

肝線維化における末梢単核球の線維芽細胞増殖促進作用

文屋 学 新 津 洋司郎
札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

Fibroblast Proliferating Activity of Peripheral Mononuclear Cells in Hepatic Fibrosis

Manabu BUNYA and Yoshiro NIITSU
Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. I. Urushizaki)

In order to clarify the immunological mechanism of hepatic fibrosis, peripheral mononuclear cells (PMNC) from patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis were examined to know whether they release some fibroblast proliferating factors in response to PHA stimulation or not.

The results obtained were as follows:

- 1) In the culture medium of PHA stimulated PMNC from patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis, significantly higher activities of fibroblast proliferation were demonstrated as compared to those from normal subjects.
- 2) The cultured medium obtained from CAH was fractionated on high performance liquid chromatography and the activities were recovered in two peaks with a molecular weight of 60,000 (FPF-I) and 20,000 daltons (FPF-II), respectively. Both active peaks coincide with those of collagen synthesis.
- 3) The flat bed isoelectric focusing study of FPF-I and FPF-II revealed that p. I. of both fractions existed at 5.1.
- 4) FPF-I and II coincide with active peaks of interleukin 1 (IL-1) activity as assessed by thymocyte proliferating assay and CTLL proliferating assay.
- 5) The macrophage fractions of PMNC from patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis were found to secrete a fibroblast proliferating factor in relatively higher concentrations by the stimulation of LPS.

It was assumed from the above results that the macrophage population in PMNC of chronic hepatitis or liver cirrhosis produces more IL-1 than normal subjects and thus the secreted IL-1 caused proliferation of fibroblast in the liver.

(Received February 12, 1986 and accepted February 24, 1986)

Key words: Hepatic fibrosis, Peripheral mononuclear cell, Fibroblast proliferating factor, IL-1.

1 結 言

諸臓器の慢性炎症性病変は結果として線維化を伴うのが常であり、その線維化の程度がしばしば疾患の予後を左右する重要な因子となることは衆知のとおりである。

この線維化の機序の一つに近年細胞性免疫の関与が

指摘されてきている。たとえば、強皮症¹⁾、肺線維症²⁾、間質性腎炎³⁾などでは局所に浸潤した lymphoid cell 由来の線維芽細胞増殖因子が線維化に積極的なかわりをもつことが明らかにされている。慢性肝炎ことに慢性活動性肝炎ではグリソン鞘を中心に単核細胞の浸潤を伴う active fibrosis⁴⁾が進展することはよく知られた事実であり、それらの単核細胞が何らかの形で線維化

に一役を担っている可能性は想像に難くない。

しかるに、これまで肝疾患を対象に、細胞性免疫の線維化における意義を検討した研究はきわめて少なく、とりわけ、免疫担当細胞に由来する cytokine の線維化作用を詳細に追求した報告はみあたらない。そこで本研究では肝線維化を伴う疾患として慢性肝炎及び肝硬変症を対象とし、これら患者の末梢単核球に由来する線維芽細胞増殖因子を調べ、同因子と、最近免疫ネットワークを調整する cytokine として注目されている interleukin 1, 2 などの異同について検討を加えたので報告する。

2 研究対象並びに研究方法

2.1 研究対象

札幌医大第四内科及び関連病院に入院し肝生検により診断しえた、慢性活動性肝炎 (CAH) 12 例、慢性非活動性肝炎 (CIH) 11 例、肝硬変症 (LC) 16 例、及び正常人 31 名を対象とした。

2.2 研究方法

2.2.1 各種樹立細胞株の培養

ヒト胎児肺由来の線維芽細胞である IMR 90 及びマウス線維芽細胞である 3T6 は大日本製薬株式会社から、またラット胎児由来線維芽細胞である WFB, 及びヒトメラノーム細胞由来である HMV は札幌医大病理学第一講座から、さらにヒト大腸癌由来の培養細胞である M 7609 は、弘前大学外科学第一講座よりそれぞれ供与を受けた。これら培養細胞はいずれも Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (GIBCO 社) に、ペニシリン-G 100 unit/ml, ストレプトマイシン 100 µg/ml 及び 10% fetal calf serum (FCS) を加えた中で 5% CO₂, 37°C の条件下で継代培養した。

2.2.2 末梢単核球 Peripheral mononuclear cell, (PMNC) の培養

各種肝疾患患者及び正常人の PMNC は、Ficoll-Isopaque 法により分画し、serum free の DMEM にて 1×10^6 個/ml に調整し、PHA-P (Difco 社) 10 µg/ml または liver specific protein (LSP) (2.2.5 項で詳述) 0.1 mg/ml の存在下で 24 時間培養した。培養後、細胞成分を遠沈し、その培養上清に含まれる線維芽細胞増殖活性を後述する方法で測定した。

2.2.3 培養細胞増殖能の測定

2.2.3.1 Cell growth assay

Takasugi and Klein⁵⁾ の方法に準じて実施した。すなわち、マイクロプレート (Falcon 3034 microplate) の各 well に DMEM にて 2×10^4 個/ml に調整した

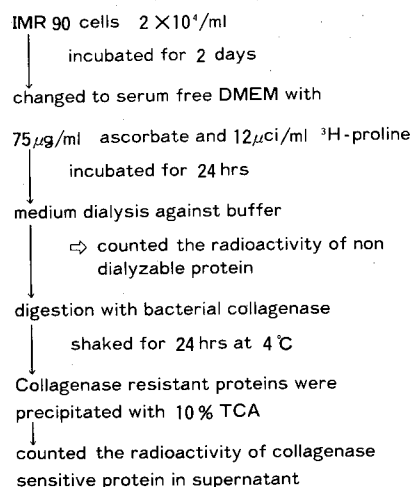
WFB 線維芽細胞を 20 µl ずつ入れ、37°C, 5% CO₂ で 24 時間培養した。その後、各 well 内の培養液を吸引除去し、DMEM にて 5 倍に希釈した PMNC 培養上清を各 well に 20 µl ずつ加えて 72 時間培養した。培養後、生理食塩水をプレート内に注入し、十分に振盪して浮遊細胞を除去した後、well の底面をよく乾燥させ、メタノール固定後、ギムザ染色をおこない well の底に付着した細胞数を顕微鏡下で算定した。

