

肝疾患における免疫複合体に関する研究

吉 崎 栄 泰

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Studies on Immune Complexes in Liver Diseases

Haruyasu YOSHIZAKI

*Department of Internal Medicine (Section I), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. A. Yachi)*

The serum levels of the immune complexes (IC) of IgG, IgA and IgM classes in patients with a variety of liver diseases were determined by using both the Clq solid phase radioimmunoassay and solid phase anti-C3 assay. The clinical significance of IC in liver diseases was investigated, and the results were as follows:

1. A significant increase in IC levels was observed in patients with chronic active hepatitis (CAH), liver cirrhosis (LC) and primary biliary cirrhosis (PBC) as compared with healthy controls. In particular, IgM-IC increased in patients with CAH and PBC, and IgA- and IgM-IC increased in patients with LC.

2. IgG- and IgM-IC levels were found to be significantly elevated in the HBsAg-positive group when compared to its negative group and the HBsAb-positive group. There was, however, a slight increase in the IgM-IC level in the HBeAg-positive group.

3. In patients with chronic inactive hepatitis, CAH and LC, the IC levels of all immunoglobulin classes were correlated with ZTT. Furthermore, IgG-IC levels determined by Clq solid phase radioimmunoassay were related to serum IgG concentration and ICG retention. Changes in the IC levels were considered to be relevant to the severity and activity of chronic liver diseases.

4. Antibodies of the IgG class in IC from sera of certain patients with CAH, LC and PBC were successfully separated and the molecular weight was estimated to be 300K to 350K daltons.

5. In these IgG fractions, antibodies against HBsAg and exogenous antigens (such as lactalbumin and LPS; *E. coli*) in patients with CAH and LC, and antibody against epithelial cells of the bile duct in patients with PBC were identified. In addition, the IC seem to be heterogenous in their compositions, some being probably related to the pathogenesis of the diseases and others being unrelated to pathogenesis.

(Received January 29, 1983 and accepted March 22, 1983)

Key words: Immune complex, Liver disease, Clq solid phase radioimmunoassay, Solid phase anti-C3 assay, HBs antigen

Abbreviations :

IC : immune complexes
Clq assay : Clq solid phase radioimmunoassay
aC3 assay : solid phase anti-C3 assay
AHG : heat aggregated human IgG
AH : acute hepatitis

CIH : chronic inactive hepatitis
CAH : chronic active hepatitis
LC : liver cirrhosis
PBC : primary biliary cirrhosis
AMA : antimitochondrial antibody

1 緒 言

免疫複合体 (immune complexes: IC) は主として自己免疫疾患の組織障害の病因として検討されてきたが種々の肝疾患においても血中 IC の存在が確認され IC が病因の一部に関与する可能性が報告^{1,2,3)} されている。しかし血中 IC がウイルス性肝炎, 自己免疫機序の関与が考えられる原発性胆汁性肝硬変症などの病態形成にどのような関連性を有するか, また IC を構成する抗原や抗体の性状についても未だ十分に明らかにされていない。

本研究ではまず血中 IC を補体系を利用した Clq solid phase radioimmunoassay⁴⁾ および solid phase anti-C3 assay⁵⁾ を用いて免疫グロブリンクラス別に測定する方法を開発し, 各種肝疾患において両測定値の関連性ならびに血中 IC 値と病態像との関連性を検討した。

さらに一部の症例より血中 IC を単離し, IC を構成する抗体の分子性状および抗体活性を検索し, 肝疾患における血中 IC の臨床病理学的意義を追究した。

2 方 法

2.1 対 象

対象は急性肝炎 (AH) 12 例 (うち B 型肝炎 8 例, nonA nonB 型 4 例), 慢性非活動性肝炎 (CIH) 6 例, 慢性活動性肝炎 (CAH) 20 例, 肝硬変症 (LC) 19 例, 原発性肝癌 10 例, 原発性胆汁性肝硬変症 (PBC) 8 例, ルポイド肝炎 1 例ならびに対照として健康対照 37 例 (男 17 例, 女 20 例) より血清を採取し, 使用するまで -20°C に保存した。なお, 一度融解した血清の再使用はさけた。

2.2 臨床検査成績

対象血清について GOT, GPT, γ -GTP, ICG, ZTT, 血清蛋白分画, 血清免疫グロブリン, 血清 C3・C4 濃度, 抗ミトコンドリア抗体 (AMA) ならびに HBs および HBe 抗原・抗体を測定し, それぞれ血中 IC 値との関連を検討した。

2.3 Clq solid phase radioimmunoassay による血中 IC の測定

2.3.1 Clq の精製

Clq は Kolb *et al.*⁶⁾ に従って affinity chromatography を用い, 血漿交換の際に得られた ACD 加患者血漿から精製した。用いた血漿は, C3, C4 値がいずれも正常範囲内にある重症筋無力症患者より採取してプールし, CaCl₂ を終濃度 20mM になるように加え, 37°C,

3 時間保温して fibrin を析出させ, 血清を採取した。

次に CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia 社) 30g にヒト IgG 約 400 mg を結合させて作製した IgG-Sepharose 4B column (4.5×7cm) を 10mM EDTA および 150mM NaCl 加 5mM リン酸緩衝液 (pH7.4; PBS-E) で平衡化し, これに 10mM EDTA を加えた上記血清 500ml を添加して Clq を結合させ, 再び PBS-E 約 1,000ml で O.D. (280nm) 0.04 以下になるまで十分に洗浄した。ついで PBS-E 500ml を初期緩衝液とし, 1.5M NaCl を含む PBS-E 500ml を極限緩衝液とする直線食塩濃度勾配で Clq を溶出した。得られた Clq を含む分画 300ml を 33% 飽和硫酸を用いて塩析して遠心し, その沈殿を 0.65M NaCl を含む PBS-E 3ml に再溶解し, さらに同じ緩衝液で平衡化した Sepharose 6B (Pharmacia 社) column (1.5×120 cm) に添加し, 流速 2.5~3ml/hr で精製した。Clq は 500 μ g/ml に調整し, -70°C に凍結保存した。

2.3.2 Clq solid phase radioimmunoassay による IgG 型 IC の測定

IgG 型 IC の測定は Clq solid phase radioimmunoassay (Clq assay) により Hay *et al.*⁴⁾ の方法に従って施行した。すなわち精製した Clq を 10mM PBS (pH8.4) で 3~5 μ g/ml に希釈してポリスチレンチューブに 1ml ずつ分注し, 4°C, 17 時間静置した後, 0.05% Tween 20 加 PBS (pH7.0; PBS-T) にて 3 回洗浄し, Clq 付着チューブを作製した。検体は 0.2M EDTA (pH7.5) 2 容を加え 37°C, 30 分間保温して内因性 Clq を解離した後, PBS-T を用いて 31 倍に希釈し, その 1ml を Clq 付着チューブに入れて約 50 度に傾斜した回転板上にかくはんしながら室温で 2 時間反応させた。ついで PBS-T を用いて 3 回洗浄後 0.3% ウシ血清アルブミン (BSA; 生化学工業) 加 PBS-T で希釈した¹²⁵I 標識抗ヒト IgG 抗体⁷⁾ を 1ml (2×10⁵ cpm) ずつ分注し, かくはんしながら室温で 2 時間反応させ, PBS-T で 3 回洗浄後, ガンマ・カウンターで放射活性 (cpm) を測定した。

IgG 型 IC 濃度は正常ヒト血清に heat aggregated human IgG (AHG) を 1, 2, 10, 20, 100, 200 および 400 μ g/ml の濃度になるように加えて標準曲線を作成し, 各々の検体の cpm より AHG 濃度 (μ g/ml) を求めた。なお検体はすべて duplicate で測定した。

2.4 Solid phase anti-C3 assay による血中 IC の測定

2.4.1 抗 C3 抗体付着プレートの作製

抗ヒト C3 抗体は Dako 社製を使用した。この抗体

には吸収の目的で加えたヒト immunoglobulin (Ig) が混入していた。このため抗ヒト IgG+IgA+IgM (Dako 社)-Sephacrose 4B column を作製し、これを通すことによりヒト Ig を除去した。ついで精製抗 C3 抗体を 20mg/ml に濃縮後、2% pepsin (W/V; Sigma 社) で分解し、F(ab)₂ 分画を得た。これを PBS(pH 8.4) で 1mg/ml の濃度に調製して 220-24K プレート(三光純薬)の各 well に 100 μ l ずつ分注し、4 $^{\circ}$ C、17 時間放置した。抗体を吸引除去し、200 μ l の 1% BSA-PBS (pH7.0) を加えて室温で 1 時間放置後、PBS で 3 回洗浄し、抗 C3 抗体付着プレートを作製した。

