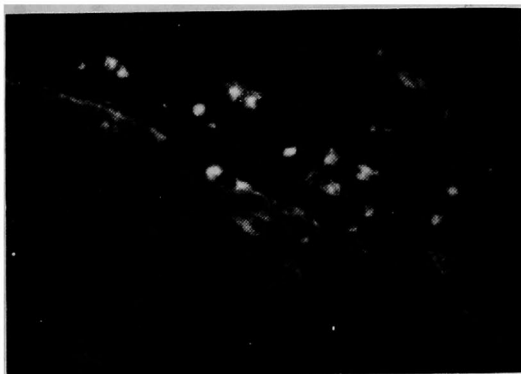


図 6. ラット IR 138 同種肝ホモジネートと CFA で感作後の蛍光抗体直接法による肝内 γ グロブリン. グリソン氏鞘結合組織, 類洞壁, およびグリソン氏鞘浸潤細胞に特異蛍光を認める。

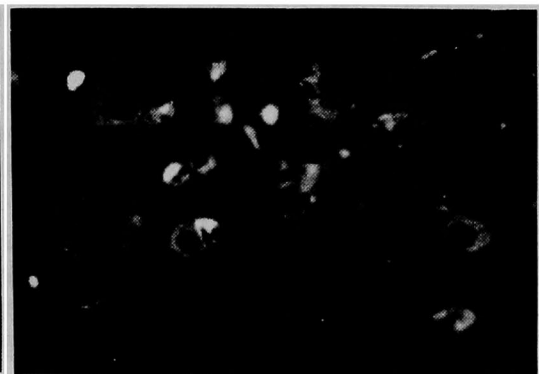


図 7. ラット IR 122 同種肝ホモジネートと CFA で感作後の蛍光抗原法による肝内抗肝抗体. 類洞壁, および類洞内浸潤細胞に特異蛍光を認める。



図 8. ラット IR 106 同種肝ホモジネートと CFA で感作後の蛍光抗体間接法による血清抗肝抗体

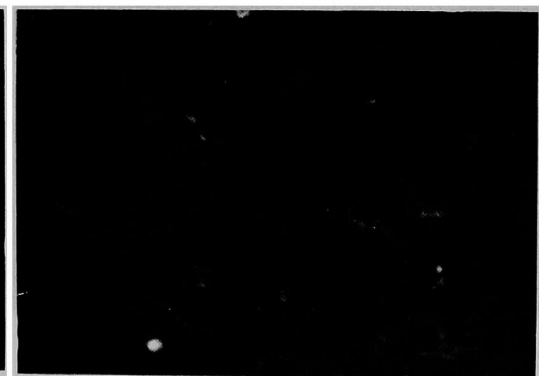


図 9. ラット IR 106 同種肝ホモジネートと CFA で感作後の蛍光抗体補体法による血清抗肝抗体

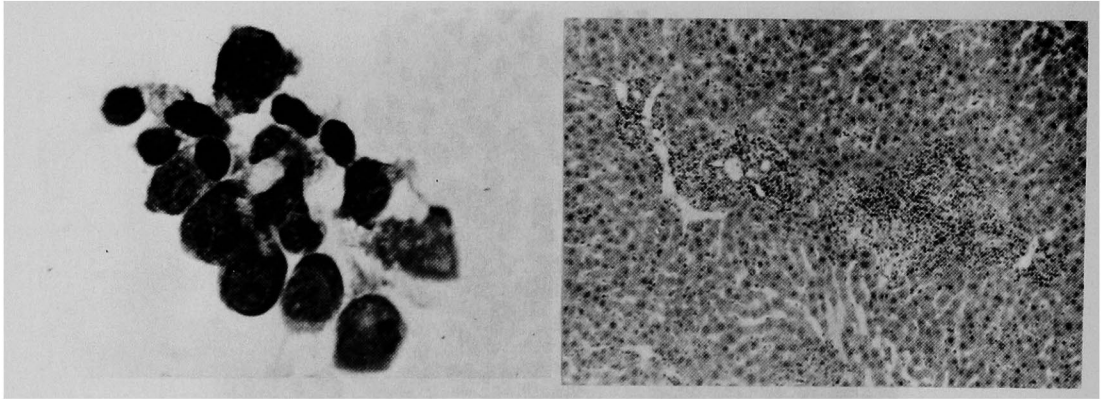


図10. 同種肝ホモネートとCFAで感作後、末梢血リンパ球の肝抗原添加培養にて認められた blast-like cell

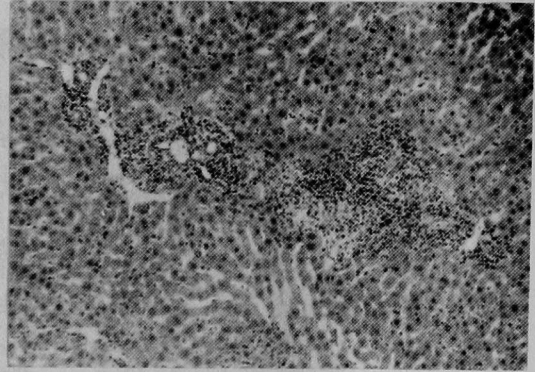


図11. ラット TR 118 感作ラット脾細胞移入後の肝組織像。グリソン氏鞘ならびに類洞内の円形細胞浸潤, piecemeal necrosis および focal necrosis がみられる。