2.2.3.2 DNA synthesis assay

10% FCS を含む DMEM にて 1×10^5 個/ml に調整した IMR-90 及び 3T6 線維芽細胞をシャーレ (Falcon 3001, Tissue Culture Dish) に 2ml とり、約 36 時間培養した。early confluence の状態になったことを確認した後、培養液を FCS free の DMEM に交換し、同時に前述の方法で採取した PMNC 培養上清を 200 µl 添加した上で、引き続き 16 時間培養した。最後に ³H-TdR (New England Nuclear 社) を 1.0 µCi/dish に加え、さらに 8 時間培養後、ハーベスターで、グラスフィルター (Whatman 社) 上にラベルされた細胞を回収して液体シンチレーションカウンター (Beckman, LS-250) でその放射活性を測定した。

2.2.4 コラーゲン合成能の測定

コラーゲン合成能の測定法の概要を Fig. 1 に示した。まず、IMR-90 線維芽細胞を 2×10^4 個/ml になるよう



$$\% \text{Collagen synthesis} = \frac{\text{cpm of collagenase sensitive protein} \times 100}{5.4 (\text{cpm of collagenase resistant protein} - 0.09 \times \text{cpm of collagenase sensitive protein}) + \text{cpm of collagenase sensitive protein}}$$

Fig. 1 Method for measurement of collagen synthesis by IMR-90 cells.

に10% FCSを含むDMEMにて調整し、その1 mlをマイクロプレート(16 mm well Diameter, Coster社)にとり、48時間培養してearly confluenceの状態になったことを確認後、培養液を吸引除去した。次いでphosphate buffered saline (PBS)にてプレートを十分に洗浄し、L-(2, 3)³H-proline (12 μ Ci/ml)(New England Nuclear社)とアスコルビン酸75 μ g/mlを含むFCS freeのDMEM 1 mlを加え37°C, 24時間培養した。培養後その培養上清を0.15 M NaCl及び25 mM N-ethylene maleimide (NEM)を含む0.15 M Tris-HCl, pH 7.5にて24時間透析し、その100 μ lをとり液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定して培養上清中の全蛋白の³H-prolineの取り込みを求めた。

一方、透析培養上清800 μ lに200 unit/mlのBacterial collagenase(type V, Sigma社)100 μ l, 25 mM NEMを100 μ l, さらに0.5 M CaCl₂を20 μ lそれぞれ添加し、4°Cにて24時間攪拌しながらインキュベートしてcollagenase感受性蛋白、すなわちコラーゲンを分解した。次いで終濃度が10%になるようにtrichloroacetic acid (TCA)を加えて、4°C, 30分間放置して非コラーゲン蛋白を沈澱させ、それを12,000 rpm, 5分間遠沈した上で、上清中に残存する放射活性すなわちコラーゲンへの³H-prolineの取り込みを、液体シンチレーションカウンターにて測定した⁹⁷⁾。

2.2.5 Liver specific protein (LSP) 粗分画の抽出法

Meyer zum Büshenfelde and Miesherの方法⁸⁾にしたがい以下のごとくに抽出した。まずヒト正常肝を細切し0.1 N NaOHにてpH 8.0に調整した0.25 M sucroseで繰り返し攪拌洗浄した後、Potterのホモジナイザーにてホモジナイズした。次いでそのホモジネートを105,000 g, 1時間超遠心した後、上清をあらかじめtris-HCl/EDTA buffer (pH 8.0)で平衡化してあるSephadex G-100 column (90×2.5 cm)に添加し、同bufferを用いて溶出した。第1のピーク(O. D. 280 nm)を限外濾過(Amicon PM 10)法で濃縮後、前述のbufferで平衡化してあるSephadex 6B column (90×2.5 cm)に添加し、同bufferにて溶出、再び第1のピークを集め、LSP粗分画として実験に用いた。

2.2.6 単核球培養上清のトリプシン及びノイラミナーゼ処理

CAH患者のPHA刺激PMNC培養上清1 ml (5 μ g/ml)を1.5 M tris-HCl (pH 8.8)でpH 8.4に調整後、トリプシン(Difco社)500 μ g/mlと37°C, 3時

間インキュベートし、次に反応を停止させるためにsoybean trypsin inhibitor (Sigma社)1 mg/mlを加えた。他方、同上清1 mlをビーズに固相化したノイラミナーゼ(Type VI-A, Sigma社)0.06 unit/100 μ lとともに37°C, 2時間インキュベートした後、12,000 rpm, 5分間遠沈し、その上清をとってノイラミナーゼ処理上清とした。

2.2.7 Thymocyte proliferating assay

Paetkau *et al.*⁹⁾の方法に準じておこなった。まずBalb/c Mouse雄(4~8週)から得たthymocyteを10% FCSを含むDMEMにて 5×10^6 個/mlに調整し、その100 μ lをマイクロプレート(Falcon 3072, 96-well)に分注、PMNC 10 μ lを加えた後PHA-P(Difco社)10 μ g/mlの存在下で48時間培養した。次いで³H-TdR 0.5 μ Ci/mlを加え12時間pulse labelingをおこない、ハーベスター(LABO MASH社製)でグラスフィルター上にthymocyteを回収した上で、液体シンチレーションカウンターでその放射活性を測定しthymocyte増殖刺激活性とした。

2.2.8 Cytotoxic T cell line (CTLL) assay

Gillis and Watson¹⁰⁾の方法に従いmouse cytotoxic T cell line (CTLL)のIL-2依存性細胞増殖を指標として測定した。マサチューセッツ工科大学癌研究所H. Eisen博士より恵受を受けたCTLL細胞を10% FCSを含むDMEMで 4×10^4 個/mlに調整し、マイクロプレート(Falcon 3072)に100 μ lずつ分注、PMNC上清10 μ lを加え24時間培養した。培養後さらに³H-TdR 0.5 μ Ciで4時間pulse labelingし、その放射活性を測定し、IL-2活性とした。