2.4.2 Solid phase anti-C3 assay による Ig クラス別 IC の測定

Pereira *et al.*⁹⁾ の方法に従って solid phase anti-C3 assay (aC3 assay) により IgG 型 IC を測定したが、さらに抗 IgA および抗 IgM 抗体を用い IgA および IgM 型 IC の測定も試みた。すなわち、検体を 10mM EDTA 加 1% BSA-PBS (pH7.0) で 21 倍に希釈し、抗 C3 抗体付着プレートの well に 100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C、2 時間保温した。この際、IgG、IgA および IgM 型 IC を同時に測定するため、3 枚の 220-24K プレートを用い、検体はいずれも duplicate で測定した。反応後 PBS で 3 回洗浄し、¹²⁵I 標識抗ヒト IgG、IgA、IgM 抗体を各プレートの well にそれぞれ 100 μ l (それぞれ 2 \times 10⁵ cpm になるように調製) ずつ加え、さらに 37 $^{\circ}$ C、2 時間保温後、再び PBS で 3 回洗浄し乾燥させたのち、各 well を切断してその放射活性を測定した。

2.4.3 各 Ig 型 IC の標準曲線

IgG 型 IC の標準試料は AHG で検討したが、IgA 型および IgM 型 IC 測定用の aggregated IgA および IgM の作製・定量化が困難なため、Clq assay で IC が 56 μ g/ml と著増を示した PBC 患者 (U.S. 例) の血清を標準とし正常血清で 1, 2, 4, 8, 16, 32 および 64 倍に希釈してそれぞれの Ig 型 IC の標準試料とした。この場合の IC 量の表示は加えた ¹²⁵I 標識抗 Ig 抗体の cpm に対する各検体の cpm、すなわち結合率 (%) で示した。原血清の各結合率は IgG 型 IC 5.76%、IgA 型 IC 2.55% および IgM 型 IC 9.48% であった。

2.5 血中 IC の精製とその性状の分析

2.5.1 対 象

Clq assay で血中 IC が高値を示した CAH 1 例 (S.Y. 例; 5.5 μ g/ml)、LC 1 例 (N.H. 例; 8.2 μ g/ml)、PBC 2 例 (U.S. 例; 56.0 μ g/ml、S.S. 例; 9.6 μ g/ml) および健康対照 (Y.H. 例; 0 μ g/ml) および SLE (M.Y. 例; 32.0 μ g/ml) 各 1 例の血清より以下の方法

で IC を精製し、その性状を分析した。

2.5.2 IC の精製

Kilgallon *et al.*⁹⁾ の方法に従い Clq 結合 IC を分離精製した。すなわち患者血清 20~50ml にその 1/2 容の trichlorofluorethane (Frigen, Hoechst) を加えて室温で 30 分間かくはん後、4 $^{\circ}$ C、3,000rpm で 15 分間遠心し、上 2/3 の脂質除去血清を得た。これに EDTA \cdot 2Na を終濃度 20mM になるように加え、さらに同量の 8% polyethylene glycol 6,000 (PEG) を加えた。ついで 4 $^{\circ}$ C、2 時間かくはん後 3,000rpm、30 分間遠心して得られた沈渣を PBS に溶解し、IC 粗分画とした。ついで抗 Clq 抗体を用いた affinity chromatography により IC の分画を試みた。抗 Clq ヤギ抗体 (Cappel 社) 5ml を CNBr-Sephacrose 4B 2g に結合させて作製した抗 Clq-Sephacrose (約 6ml) と IC 粗分画を混合し、4 $^{\circ}$ C、17 時間反転かくはん後 column (1.5 \times 3.5cm) に詰め、PBS で十分洗浄した。

ついで 20mM EDTA-1.5M NaCl を加えた PBS (pH7.0) を溶出液として IC を溶出し、さらに 3M KSCN を用いて未溶出の IC を溶出し、精製 IC とした。

これらの免疫化学的性状は免疫電気泳動法および Ouchterlony 法で検索し、高速液体クロマトグラフィー (HLC; SP8100, Spectra-Physics, USA) で分子量を検討した⁹⁾。

2.5.3 IC 中の抗体分画の採取とその性状

精製 IC を 3M KSCN に 4 $^{\circ}$ C、1 時間透析して抗原・抗体を十分分離させた後、HLC で分画した。すなわち 3M KSCN で平衡化した column G-3000 SWG (東洋ソーダ) に IC 溶液 1ml を添加し、流速 3.5ml/min で分画し、試料添加 20 分後より溶出液を 30 秒ずつ (1.75 ml) 採取して、O.D. 280nm で蛋白濃度を測定し、ただちに PBS に透析して十分に 3M KSCN を除去した。各ピークの分画をプールして各クラス Ig 濃度を嵐⁹⁾の方法のごとく RIA により測定し、抗体分画とした。

2.5.4 IC 中の抗体分画の抗体活性の検討

IC より分離精製した抗体分画は終濃度 0.5% となるように BSA を加え、必要に応じて 5~100 倍に minicon B-15 (Amicon 社) で濃縮し、抗体活性を検討した。

まず CAH および LC 血清の IC 中の抗体活性は HBs および HBe 抗体測定キット (Dainabot 社) を用いた。また食餌性抗原 (lactalbunin) および腸内細菌菌体成分 (LPS; E. coli 055: B5) に対する抗体の検索は松谷・赤保内¹⁰⁾の方法のごとく RIA により行なった。

つぎに PBC 血清の抗体活性は免疫組織学的にラット

腎および肝などの凍結切片を用いて蛍光抗体法（間接法）により検索した。

2.6 統計学的方法

本論文では2群の有意差の検定には Wilcoxon 検定を、相関係数の計算には Kendall の順位相関係数(r_k)を用いたが、一部 Pearson の相関係数を併記した。また相関の検定には Kendall の検定を用いた。

3 成 績

3.1 IC 測定 の 標準 曲線 と 再現 性

3.1.1 Clq assay

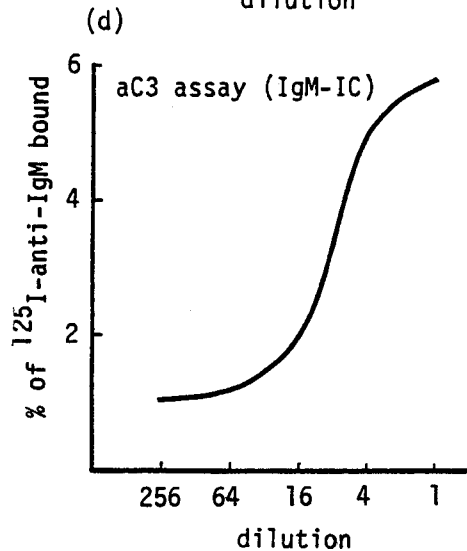
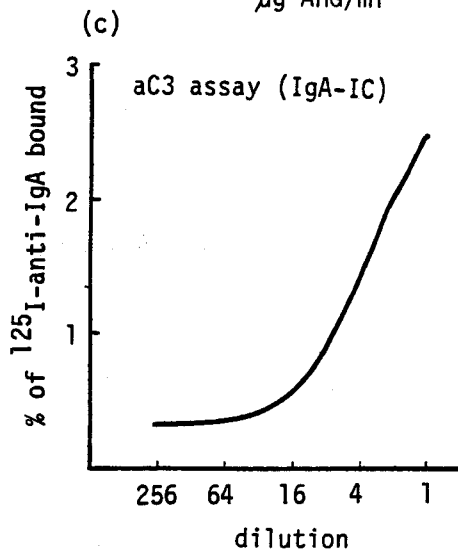
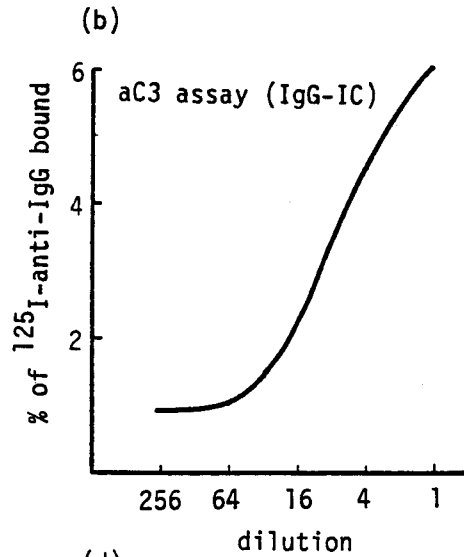
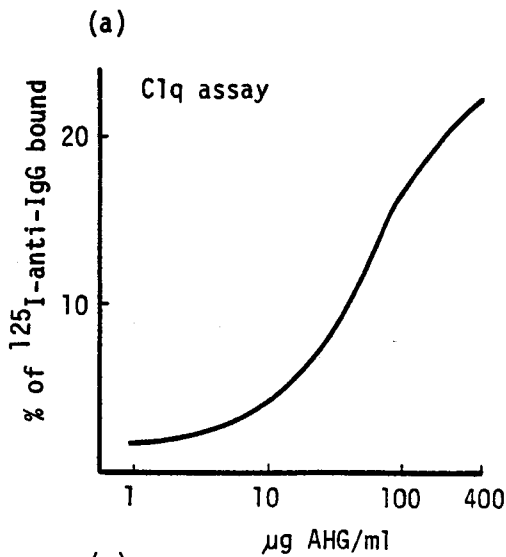


Fig. 1 Standard curves of serum IC levels determined by Clq solid phase radioimmunoassay (Clq assay) and solid phase anti-C3 assay (aC3 assay).