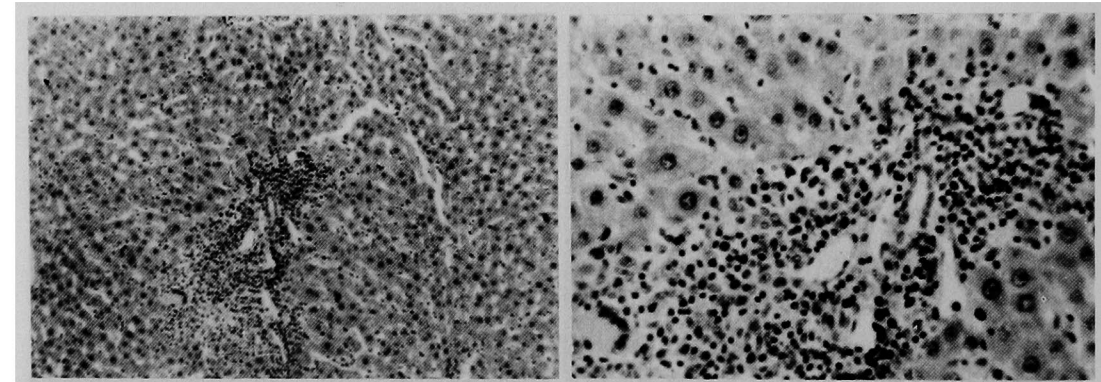


図12. ラット TR 155 感作ラット脾細胞移入後の肝組織像。グリソン氏鞘ならびに類洞内の円形細胞浸潤, piecemeal necrosis がみられる。

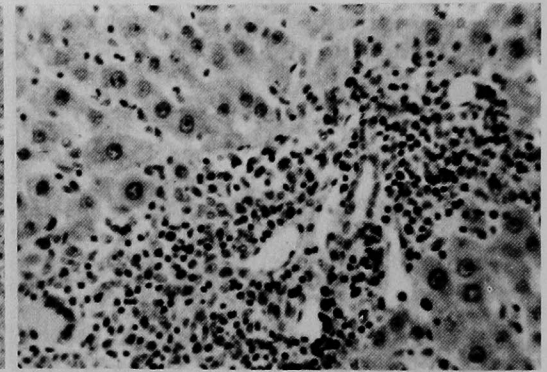


図13. piecemeal necrosis 部の拡大像

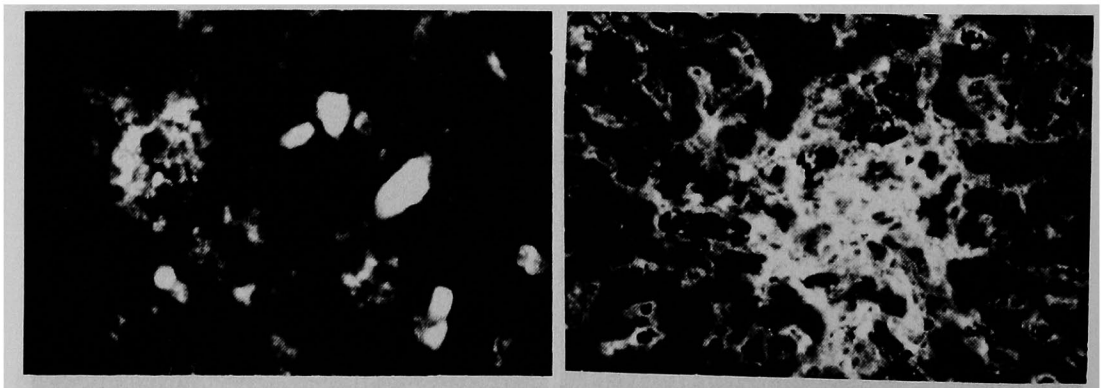


図14. ラット TR118 感作ラット脾細胞移入後の蛍光抗体直接法による肝組織内 γ グロブリン. focal necrosis 部位において浸潤細胞, 星細胞に特異蛍光を認める。

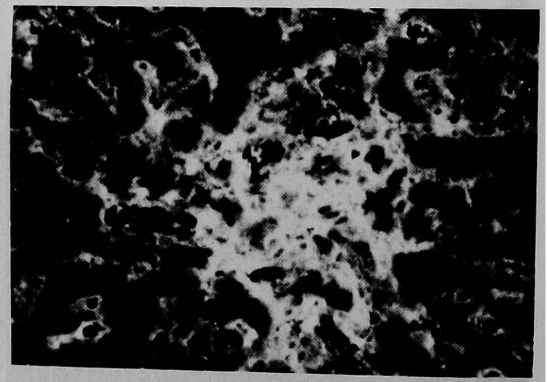


図15. ラット TR118 感作ラット脾細胞移入後の蛍光抗体直接法による肝細胞壊死部の特異蛍光