2.2.9 Lipopolysaccharide (LPS) によるマクロファージの刺激

まず2.2.2の方法で分離した単核球を10% FCSを含むDMEMにて 3×10^6 個/mlに調整後、マクロファージ分離用プレート(径60 mm, 日本抗体研究所)に注入し、37°C, 1時間培養した。次にその培養上清を除去し、PBSで3~4回洗浄をくり返して非付着細胞を除去した後、4°Cに冷却した剝離液(EDTA, FCS加PBS, 日本抗体研究所)3 mlを加え、4°C30分間放置した。その後、剝離液をピペティングし、PBSにて洗浄、マクロファージ含有剝離液を回収した。最後にこのマクロファージを10% FCSを含むDMEMにて 1×10^6 個/mlに調整し、LPS(大腸菌由来, Difco社)を20 μ g/ml加え、マイクロプレート(直径2.0 cm Falcon 3047)上で37°C, 24時間刺激した。刺激後の培養上清はDNA assayによる線維芽細胞増殖活性の

測定に用いた。

2・2・10 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

HPLCは装置としてG-3000 sw, columnを連結したHLC-803 A (東洋ソーダ社製)を用い、試料添加量を200 μ l, 流速0.5 ml/min, 1分画1 mlとしておこなった。流出パターンはO. D. Range 1.28として、波長280 nmでモニターリングした。

2・2・11 Flat bed 等電点電気泳動 (IEF)

Sephadex G-25 (Pharmacia 社) 6.0 gを蒸留水112.5 mlで室温にて24時間膨潤した後、Ampholine 40% w/v, pH 3-10(LKB社)を6 ml加え、Flat bedガラス板(LKB社)上に、約120 mlのせ、ゲル表面が水平になるのを待って、陽極液0.1 M \cdot H₂PO₄, 陰極液0.1 M \cdot NaOHとして前泳動を45分間おこなった。次にゲルの中央部にサンプルアプリーターを置き、サンプルをアプリーター内のゲルとよく混和し10分間放置した後、アプリーターを取り除いて500 V, 5時間泳動した。泳動終了後、ゲルを陽極側より30に分画し、各分画の一部でpHを測定し、残りを3,000 rpm, 15分間遠沈して上清の吸光度を波長280 nmで測定した。

3 研究結果

3.1 各種肝炎における PHA 刺激 PMNC 培養上清の線維芽細胞増殖活性

正常人22名及び各種肝炎患者26名についてPHA刺激PMNC培養上清が線維芽細胞増殖に及ぼす影響を検討した。PMNC培養上清を添加した場合の線維芽細胞の³H-TdRの取り込みを同上清を含まないDMEMで培養した場合の線維芽細胞の³H-TdRの取り込みで除した値をstimulation index(S. I.)として表わした。Fig. 2に示すように正常人培養上清添加群のS. I.は 1.10 ± 0.13 であったのに対して、CAHでは 1.54 ± 0.22 , CIHでは 1.40 ± 0.28 , LCでは 1.39 ± 0.16 であり、それぞれの危険率 $p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.001$ で有意の高値を示した。

3.2 CAH 患者における LSP 刺激 PMNC 培養上清の線維芽細胞増殖活性

S. I.の高値であったCAH患者のうち1名についてPHAのかわりにliver specific protein(LSP)を用いてPMNCを刺激し、その培養上清の線維芽細胞増殖促進活性をcell growth assayにより検討した。Fig. 3に示すごとくLSP刺激培養上清添加前の線維芽細胞数の平均値は248個/mm²であるのに対し、上清添加後24時間、48時間、72時間培養でそれぞれ平均値290

個/mm², 342個/mm², 518個/mm²と培養時間依存性に、線維芽細胞を増殖させた。一方、対照として2%FCSを含むDMEMを添加したものでは、増殖効果は認められなかった。ただしこの増殖促進効果は、同じ単核球をPHAで刺激した培養上清(5倍希釈)に比較すると弱いものであった。

3.3 加熱及び酵素処理による影響

S. I.が高値を示したCAH患者のうち1名のPHA刺激培養上清をTable 1に示すようにtrypsin, neuraminidase, 56°C30分, 100°C2分により処理すると、いずれの処理によっても線維芽細胞増殖活性の低下が認められた。したがってCAH患者培養上清中の線維芽細胞増殖活性は加熱処理に易失活性で、シアル酸を活

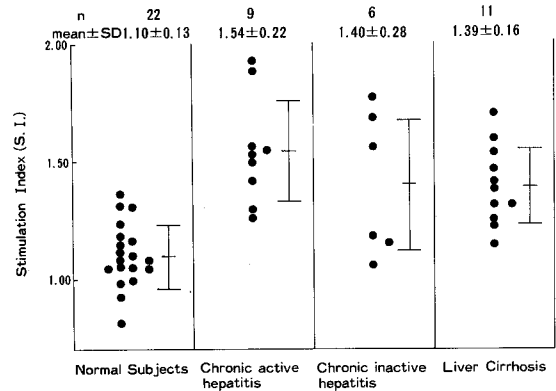


Fig. 2 Stimulation of ³H-thymidine incorporation into fibroblast by conditioned medium of PHA-stimulated mononuclear cell from patients with CAH, CIH and liver cirrhosis.

Stimulation of ³H-TdR incorporation into fibroblast by conditioned medium of PHA-stimulated mononuclear cell from patients

$$S. I. = \frac{\text{Stimulation of } ^3\text{H-TdR incorporation into fibroblast by conditioned medium of PHA-stimulated mononuclear cell from patients}}{\text{Stimulation of } ^3\text{H-TdR incorporation into fibroblast by DMEM}}$$

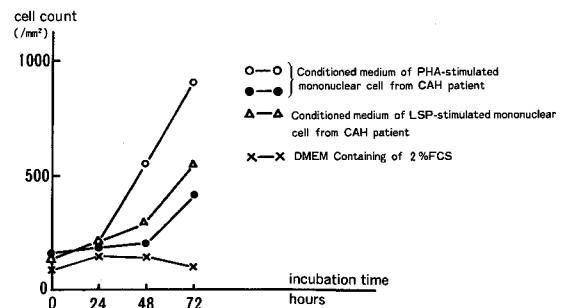


Fig. 3 Stimulation of fibroblast proliferation by conditioned medium of PHA or LSP-stimulated mononuclear cell from CAH patient

Table 1 Effects of heat, trypsin or neuraminidase treatment on FPF activity in conditioned medium from CAH patient.