AHG を用いて IC 測定 の 標準 曲線 を作成 し、Fig. 1 (a) に示した。IC は AHG 相当量 で 2~400 $\mu\text{g/ml}$ の範囲 で測定 可能 であった。

この測定法の再現性を検討するため、健康対照、CAH および PBC 各 1 例の血清について、測定チューブに付着させる Clq および ^{125}I 標識抗ヒト IgG 抗体のロットを 5 回変え、interassay を施行した。

Table 1 に示すように測定下限に近い健康対照 IC 値の変動は大であったが、標準偏差(σ)は 2.30~4.75 $\mu\text{g/ml}$ と比較的狭い範囲にあり良好な再現性が得られた。

3.1.2 aC3 assay

Table 1 Interassay of serum IC levels determined by Clq solid phase radioimmunoassay (Clq assay) and solid phase anti-C3 assay (aC3 assay).

serum	No. tested	Clq assay IC ($\mu\text{g/ml}$)	aC3 assay (%)		
			IgG-IC	IgA-IC	IgM-IC
control	5	2.68 \pm 2.30	1.605 \pm 0.104	0.436 \pm 0.075	1.091 \pm 0.251
CAH	5	10.76 \pm 3.13	1.717 \pm 0.094	1.521 \pm 0.061	1.712 \pm 0.118
PBC	5	45.58 \pm 4.75	5.769 \pm 0.355	2.552 \pm 0.118	9.489 \pm 0.260

IC 高値を示した PBC 患者 (U.S.) 血清を正常血清で希釈し, Ig クラス別に測定した IC の標準曲線を Fig. 1 (b, c, d) に示した. この場合 IgG 型 IC 濃度は Clq assay で用いた AHG により $\mu\text{g/ml}$ で表示されるが, 用いた AHG 標準液は抗 C3 抗体との反応性が低く, 本測定法での IC 値はすべて第 2 反応に用いた ^{125}I 標識抗 Ig 抗体の結合率 (%) で表示した. いずれの Ig クラス測定系においても原血清から 64 倍希釈血清まで測定可能であり, この PBC 例血清を標準曲線作成に使用した.

再現性を検討するため, $3 \cdot 1 \cdot 1$ に準じて抗 C3 抗体

および ^{125}I 標識抗 Ig 抗体のロットを変えて interassay を施行した (Table 1). 健康対照および疾患時の IC 値の σ は 0.061~0.355 で, 良好な再現性が得られた.

3.2 健康対照および肝疾患患者における血中 IC 値

健康対照および肝疾患患者の血中 IC 値を Clq assay および aC3 assay で測定し, その平均値を Table 2 に一括し, 各測定値を Fig. 2, 3, 4 および 5 に図示した. また健康対照 IC 値の上限 (2σ 域) 以上に上昇したときを陽性とし, 各疾患における陽性率を Table 3 に示した.

Table 2 Serum IC levels in healthy controls and patients with various liver diseases determined by Clq assay and aC3 assay

subject	n	Clq assay IC ($\mu\text{g/ml}$)	aC3 assay (%)		
			IgG-IC	IgA-IC	IgM-IC
healthy control	37	2.41 \pm 2.20	1.36 \pm 0.58	0.39 \pm 0.10	1.11 \pm 0.41
AH	12	3.57 \pm 2.92	1.57 \pm 0.49	0.52 \pm 0.21*	1.80 \pm 1.52
CIH	6	3.52 \pm 4.44	2.03 \pm 0.80	0.50 \pm 0.14	2.18 \pm 2.40
CAH	20	4.67 \pm 5.05	1.98 \pm 0.69**	0.63 \pm 0.24**	2.59 \pm 2.13**
LC	19	6.23 \pm 4.60**	3.21 \pm 1.90**	1.38 \pm 0.80**	4.29 \pm 3.26**
primary hepatoma	10	2.73 \pm 2.58	2.36 \pm 1.01**	0.96 \pm 0.63**	1.97 \pm 1.73
PBC	8	10.70 \pm 18.98	2.50 \pm 1.62*	0.87 \pm 0.73**	3.88 \pm 2.66**

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Table 3 Incidence of elevated serum IC levels in patients with various liver diseases

subject	n	Clq assay IgG-IC	aC3 assay		
			IgG-IC	IgA-IC	IgM-IC
AH	12	2*(16.7%)	0*(0.0%)	5*(41.7%)	2*(16.7%)
CIH	6	1(16.7%)	3(50.0%)	1(16.7%)	2(33.3%)
CAH	20	5(25.0%)	4(20.0%)	10(50.0%)	10(50.0%)
LC	19	6(31.6%)	9(47.4%)	17(89.5%)	14(73.7%)
primary hepatoma	10	0(0.0%)	4(40.0%)	5(50.0%)	3(30.0%)
PBC	8	3(37.5%)	3(37.5%)	3(37.5%)	6(75.0%)

* Number means elevated cases of IC over the upper limit of normal value.

3・2・1 Clq assay による血中 IC 値

健康対照における血中 IC 値は $2.41 \pm 2.20 \mu\text{g/ml}$ で変動域は $0 \sim 7.4 \mu\text{g/ml}$ であった。

これに対して肝疾患患者の IC 値を比較すると、LC のみ有意の増加 ($p < 0.01$) が認められた。しかし CAH および PBC でも Fig. 2 に示すように高値を示す例が認められ、CAH 5 例 (25%)、PBC 3 例 (37.5%) に陽性であった。一方、AH では 2 例 (17%) で、原発性肝癌では陽性例は認められなかった。

3・2・2 aC3 assay による Ig クラス別血中 IC 値

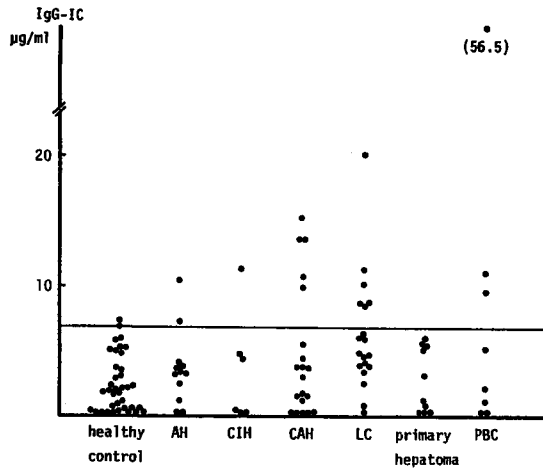


Fig. 2 Serum IC levels in patients with various liver diseases determined by Clq assay (The solid line denotes the upper limit of normal IC level.)

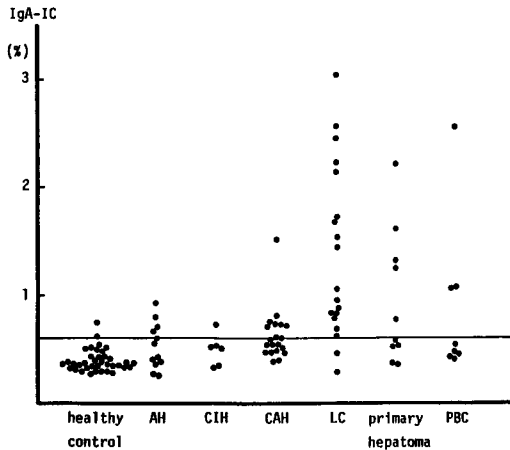


Fig. 4 Serum IgA-IC levels in patients with various liver diseases determined by aC3 assay (The solid line denotes the upper limit of normal IC level.)