Treatment	[³ H] TdR incorporation (cpm)	Percent activity (%)
Conditioned medium (untreated)	4,006 ± 127	100
Trypsin	2,768 ± 134	69
Neuraminidase	2,791 ± 146	70
Heat 56°C 30 min	3,041 ± 57.9	76
100°C 2 min	2,253 ± 134	56
Dalbecco's modified eagle medium (DMEM)	2,544 ± 107	63

性部位に有する因子（糖蛋白質）により担われていると推定された。

3.4 線維芽細胞増殖因子の物理化学的性状

3.4.1 HPLCによる分子量の検討

上述の線維芽細胞増殖因子 (fibroblast proliferating factor) を略し以下 FPF と呼称する)の性状を検討するため、CAH 患者単核球の刺激培養上清を HPLC によりゲル濾過した。その溶出パターンは Fig. 4(A) に示すごとくで、波長 280 nm における吸光度測定では 6 つのピークを示した。この各々の分画を DNA synthesis assay 法で検討したところ Fig. 4(B) に示すごとく、分子量 60,000 (FPF-I)、20,000 (FPF-II) に一致する分画で ³H-TdR の高い取り込みが認められた。またこれらの分画は Fig. 4(C) に示すごとく、同時にコラーゲン及び非コラーゲン性蛋白の合成促進活性をも有していた。

次に正常人 PMNC を PHA で刺激した培養上清についても検討した。Fig. 5 に示すように波長 280 nm で溶出パターンは慢性肝炎患者 PMNC の PHA 培養上清のそれとほぼ同一で線維芽細胞増殖活性も分子量 60,000 と 20,000 の分画に認められた。なお対照として PHA 非刺激正常人単核球の培養上清を検討したが、溶出パターンには本質的に差異はなく、線維芽細胞増殖活性はいずれの分画にも認められなかった。

3.4.2 FPF-I, FPF-II の等電点電気泳動法による検討

FPF-I, II の等電点電気泳動所見を Fig. 6 に示した。上段に各分画の線維芽細胞増殖促進活性を ³H-TdR の取り込みで示し、下段には O. D. 280 nm による溶出パターンを示した。FPF-I, FPF-II はともに P. I. 5.0-6.8 に数本の heterogenous な活性ピークを有し、その主峰はいずれも p.I. 5.1 に認められた。ただし、それに続く数本のピークは後者の FPF-II でより明確に認

められた。なお、O. D. 280 nm のプロフィールは両ピークとも本質的差異は認められなかった。

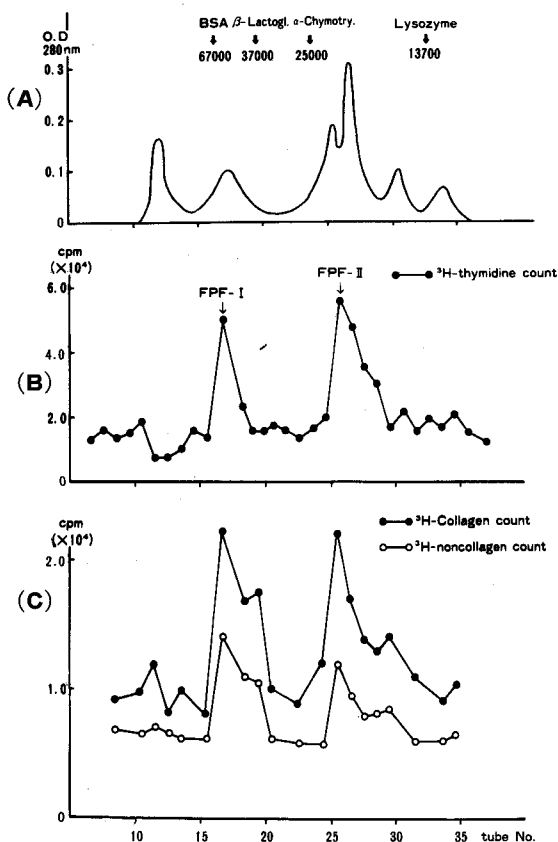


Fig. 4 Gel filtration of conditioned medium from PHA-stimulated mononuclear cell of CAH patient. (A) Profile monitored by O.D. at 280 n.m. (B) Fibroblast proliferating activity (C) Collagen synthesis

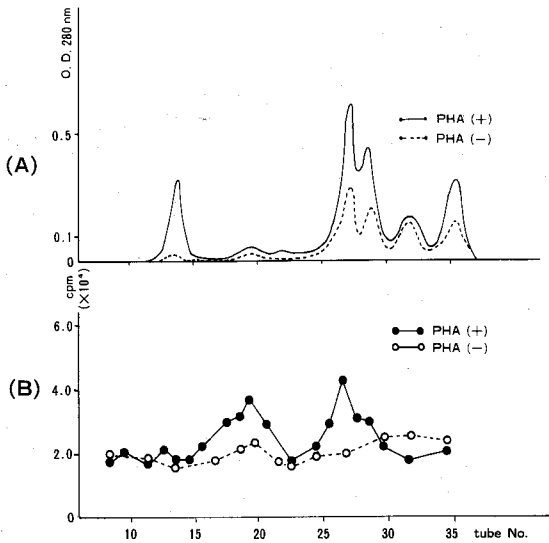


Fig. 5 Gel filtration of conditioned medium from mononuclear cell of normal subjects with or without PHA stimulation. (A) Profile monitored by O.D. at 280 n.m. (B) Fibroblast proliferating activity

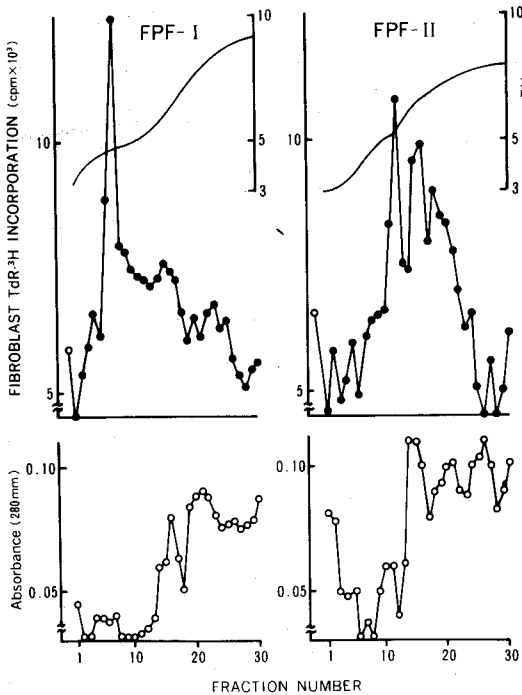


Fig. 6 Isoelectric focusing of FPF-I and FPF-II.

3.5 線維芽細胞増殖因子の濃度依存性についての検討

FPF-I と FPF-II の濃度依存性について検討した。Fig. 7(A)に示すように FPF-I, FPF-II ともに蛋白量 10 $\mu\text{g/ml}$ まで濃度依存性に線維芽細胞増殖活性を高め、

それ以上ではプラトーに達した。同様に Fig. 7(B)に示すように、線維芽細胞のコラーゲン合成促進活性も蛋白量 10 $\mu\text{g/ml}$ まで濃度依存性に上昇し、それ以上の量ではプラトーに達した。

3.6 線維芽細胞増殖因子の各種樹立細胞株 (IMR 90, 3 T 6, M 7609, HMV) に対する増殖作用

各種樹立細胞株に対する FPF の増殖作用について検討した。ヒト線維芽細胞である IMR-90 及びマウス線維芽細胞である 3 T 6 に FPF-I を添加し、その増殖促進活性を調べた。その結果は Fig. 8 に示すように、40 時間培養した後の S. I. はそれぞれ 1.70, 1.62 であったが、ヒト大腸癌由来細胞である M 7609, ヒトメラノマ由来細胞である HMV では S. I. 0.48, 0.89 と増殖促進活性は認められなかった。FPF-II についても同様に IMR-90 で 1.96, 3 T 6 で 1.78 と増殖促進活性を認め、M 7609 では 1.07, HMV では 0.93 とやはり増殖促進活性は認められなかった。

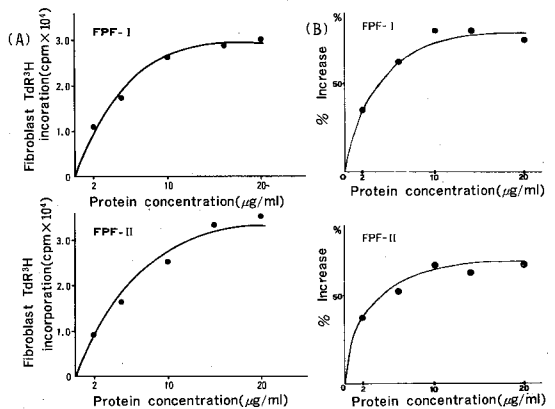


Fig. 7 Dose dependent stimulation of fibroblast proliferation and collagen synthesis by FPF-I or FPF-II.

(A) Fibroblast proliferating activity
(B) Collagen synthesis

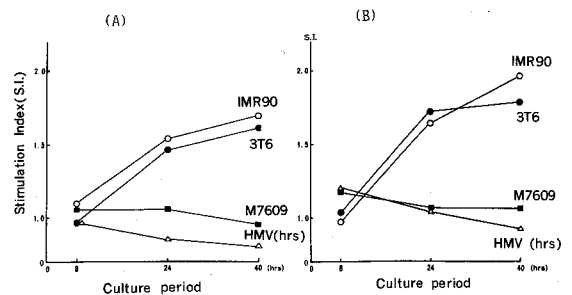


Fig. 8 Stimulation of ^3H -thymidine incorporation into various cell lines by FPF-I (A) and FPF-II (B).

3.7 線維芽細胞増殖因子の IL-1 及び IL-2 活性の検討

線維芽細胞増殖因子と IL-1 及び IL-2 との異同につき検討した。Fig. 9 に示すように HPLC で溶出された各分画の thymocyte 増殖刺激活性を測定したところ分子量 60,000, 35,000, 20,000 に 3 つのピークを認めた。一方 CTLL 増殖活性すなわち IL-2 活性は分子量 35,000 のピークにのみ認められた。換言すると分子量 60,000 と 20,000 のピークは thymocyte 増殖刺激活性を有しながらも、IL-2 活性をもたないことから IL-1 と考えられた。なお分子量 60,000 の分画は FPF-I に 20,000 の分画は FPF-II に溶出部位が一致した。

3.8 各種肝疾患患者における LPS 刺激末梢マクロファージ培養上清の線維芽細胞増殖活性

正常人及び各種肝疾患患者のマクロファージを LPS

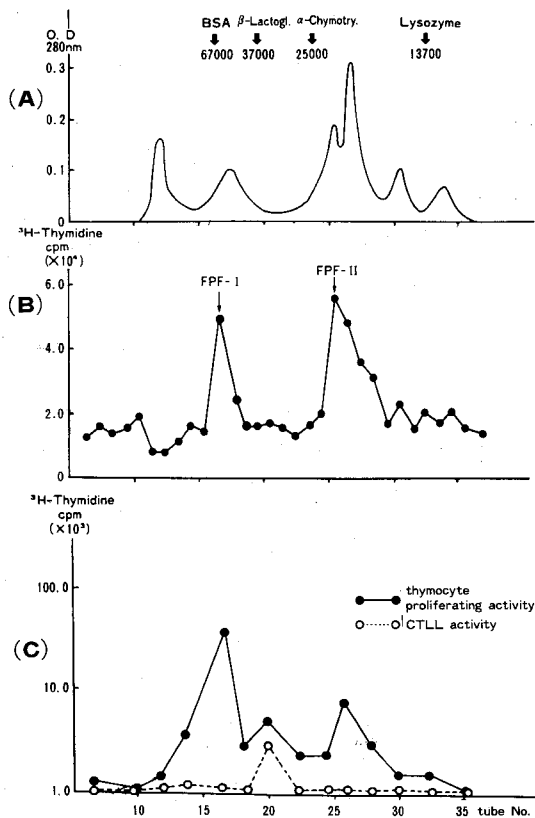


Fig. 9 Gel filtration of conditioned medium from PHA-stimulated mononuclear cells of CAH patient. (A) Profile monitored by O.D. at 280 n.m. (B) Fibroblast proliferating activity (C) Thymocyte and CTLL proliferating activity