健康対照の血中 IC 値は IgG 型 $1.36 \pm 0.58\%$ 、IgA 型 $0.39 \pm 0.10\%$ および IgM 型 $1.11 \pm 0.41\%$ で変動域はそれぞれ $0.53 \sim 3.13\%$ 、 $0.27 \sim 0.74\%$ および $0.37 \sim 2.05\%$ であった。

肝疾患患者についてみると AH では健康対照に比較し、IgA 型 IC の有意な増加 ($p < 0.05$) が認められたが、CIH ではいずれの Ig クラスの IC にも有意差は認められなかった。一方、CAH および LC ではすべての Ig クラス IC に有意な増加 ($p < 0.01$) がみられ、PBC でもほぼ同様な成績が得られた。また原発性肝癌では

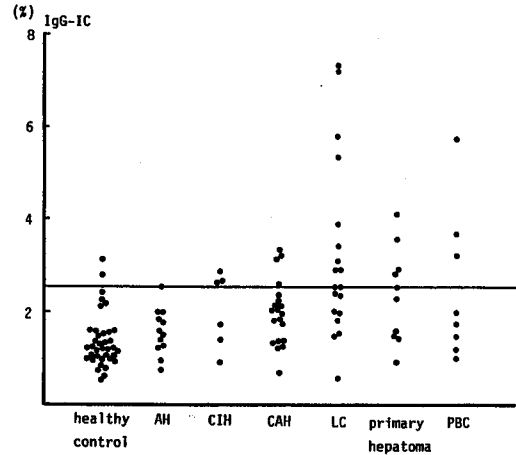


Fig. 3 Serum IgG-IC levels in patients with various liver diseases determined by aC3 assay (The solid line denotes the upper limit of normal IC level.)

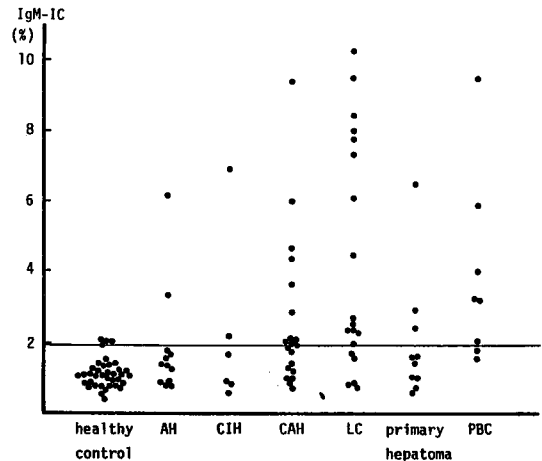


Fig. 5 Serum IgM-IC levels in patients with various liver diseases determined by aC3 assay (The solid line denotes the upper limit of normal IC level.)

IgG 型および IgA 型 IC のみ有意な増加 ($p < 0.01$) がみられた。

つぎに陽性率でみると本測定法が Clq assay より一般に陽性率が高い傾向がみられた。AH では IgA 型 IC 5 例 (42%)、CIH では IgG 型 IC 3 例 (50%) が陽性であるが、Fig. 3, 4 に示すように IC 値としてはそれほど高値ではない。一方 CAH および LC では IgG 型 IC の陽性率は Clq assay に類似するが IgA 型 IC は LC で著明に高値であり、IgM 型 IC は CAH, LC で著明な増加を示した (Fig. 5)。原発性肝癌ではいずれの Ig クラス IC も 40~50% で陽性であったが、IgA 型 IC の増加傾向がみられ (Fig. 4)、また PBC では IgM 型 IC が 6 例で陽性を示し、Clq assay では検出されない IC が測定され注目された。

3.3 Clq assay および aC3 assay による各 IC 値間の関連性

今回測定した健康対照を含む全対象例について Clq assay による IgG 型 IC 値および aC3 assay による Ig クラス別 IC 値間の順位相関係数 (r_k) を求めて Table 4 に示した。また括弧内に Pearson の相関係数を併記した。その結果、すべての IC 値間に相関係数 0.24~0.48 と低値ではあるが、有意の相関 ($p < 0.01$) を認めた。しかし、Clq assay および aC3 assay において同じ IgG 型 IC を測定しているにもかかわらず相関係数は 0.30 であり、両測定法により異なった性状の IC を測定している可能性が示唆された。

3.4 血中 IC 値と HB 抗原・抗体との関連性

PBC を除く肝疾患患者について HBs および HBe 抗原・抗体を検索しえた例について血中 IC 値との関連性を検討した。

HBs 抗原・抗体に関して、両者とも陰性 (-/- 群) 19 例、抗原のみ陽性 (+/- 群) 25 例および抗体のみ

Table 4 Rank correlation coefficients among serum IC levels determined by Clq assay and aC3 assay

		aC3 assay		
		IgG-IC	IgA-IC	IgM-IC
Clq assay		0.30*	0.27*	0.24*
		(0.45)†	(0.46)	(0.47)
aC3 assay	IgG-IC	—	0.40*	0.42*
	IgA-IC	—	(0.52)	(0.61)
		—	—	0.48*
				(0.77)

* $p < 0.01$

† Pearson's correlation coefficient in parenthesis

陽性 (-/+ 群) 17 例の 3 群に分けてそれぞれの IC 値を比較し、Fig. 6 に示した。Clq assay では -/- 群および +/- 群の IC に比較し +/- 群では有意の増加 ($p < 0.01$, $p < 0.05$) がみられ、また aC3 assay における IgM 型 IC は +/- 群で有意の増加 ($p < 0.01$) がみられた。 +/- 群では IgG 型 IC が高値を示す例があったが有意差はなく、IgA 型 IC については 3 群とも類似の値を示し有意差は認められなかった。以上の成績より HBs 抗原陽性例で IC が高値を示すことが示された。

つぎに HBe 抗原・抗体についても同様に 3 群に分けて比較すると、Fig. 7 に示すごとく、IgM 型 IC でのみ -/- 群と +/- 群の間に有意差 ($p < 0.05$) が認められたが、IgG 型 IC (Clq assay および aC3 assay)、IgA 型 IC とも有意差は認められず、IgM 型 IC を除いては HBe 抗原・抗体と IC の関連性は明らかでなかった。

3.5 臨床像と血中 IC 値との関連性

3.5.1 検査成績との関連性

CIH, CAH, LC 患者についての血清 Ig 濃度, C3-C4 濃度, GOT, GPT, γ -GTP, ICG, ZTT の各値と血中 IC 値間の順位相関係数 (r_k) を求め Table 5 に示した。

Ig 濃度との関連性をみると、IgG 型 IC (Clq assay) と IgG は有意の相関 ($r_k = 0.41$, $p < 0.01$) を示し、また IgG 型 IC (aC3 assay) と IgA および IgM の間にもそれぞれ $r_k = 0.38$, $r_k = 0.33$ と有意の相関 ($p < 0.05$) を認めた。

血清補体濃度との関連性をみると、IgA 型 IC は C3, C4 と両者とも $r_k = -0.39$ で有意の負の相関 ($p < 0.05$) を示した。

肝機能検査では GPT が IgG 型 IC (Clq assay および aC3 assay) の両者とそれぞれ $r_k = -0.25$, $r_k = -0.23$ で有意の負の相関 ($p < 0.05$) を示した。ICG と IgG 型 IC (Clq assay) は $r_k = 0.42$ ($p < 0.05$) で有意の相関を示した。ZTT と各 Ig クラス IC 値との間には、IgG 型 IC (Clq assay) 0.31 ($p < 0.01$)、IgG 型 IC (aC3 assay) 0.34 ($p < 0.01$)、IgA 型 IC 0.38 ($p < 0.01$)、IgM 型 IC 0.47 ($p < 0.01$) といずれも有意の相関を認めた。つまり IC の増加は ZTT 値上昇の要因の一つであることが示唆された。