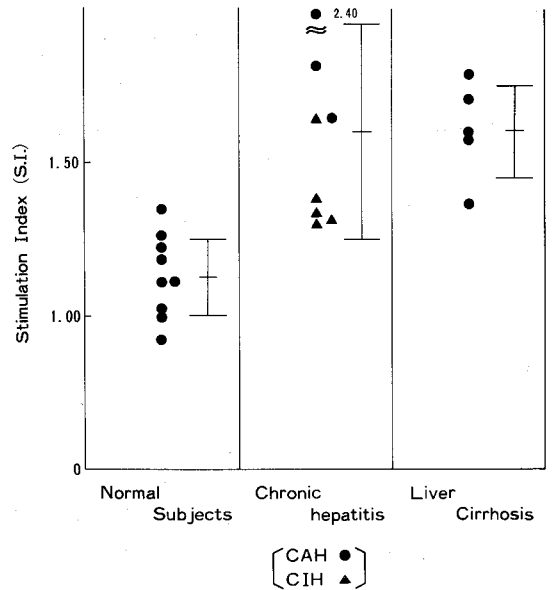


Fig. 10 Stimulation of ³H-thymidine incorporation into fibroblast by LPS-stimulated macrophage culture.

で刺激し、その培養上清の線維芽細胞に及ぼす影響につき検討した。Fig. 10 に示すように、正常人培養上清添加群の S. I. は 1.13 ± 0.13 であったのに対し、慢性肝炎では 1.60 ± 0.34 、肝硬変では 1.61 ± 0.15 でそれぞれ危険率 $p < 0.005$, $P < 0.001$ で後 2 者は前者に比べ有意に高値であった。

4 考 察

免疫担当細胞の線維芽細胞増殖作用に関する研究は 1978 年 Wahl *et al.*¹¹⁾ のモルモットを用いた実験を嚆矢とする。彼らはまずモルモットの腹腔 T cell rich fraction を dinitrophenylated ovalbumin, tetanus toxoid で刺激し、その培養上清に線維芽細胞増殖因子が出現することを見出した。次いで彼らは muramyl dipeptide で活性化した腹腔マクロファージが同様に線維芽細胞増殖因子を放出することを明らかにした¹²⁾。

同様な報告はその後、マウス腹腔マクロファージを用いた Martin *et al.*¹³⁾ や、モルモットリンパ節細胞を用いた Postlethwaite and Kang¹⁴⁾ によって重ねられ、さらにヒトの末梢単核球についても Wahl and Gately¹⁵⁾ がマイトゲン刺激によって放出される線維芽細胞増殖因子の存在を報告した。

一方、疾患(線維症)との関係では Neilson *et al.*³⁾ がモルモットに作製した interstitial nephritis で、その

腹腔 T cell rich fraction が renal tubular antigen に反応して、線維芽細胞増殖因子を放出することを証明した。

しかし、これらの研究はいずれも実験動物あるいは正常ヒトを対象としたものであり、臓器線維症の患者なく慢性肝炎、肝硬変の患者を対象としてその免疫担当細胞の線維化における役割について詳細な検討をした報告はきわめて少ない。

このような観点から本研究ではまず慢性活動性肝炎(9例)慢性非活動性肝炎(6例)及び肝硬変(11例)を対象に、患者 PMNC の線維芽細胞増殖活性を検討した。患者 PMNC を PHA で刺激しその培養液中の線維芽細胞増殖活性を IMR 90 への $^3\text{H-TdR}$ の取り込みで調べたところ、正常人(22名)の単核球のそれに比べて有意に高値であった。すなわち、慢性肝炎、肝硬変の患者 PMNC は活性化された状態にあり、マイトゲンの刺激で、より多くの FPF を産生すると考えられた。ところで生体内に PHA のような mitogen が存在しないことはいうまでもない。それではこれらの肝疾患では何が単核球を活性化させ、何がその活性化された単核球を再び刺激して FPF を産生させるのであろうか。

想定されるものとしては肝炎ウイルスあるいはそれによって修飾された肝細胞膜抗原、細胞崩壊時に露呈される肝特異抗原などがあげられる。

そこで本研究では Meyer Zum Büschenfelde and Meischer のいう liver specific protein (LSP)⁹⁾を用い、その CAH 患者単核球活性化作用を検討した。

結果は Fig. 3 に示したとおり LSP で刺激した患者単核球培養上清は明らかに FPF 活性を有していた。すなわち患者単核球は PHA のみならず、生体内に実在する物質、LSP にも反応して FPF を産生することが実証された。

ところで単核球に由来する FPF の性状あるいは本態については、その存在が明らかにされて以来、精力的な研究がおこなわれてきたにもかかわらず、諸家の見解が必ずしも一致していない。

前述の Neilson *et al.*³⁾ は interstitial nephritis のモルモットから腹腔 T cell rich fraction を採取し、renal tubular antigen により刺激、放出される FPF を調べ、その活性物質が分子量 40,000 の蛋白質であることを明らかにした。Wahl and Gately¹⁵⁾ は正常ヒト末梢 T 細胞並びにヒト T cell line (HSB 2) の産生する FPF を調べ、やはり分子量 40,000 の trypsin sensitive, heat stable (100°C, 10 分間処理で失活しない) な蛋白質を同定した。

また Postlethwaite and Kang¹⁴⁾ はモルモットのリンパ節細胞(マクロファージを含む)培養上清から得た FPF が分子量 16,000 と 60,000 の 2 つの蛋白質から成ることを見出し、前者はマウス thymocyte を増殖させることから interleukin 1 の可能性が強く、後者は T 細胞由来のリンホカインであろうとした。

一方 Schmidt *et al.*¹⁶⁾ は正常ヒト末梢単核球を混合培養 (MLR) した上清に分子量 75,000 と 13,000 の 2 種の FPF を確認し、それらがいずれも thymocyte proliferating activity を有していることから、両者は本質的に同一物質 (interleukin 1) で、前者は後者が血清蛋白と結合したものであろうと主張した。