つぎに PBC 患者血清について IC 値と AMA との関連性を検索したが、いずれも有意な相関は認められなかった。

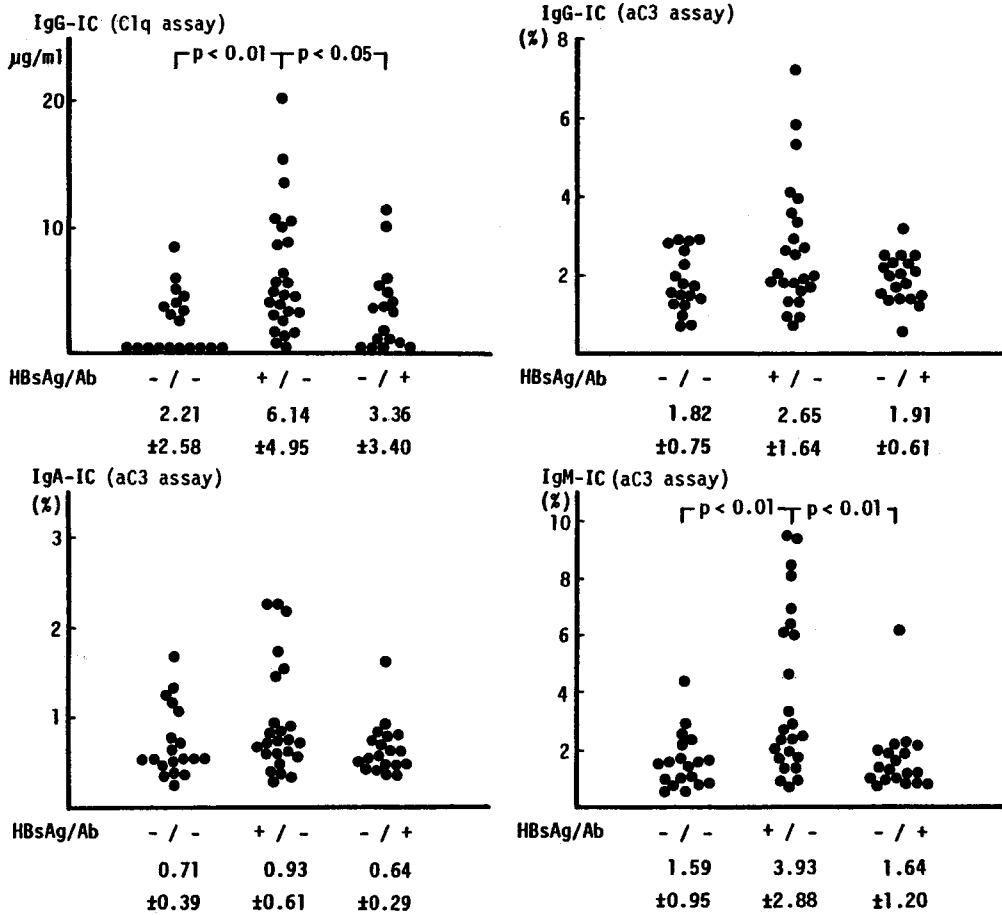


Fig. 6 Serum IC levels in patients with or without HBsAg and Ab

3・5・2 2・3 の症例についての検討

ルポイド肝炎例(48歳女)では Raynaud 症状、関節痛とともに肝機能障害を指摘され、LE 細胞陽性、抗 DNA 抗体陽性、C3 50mg/dl、HBs 抗原および抗体いずれも陰性、高γグロブリン血症(2.1g/dl)、肝生検組織で CAH の像がみられ、ルポイド肝炎と診断された。ステロイド療法で十分には改善をみず、その時点で aC3 assay によると IgG 型 IC 2.92%、IgA 型 IC 1.15% および IgM 型 IC 2.56% と IC 高値を示した。なお肝細胞膜抗体陽性であったが、その titer と IC の消長には関連性を認め難かった。

つぎに B 型急性肝炎例(31歳男)における経過に伴う IC の変動を Fig. 8 に示した。GPT 値が低下する時期に、Clq assay および aC3 assay による IgG 型 IC は急激に一時低下し、再び上昇して以後プラトとなった。これに対して IgA 型 IC はやや遅れて減少し、再上昇した。また IgM 型 IC は IgG 型 IC が最も低下した時

Table 5 Rank correlation coefficients of serum IC levels among immunoglobulins, complements and liver function tests in patients with CIH, CAH and LC

	Clq assay IgG-IC	aC3 assay		
		IgG-IC	IgA-IC	IgM-IC
IgG	0.41**	0.26	0.12	0.28
IgA	0.21	0.38*	0.24	0.30
IgM	0.15	0.33*	0.17	0.23
C3	-0.17	0.06	-0.39*	-0.22
C4	-0.08	-0.35	-0.39*	-0.23
GOT	-0.19	-0.06	0.10	-0.01
GPT	-0.25*	-0.23*	-0.07	-0.14
γGTP	-0.21	0.00	-0.03	-0.22
ICG	0.42*	0.21	0.25	0.13
ZTT	0.31**	0.34**	0.38**	0.47**

* p<0.05 ** p<0.01

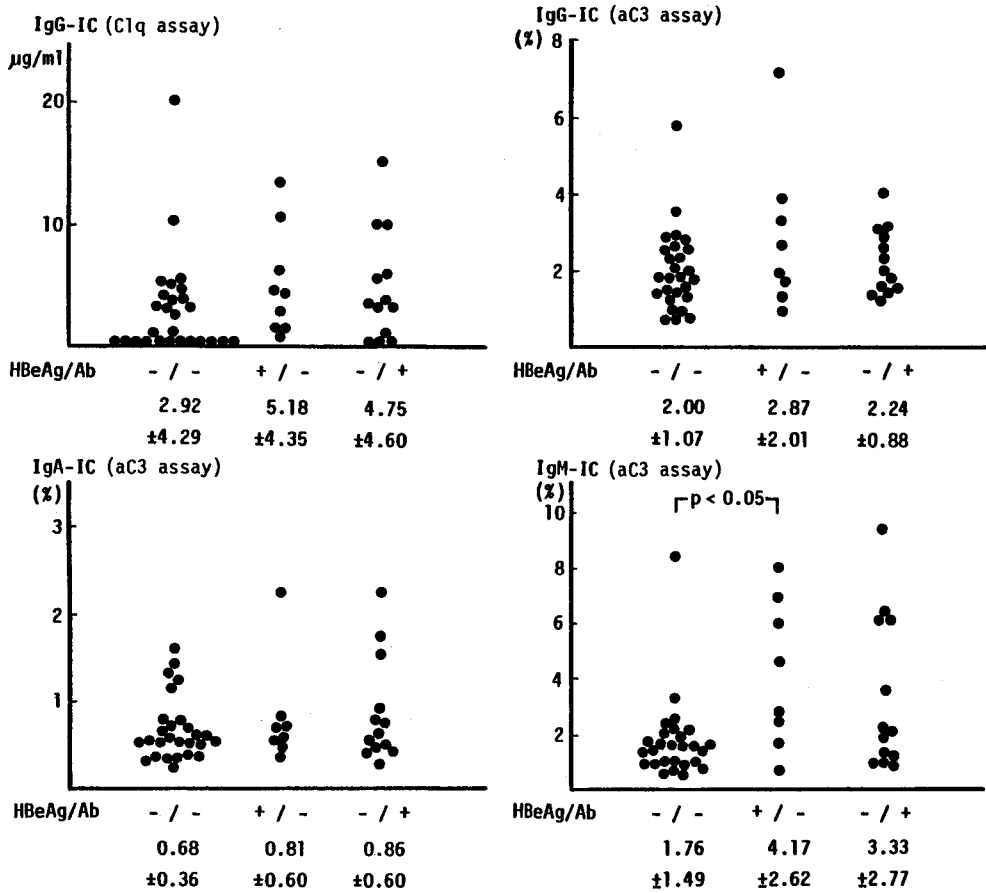


Fig. 7 Serum IC levels in patients with or without HBeAg and Ab

期にピークに達し、以後減少の一途をたどり、異なる態度を示した。

さらにCAHの例(23歳女; Fig. 9)ではGOT, GPTのシェーブをくり返していたが、OK 432投与によりHBe抗原は陰性化した。seroconversionをみるに至らず、一方HBs抗原は持続陽性を示した。1982年以後もしばしばグリチルリチン投与によりGOT, GPTは減少したが、HBs抗原価はしだいに低下し、プレドニゾン間歇投与によりHBs抗原は陰性化し、一時また陽性となったが最近は全く陰性を維持している。それに伴ってIgG型IC, IgA型ICはしだいに低下したが、IgM型ICはHBs抗原再出現の直前に上昇を示し、以後低下した。

以上2例のB型肝炎においては急性期または慢性肝炎における増悪期にIgM型ICが増加する傾向が推測された。

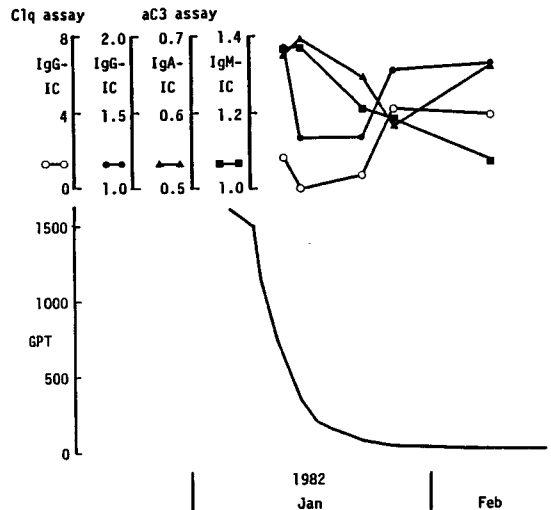


Fig. 8 Relationship between IC levels and clinical course
Case: T. T. acute hepatitis B