このように FPF の本態については T 細胞に由来するリンホカイン、あるいはマクロファージに由来する Interleukin 1、さらにはその両者を含む可能性など議論の多いところである。

本研究では CAH 患者の FPF についてその物性並びに生物学的活性を IL 1 のそれと比較した。

まず trypsin, neuraminidase, 加熱処理に対する安定性を検討したところ、本 FPF はいずれの処理にも易失活性であり、heat labile な蛋白質で、その活性発現に sialic acid の存在が必須であると考えられた。またゲル濾過法による分析では分子量 20,000 と 60,000 の 2 分画に線維芽細胞増殖活性が認められ、いずれの分画にも thymocyte proliferating activity が検出された。一般に thymocyte proliferating activity を有する cytokine としては IL 1 または interleukin 2 (IL 2) が知られているが上述の分画には CTLL 増殖刺激活性すなわち IL 2 活性を認めなかったことから、IL 1 そのものあるいは IL 1 に酷似した物質が含まれていると推測された。なお分子量 35,000 の分画にも thymocyte proliferating activity を認めたが、肝心の線維芽細胞増殖活性は証明されず、一方では CTLL 活性が検出されたことから、その本態は IL 2 であり、線維化には直接関与していないものと考えられた。

ところで、精製された IL 1 は分子量 15,000 の単一な物質とされており、本研究で 2 種の IL 1 活性物質を見出したことと一見矛盾するよう思われる。

この点について、まず考えられることは Schmidt *et al.*¹⁶⁾ が指摘したように、分子量の小さな活性物質 (IL 1) が血清蛋白と結合している可能性である。しかし本実験系では conditioned medium 中に血清蛋白が全く含まれておらず、その可能性は考えられない。最近 Oppenheim *et al.*¹⁷⁾ は精製 IL 1 を *in vitro* で濃縮すると、その易凝集性から分子量 50,000-70,000 の活性

物質が生ずることを指摘している。本実験で同定した分子量 60,000 の物質もおそらくは IL 1 の凝集体であろうと考えられる。

事実、両者は等電点電気泳動による分析とともに IL 1 とほぼ同じ PI 領域に泳動され、また IMR 90, 3 T 6, M 7609, HMV など各種樹立細胞株を用いた増殖刺激活性の検討でも、類似した標的細胞特異性を有していた (Fig. 8)。

このように慢性肝炎や肝硬変患者の PMNC が産生する FPF の本態は IL 1 である可能性が高いが、それをさらに裏づけるために、本研究では FPF の産生細胞についても検討を加えた。

IL 1 はもともと単球あるいはマクロファージが産生するサイトカインとされている。そこで正常ヒト 9 名、慢性肝炎 8 症例 (活動性 3 例、非活動性 5 例)、肝硬変 5 症例を対象にその末梢血マクロファージ (マクロファージ分離用プレート附着細胞) を LPS で刺激した培養上清中の線維芽細胞増殖活性を測定した。その結果、慢性肝炎、肝硬変ではいずれも正常ヒトに比べ有意な活性の増加を認めた (Fig. 10)。

すなわち、これらの疾患では患者マクロファージはいわば感作された状態にあり正常マクロファージに比べてより多くの FPF (IL 1) を産生すると考えられた。

ところで線維化の本質はあくまでもコラーゲンの蓄積であり、FPF (IL 1) が線維化に関与するとするならば、増殖した線維芽細胞のコラーゲン合成が実際に高まっていることを証明する必要がある。

これまでリンパ球あるいはマクロファージに由来するコラーゲン合成促進因子については、Johnson and Ziff¹⁸⁾、Wahl and Gately¹⁵⁾、中野¹⁹⁾らにより報告されている。中でも中野らは¹⁹⁾慢性活動性肝炎の同因子について詳細な検討を加え分子量 68,000-100,000 の蛋白質を同定している。しかし、これらの報告はいずれも線維芽細胞増殖活性について言及しておらず FPF との関係は不明である。

本研究では CAH 患者の PMNC を PHA で刺激し、その conditioned medium をゲル濾過により分画した各成分について、3 T 6 マウス線維芽細胞のコラーゲン合成に与える影響を検討した。コラーゲン合成促進活性は明らかに 2 つの major peak として認められ、その溶出部位は FPF (IL 1) のそれと完全に一致していた (Fig. 4)。ただし、その際コラーゲン以外の蛋白質も同様に合成が高められたため、この促進作用はコラーゲン蛋白に特異的なものとはいえず、むしろ線維芽細胞が増殖した結果、培養液中にその産生蛋白が増加し

た現象であると考えられた。いずれにしても今回の結果は FPF (IL 1) が線維芽細胞を増殖させると同時にコラーゲン合成を促進させることを強く示唆するものであった。

以上を要約すると、慢性肝炎、肝硬変患者のリンパ球はマイトゲン (*in vivo* ではおそらく抗原) の刺激により macrophage activating factor (MAF) を放出し、それによりマクロファージが多量の線維芽細胞増殖因子 (すなわち IL 1) を産生して線維芽細胞の増殖とコラーゲン合成を引き起こすという図式が想定される。

今後は *in vivo* でのリンパ球刺激物質の同定、MAF の関与の証明、マクロファージの活性化の機序など残された問題を検索し、肝線維化における免疫学的機序をより明確にしていくつもりである。

5 結 語

慢性肝炎及び肝硬変患者の PMNC を PHA あるいは LSP で刺激し conditioned medium 中に放出される線維芽細胞増殖因子について検討を加え以下の結果を得た。