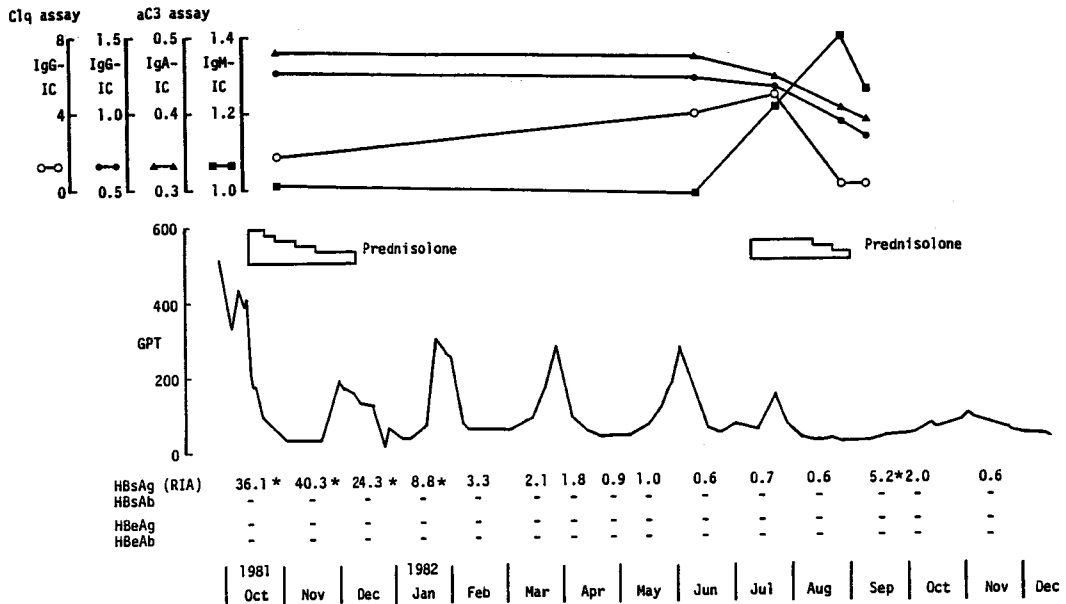


Fig. 9 Relationship between IC levels and clinical course
Case: S.K. chronic active hepatitis B
(* HBsAg positive; more than 5.0)

3-6 ICの分子性状と抗体活性

3-6-1 ICの分子性状

抗Clq-Sepharose columnを用いてPEGで処理したICを分離するとFig. 10に示すごとく、溶出緩衝液として0.02M EDTA加1.5M NaCl溶液を用いた場合はICの中のClqと抗原・抗体結合部が解離して抗原・抗体 complexが溶出され、また3M KSCNを用いて溶出すると抗ClqとClqおよび抗原と抗体の結合が解離し溶出される。

まず抗Clq-Sepharose columnから溶出されたU.S.例(PBC)のICを免疫電気泳動法およびOuchterlony法で検討しFig. 11に示した。このIC分画にはIgG, IgMおよびIgAが認められ、少量のClqおよびalbuminも認められる。免疫電気泳動像ではIgGおよびIgAの沈降線が明瞭であり、IgGのarcは曲率半径

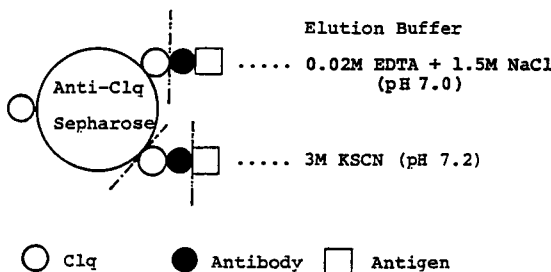


Fig. 10 Purification of IC by affinity chromatography using anti-Clq Sepharose column

が小さく通常のIgGよりも分子量が大きい。しかし他の血清蛋白成分の沈降線はほとんど認められなかった。

一方、溶出されたICをPBSを用いてHLCで分析すると、Fig. 12に示すように大部分はvoid volumeに位置するが、他に2つの小さなピークが認められる。これらのピークを分子量の大きい順からI分画、II分画およびIII分画とし、正常血清蛋白分画に比較するとI分画は分子量(MW)50万以上、II分画はMW 30~35万、III分画は17~22万に相当すると考えられる。一方、同一濃度のICを3M KSCNで処理して抗原・抗体を解離させてHLCで分画すると、上記の無処理のICと分画パターンは等しいが、II分画の著明な増加が認められた。しかしIgGやalbuminに相当するMWの蛋白はみられなかった。

健康対照(Y.H.例)、CAH(S.Y.例)、LC(N.H.例)、PBC(S.S.例)およびSLE(M.Y.例)血清よりICを採取し、3M KSCN処理を施してHLCで分画し、それらの分画像を比較してFig. 13に示した。HLCに添加するIC濃度が必ずしも一定でないため各ピークの高さに差がみられるが、SLEでalbuminに相当する位置にピーク(IV分画)が認められる以外は各症例ともほぼ同一部位にI, IIおよびIII分画が認められた。しかし健康対照では相対的にII分画が低く、CAH, LCおよびPBCではそれが高い傾向を示した。さらにSLEではIII分画が相対的に高値を示し、新たにIV分画が認

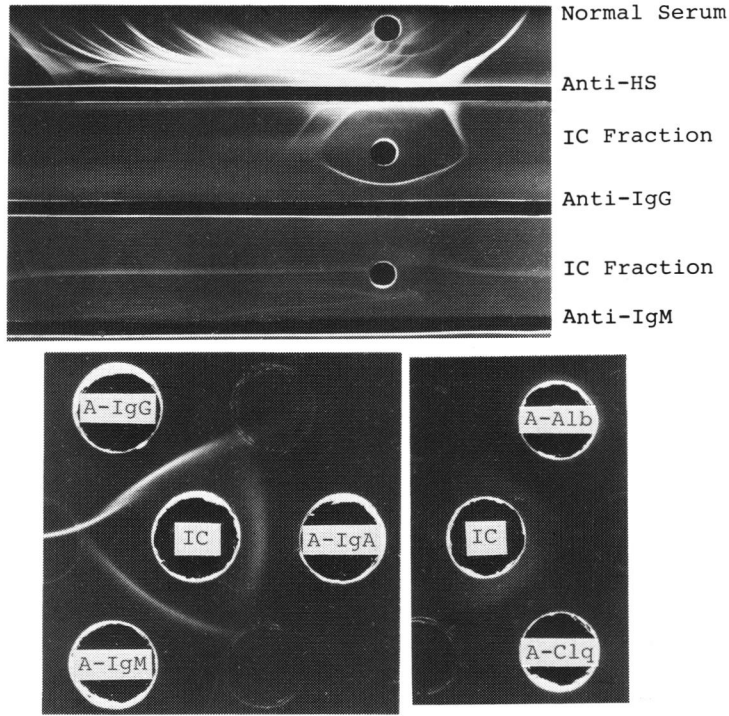


Fig. 11 Characterization of IC fraction by immunoelectrophoresis (top) and Ouchterlony's method (bottom)

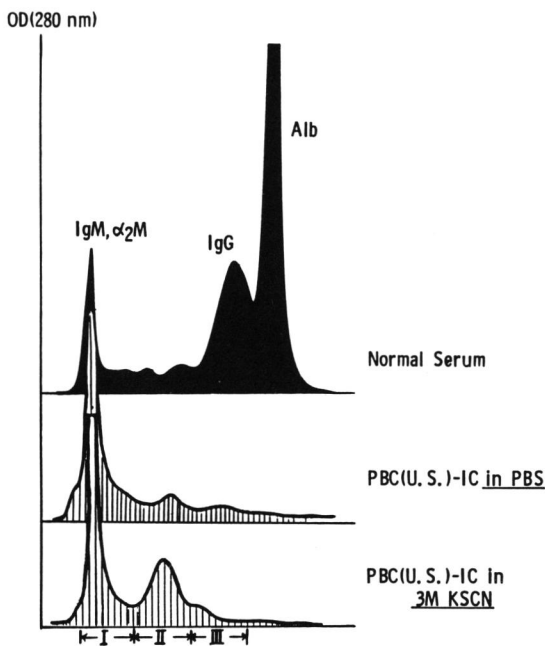


Fig. 12 Fractionation of IC by high speed liquid chromatography (HLC) in a patient with PBC (case: U.S.)

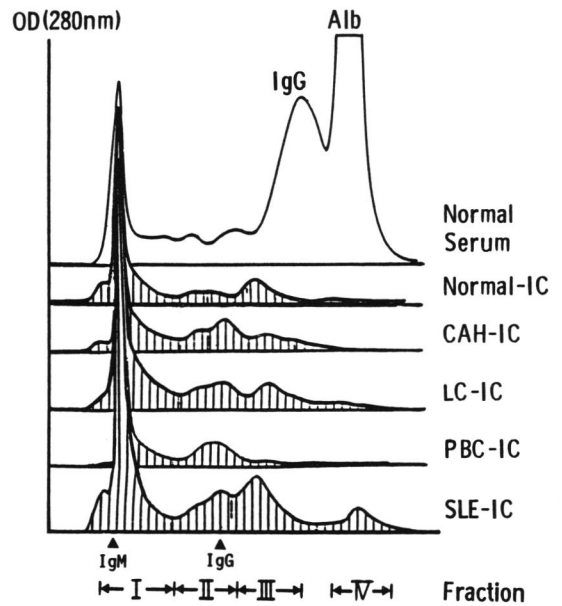


Fig. 13 Fractionation profiles of IC obtained from sera of various patients by HLC in 3M KSCN solution (normal: Y. H., CAH: S. Y., LC: N. H., PBC: S. S. and SLE: M. Y.)

められた。CAH, LC および PBC 2 例についてそれぞれの分画中の Ig 濃度をクラス別に RIA で測定し、すべての症例で I 分画は IgM, II 分画は IgG が主体であり, III 分画の Ig は微量で一定した傾向はみられず, また IgA は微量で I 分画に認められた。すなわち抗原・抗体解離によって増加する II 分画には IgG が多く含まれていることが示された。I 分画は O.D. (280nm) ではピークが高いが, Ig 濃度は II 分画より低く, 抗原を含む Ig 以外の蛋白の混在が示唆された。

以上の成績より抗 Clq 抗体結合 column より得られた IC は IgG を主体とする高分子蛋白であるが, 3M KSCN 処理によって IgG を含む MW 30~35 万の II 分画の増加が認められた。この IgG は正常 IgG より MW が大きい, 抗原・抗体反応の解離によって増加した分画であり, IC 中の抗体分画であることが示唆された。

3-6-2 IC 中の抗体活性について

CAH, LC および PBC の IC より得られた II 分画の抗体活性を検討した。CAH および LC 患者とも HBs および HBe 抗原陽性例であったが, Table 6 に示すごとく LC 患者の II 分画に HBs 抗体活性が弱陽性を示し, IC 中に IgG 型 HBs 抗体が存在することが明らかにされた。しかし HBe 抗体については証明し得なかった。

また, lactalbumin や LPS のごとく腸管粘膜を経由する抗原に対する IgG 型抗体価を測定すると, Table 7 に示すごとく健康対照に比較し, CAH および LC で著

明に高値を示し, PBC では軽度の高値を示した。とくに LC では II 分画の IgG 濃度が低いにもかかわらず高い抗体価がみられた。

PBC 患者血清の AMA は U.S. 例 80× および S.S. 例 1,280× と陽性であったが, 両者の IC の II 分画中の AMA はラット腎を用いた蛍光抗体間接法では証明されなかった。しかし S.S. 例では Fig. 14 に示すごとく, ラット細胆管上皮に親和性をもつ IgG 型抗体が検出された。しかしこの II 分画は肝細胞・腎組織および消化管粘膜とは反応を示さなかった。

4 考 察

肝疾患患者の血中 IC を Clq assay および aC3 assay で Ig クラス別に測定し, それぞれの測定値の関連性を検討し, CAH, LC および PBC では血中 IC の著明な増加がみられ, 疾患により Ig クラス別 IC の増加が認められた。さらに抗 Clq-affinity column を用いてこれら患者血清より IC を分離し, その分子性状を検討すると, IC 中の抗体は IgG 型が主体で通常の IgG より分子量(MW)が大きく, CAH, LC では HBs 抗原, 外来性抗原に対する抗体, また PBC では細胆管上皮に対する抗体活性を保有することが明らかにされた。以下主要項目別に考察を加える。

4-1 IC 測定法の問題点について

IC の測定法は多数あるがその簡便性および再現性から補体系を利用する方法, とくに Clq^{4,11,12} および C3 receptor^{5,13,14} を利用する IC 測定法が用いられている。本研究では Hay *et al.*⁴⁾ の Clq solid phase RIA と Pereira *et al.*⁵⁾ の solid phase anti-C3 assay を検討したが, 彼らの報告とはほぼ一致する良好な測定成績が得られた。Clq assay では DNA, CRP, endotoxin, heparin などが測定値に影響を及ぼすといわれている¹⁵⁾ が, Hay *et al.*⁴⁾ の方法では原理上その影響は小さいとされている。また Clq の精製は従来 EDTA, EGTA 溶

Table 6 Antibody activity against HBs and HBe antigens in fraction II of immune complexes obtained from patients with chronic liver diseases

Source of IC	CAH	LC
HBsAb (RIA)*	1.0	2.2
HBeAb (RIA)**	10%	27%

* HBsAb was positive over 2.0 of cut off index.

** HBeAb was positive over 70% of inhibition.

Table 7 Antibody activity against lactalbumin and LPS (*E. coli*, 055 : B5) in fraction II of immune complexes obtained from patients with liver diseases and control

Source of IC IgG levels of Fr. II ($\mu\text{g/ml}$)	Normal	CAH	LC	PBC (US)	PBC (SS)
	20	20	2.5	24	11
Titer of antibodies against					
Lactalbumin (cpm)	410	4,532	3,770	865	549
LPS (cpm)	387	4,299	4,021	1,216	999

Titer of antibodies against lactalbumin and LPS was determined by solid phase radioimmunoassay using ¹²⁵I-anti-IgG, and expressed as counts per minute (cpm)

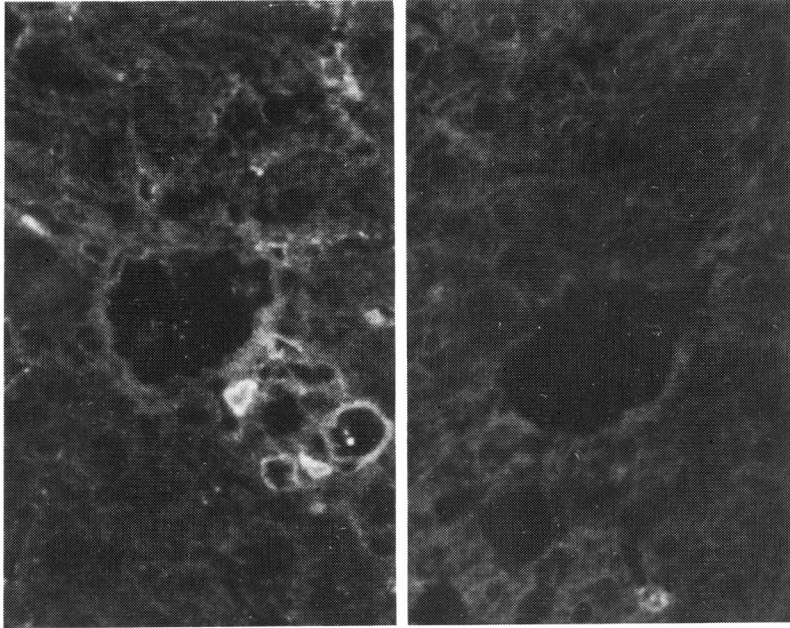


Fig. 14 Antibody activity in fraction II (IgG) obtained from IC in serum from a patient with PBC (Case: S. S.) was investigated by indirect immunofluorescent method using rhodamine-labelled anti-human IgG and rat liver (200 ×).

left: positive in epithelial cells of the bile duct
right: negative (control)

液で透析する Yonemasu and Stroud¹⁶⁾の方法が用いられているが、それに比較して本法で用いた Kolb *et al.*⁶⁾の Clq 精製法では aggregated IgG と結合活性が高い Clq が得られ、Clq inhibitor の混入が少なく、IC との結合率も高いと考えられる。そのうえ保存血漿より一時に大量精製可能であり、実際に測定を行なう場合に非常に有利であった。

一方 IC に結合している C3 を利用する方法としては Raji cell assay¹³⁾ が広く用いられている。Raji cell には細胞表面に C3b と C3d receptor があり C3 assay には好都合であるとされているが、著者らが試みた結果では細胞表面の receptor の状態を実験ごとに同一にすることが困難で、しばしば再現性に問題があり、また細胞の増殖程度により検体数が制限される場合もあり、必ずしも良好な測定成績が得られなかった。そこで本研究では固相化した抗 C3 抗体を用いて測定したが、再現性も良く、一時に多数の検体を測定することが可能であった。しかも本法は Clq assay とは異なり、alternate pathway¹⁷⁾を介した IgA 型 IC も測定可能であり、第 2 抗体である ¹²⁵I 標識抗 Ig 抗体の Ig クラスをかえることにより、各検体について IgG 型、IgA 型お