- 1) 各種肝疾患患者の PMNC を PHA で刺激した培養上清の線維芽細胞増殖活性 (FP 活性) を検討したところ、正常人では stimulation index (S. I.) 1.10 ± 0.13 であったのに対し、CAH 1.54 ± 0.22, CIH 1.40 ± 0.28, LC 1.39 ± 0.16 と明らかな高値を示した。
- 2) S. I. が高値を示した CAH 患者 PMNC を liver specific protein (LSP) にて刺激したところ、同様に S. I. は高値を示した。
- 3) CAH 患者 PMNC 培養上清を、トリプシン処理、ノイラミニダーゼ処理、56°C、30分、及び 100°C、2分の処理を行ったところ、その促進活性は失われた。
- 4) CAH 患者 PMNC 培養上清を HPLC によりゲル濾過し各分画の FP 活性を調べたところ分子量約 60,000 (FPF-I) と 20,000 (FPF-II) に活性ピークが認められ、同時にそれらの分画に一致してコラーゲン合成促進活性を認めた。
- 5) FPF-I, II の等電点を電気泳動法にて調べたところ、共に PI 5.0-6.8 に数本の heterogenous な活性ピークを有し、その主峰はいずれも P.I. 5.1 に認められ、FPF-I, II の等電点には本質的な差異はないと考えられた。
- 6) FPF-I, II の target cell specificity を調べたところ IMR-90, 3 T 6 などの線維芽細胞のみに活性を示し、他の M 7609, HMV など悪性腫瘍樹立細胞株に

は増殖活性を認めなかった。

- 7) CAH 患者 PMNC 培養上清の thymocyte 増殖刺激活性, CTLL 増殖刺激活性を検討したところ分子量 60,000, 35,000, 20,000 の分画に thymocyte 増殖刺激活性を, 35,000 の分画に CTLL 増殖活性(IL 2 活性)を認めたことから FPF-I, II はともに IL 1 と考えられた。
- 8) 各種肝疾患患者の LPS 刺激マクロファージ培養上清の FP 活性につき検討したところ, 正常人でその S. I. が 1.13 ± 0.13 であったのに対し, 慢性肝炎では 1.60 ± 0.34 , 肝硬変では 1.61 ± 0.15 と高値を示した。

以上より FPF-I, FPF-II はいずれも本態が IL 1 であり, 前者は後者の凝集体と考えられた。また, 慢性肝炎, 肝硬変では LSP 等の抗原により感作・活性化されたリンパ球がおそらくは macrophage activating factor を介しマクロファージを刺激し多量の IL 1 を放出させた結果, 線維芽細胞の増殖, collagen 合成の促進を引き起こし, ひいては線維化の進展をもたらすものと想定された。

本稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲下さった本学内科学第四講座, 漆崎一朗教授に深謝するとともに, 本研究に御助言いただきました高後裕講師, 石谷邦彦, 幸田久平両博士に深謝いたします。

文 献

- Kondo, H., Rabin, B. S. and Rodan, G. P.: Cutaneous antigen-stimulating lymphokine of patients with progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J. Clin. Invest.* **58**, 1388-1394 (1976).
- Kravis, T. C., Ahmed, A., Brown, T. E., Fulmer, J. D. and Crystal, R. G.: Pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* **58**, 1223-1232 (1976).
- Neilson, E. G., Phillips, S. M. and Jimenes, S.: Lymphokine modulation of fibroblast proliferation. *J. Immunol.* **128**, 1484-1486 (1982).
- Popper, H. and Becker, K. S.: Hepatic fibrosis and collagen metabolism in the liver. In collagen metabolism in the liver. ed. Popper H. and Becker K. Stratton: intercontinental medical book corp. (1975).
- Takasugi, M. and Klein, E.: A microassay for cell mediated immunity. *Transplantation* **9**, 219-227 (1970).
- Peterkofsky, B. and Digelmann, R.: Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry* **10**, 988-994 (1971).
- Murphy, W. H., Von Der Mark, K., McEneaney, L. S. G. and Borstein, P.: Characterization of procollagen-driven peptides unique to the precursor molecule. *Biochemistry* **14**, 3243-3250 (1975).
- Meyer Zum Büschenfelde, K. H. and Miescher, P. A.: Liver specific antigens. *Clin. Exp. Immunol.* **10**, 89-102 (1972).
- Paetkau, V., Mills, G., Gerhart, S. and Monticone, V.: Proliferation of murine thymic lymphocytes in vitro is mediated by the concanavalin A-induced release of a lymphokine (costimulator). *J. Immunol.* **117**, 1320-1324 (1976).
- Gillis, S. and Watson, J.: Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J. Exp. Med.* **152**, 1709-1719 (1980).
- Wahl, S. M., Wahl, L. M. and McCarthy, J. B.: Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. *J. Immunol.* **121**, 942-946 (1978).
- Wahl, S. M., Wahl, L. M., McCarthy, J. B., Chedid, L. and Mergenhagen, S. E.: Macrophage activation by mycobacterial water soluble compounds and synthetic muramyl dipeptide. *J. Immunol.* **122**, 2226-2231 (1979).
- Martin, B. M., Gimbrone, M. A. Jr., Unanue, E. R. and Cotran, R. S.: Stimulation of non-lymphoid mesenchymal cell proliferation by a macrophage-derived growth factor. *J. Immunol.* **126**, 1510-1515 (1981).
- Postlethwaite, A. E. and Kang, A. H.: Characterization of fibroblast proliferation factors elaborated by antigen- and mitogen-stimulated guinea pig lymphnode cells: Differentiation from lymphocyte mitogenic factor, and Interleukin 1. *Cell. Immunol.* **73**, 169-178 (1983).
- Wahl, S. M. and Gately, C. L.: Modulation of fibroblast growth by a lymphokine of human T cell and continuous T cell line origin. *J. Immunol.* **130**, 1226-1230 (1983).
- Schmidt, J. A., Mizel, S. B., Cohen, D. and Green, I.: Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J. Immunol.* **128**, 2177-2182 (1982).
- Oppenheim, J. J., Stadler, B. M., Siraganian, R.

- P., Hage, M. and Mathieson, B.: Lymphokines: their role in lymphocyte responses (Properties of interleukin 1). Fed. Proc. **41**, 257-262 (1982).
18. Johnson, R. L. and Ziff, M.: Lymphokine stimulation of collagen accumulation. J. Clin. Invest. **58**, 240-252 (1976).
19. 中野 博, 宮村正美, 河崎恒久, 福田善弘, 杉山知行, 大西三朗, 伊藤憲一: 線維化調節要因. 最新医学 **38**, 1151-1157 (1983).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第4講座 文屋 学