よび IgM 型 IC を測定することができた。しかし IgG 型 IC の標準試料として AHG を用いるべく検討したが、AHG と抗 C3 抗体の結合が良好でなかったため、IC 高値を示した PBC 患者血清を希釈して標準試料とした。また IgA 型および IgM 型 IC の場合にもこの患者血清が高値を示したことからそれらの標準試料として用いた。

血中 IC は測定法の相違により疾患における陽性頻度や IC 値に差異がみられ、疾患の活動性などとの関連性にも異なる態度がみられる¹⁸⁾。本研究でも Clq assay と aC3 assay の測定値間にはそれぞれ有意の相関を認めしたが、それぞれの相関係数は必ずしも高くはなく、解離を示す症例が少なからず認められた。しかも同じ aC3 assay でも後に述べるごとく Ig クラス別にみて疾患に特徴的な IC の増加が認められ、測定法の差異により性状の異なる IC を測定している可能性が示唆された。またこれらの成績から血中 IC はその分子性状のうえで多様であることが示唆された。この場合抗原抗体比が重要であるが、抗原の大きさ、抗原決定基、抗体の Ig クラス、力価および抗原親和性、さらに補体系や網内系の活性によって IC の分子性状が多様であるといわれて

いる¹⁹⁾。WHOの協同研究²⁰⁾においても各種測定法の特徴により検出されるICには差があるという結論が得られ、現在ではいくつかの測定法を組み合わせるICの検出を図ることが望ましいが、特異性・感度・再現性にすぐれ、Igクラス別ICを容易に測定し得る方法を開発することが今後の課題といえよう。

4.2 病態との関連性について

さて肝疾患患者における血清IC値についてみると、Clq assayによるICはLCで最も高く、これまでの報告^{13,21)}に類似するが、CAH、原発性肝癌およびPBCでもaC3 assayによりIgG型ICの有意な増加がみられ、従来の報告²²⁾とはほぼ一致する成績が得られた。さらに本研究ではIgクラス別にICを測定し、LCではIgA型およびIgM型ICの陽性率がIgG型ICよりかなり高率であり、またCAHおよびPBCではIgM型ICの陽性率および値が高く、疾患別にIgクラス別IC増加に特徴がみられた点は従来の報告にはみられない成績として注目された。

ICの臨床病理学的意義について考察するとTheofilopoulos *et al.*¹³⁾はIC値はtransaminase値と平行し、肝炎の活動期と関連性があると報告し、Thomas *et al.*²¹⁾もCAH、LCおよびPBCでとくにICの増加を認めることから肝疾患の重症度と関連があると述べ、また辻²³⁾は肝組織病変の活動性と良く相関するとし、さらにPBCでは抗ミトコンドリア抗体(AMA)価、Ig濃度および肝組織所見と平行してICの増加を認めている^{22,24)}。また今回ICの増加とICGの関係からも肝病態の活動性・進展に関連性があるものと推測される。

急性肝炎で経過を追ってICの変動を観察したThomas *et al.*²¹⁾の成績ではICの増加はGPT高値を示す病初期と回復期に二峰性ピークが認められると報告しているが、本研究でも1例の観察ではあるがB型急性肝炎でIgG型ICは二峰性変化を示した。さらにこの例ではIgM型ICはGPTと類似の変化を示し、ICの変動はIgクラス別に異なった態度をとることが推測された。

慢性肝疾患において各種肝機能検査とIgクラス別IC値を比較すると、ZTTはいずれのIC値とも強い相関性が認められ、また血中IgG濃度とClq assayによるIgG型ICとの間に相関関係が認められ、血中ICの出現もZTT上昇に影響を及ぼす因子であると推測される。一般的にSLEでは血中ICと補体とは負の相関を示す傾向にある²⁵⁾が、慢性肝疾患では補体の変動はほとんど認められなかった。ただし補体が活性化されている

か否かはintactなC3およびC4の蛋白量をみるだけでなく代謝をうけたC3dを測定することが重要である²⁶⁾。

血清GPTとIC値との間には有意の負の相関を示したが、両者の消長に時相の差があることが推測された。またICを経過を追って観察しえたCAHの1例において、治療によりGPTのシュープがしだいに減衰するにつれてIgG型ICは減少傾向を認めた。しかしIgM型ICの動向はこれと異なりシュープに先立ち一過性に増加を認めた。辻²³⁾は急性増悪の1~3週間前および後にICが増加し、GPT上昇極期にはむしろICが低値を示す二峰性のパターンがみられると報告し、急性増悪前のIC形成が肝細胞障害性に関連し、免疫複合体病の一面を示唆するとしている。

一方、本研究によりLCではIgA型ICが高いことが示されたが、LCでは腎糸球体²⁷⁾や肝組織のsinusoidに顆粒状のIgA depositが証明²⁸⁾され、慢性肝疾患と免疫複合体病との関連を検討する上に興味深い所見である。しかし今回の成績では血中IC高値を示したLC患者には著明な蛋白尿は認められず、さらに検討を要するものと考えられる。

4.3 HB関連抗原との関連性について

HB関連抗原・抗体とICの関連はAlmeida and Waterson¹⁾がIC沈降物中から電子顕微鏡的にHB抗原および抗体を証明して以来、B型肝炎の病態像およびHB抗原の消長と血中ICの動態には関連性のあることが主張され^{2,21)}、とくに最近ではIC分子中にHBs抗原の存在が直接証明されている^{29,30)}。

今回HB関連抗原とICの関係を検討すると、HBs抗原陽性群のIgG型およびIgM型ICはHBs抗原抗体陰性群およびHBs抗体陽性群より有意な増加がみられた。また、HBe抗原に関してはIgM型ICのみHBe抗原陽性群で高値を示した。辻²³⁾はB型肝炎と非B型肝炎の間にはIC値に差はみられず、むしろ組織病変の活動性に相関すると述べているが、その成績を吟味するとCAH、LCに関する限り、HBs抗原陽性群が陰性群よりIC高値を示している。

HBs抗原陽性群のICが抗体陽性群よりも高値を示す点については、ICがHBs抗原・抗体から構成されると仮定すると、抗原・抗体比による可溶性ICの形成とその被貪食性に関連性があると考えられる。Steffelaar *et al.*³¹⁾は実際にHBs抗原と抗体を種々の比率で加えてICを作製し、末梢血の多核白血球への取り込みを観察し、抗原・抗体比が8以上の抗原過剰域では貪食能が認められなくなったとしているが、抗体過剰域で作られる不溶性ICが速やかに網内系で貪食されるのに対

して、抗原過剰域で形成される IC は処理されがたく血中 IC として存在することが知られている³²⁾。したがって HBs 抗原陽性群において IC が高値であることは、少量の抗体は産生されるが、抗原過剰の IC が形成されていると推測される。事実、本研究において HBs および HBe 抗原陽性で抗体陰性を示す LC 患者血清の IC 中には微量ではあるが HBs 抗体が証明されたことからこの現象を支持しえよう。

Almeida and Waterson¹⁾ は HBs 抗体産生のない場合には HBV carrier となり、少量の抗体が産生される場合には IC を形成して CAH に進展しやすく、大量の抗体産生をみる場合には劇症化すると述べているが、劇症肝炎と IC の関係は未だ結論は得られていない³³⁾。

4・4 血中 IC の分析について

次に肝疾患の病態と血中 IC の関連性を考える上で IC の性状、すなわち IC の大きさや IC を構成する抗原・抗体の分析が重要な課題である。そこで本研究では Kilgallon *et al.*⁸⁾ の方法に従って抗 Clq 抗体に結合する IC を分離し、その性状および IC 中の抗体活性について検討した。

患者血清より IC を分離する場合補体を利用する方法が用いられるが Clq は活性を保持させたまま immuno-adsorbent column にすることは困難であり、また反復使用できないため、本研究では抗 Clq 抗体を結合させた affinity column を用い精製した。さらに前処置として PEG を終濃度 4% にして IC rich 分画を得ているので free Clq の混入や Clq に親和性を有する CRP, LPS など IC 分離に影響を及ぼす他の要因を除去することができる。このようにして得られた IC の性状は IgG および IgM を含む分子量の大きい蛋白で、Clq, albumin など他の血清蛋白の混入はきわめて少なく IC 精製法としてすぐれていることが明らかにされた。

IC 中の抗原・抗体は酸性条件下 (pH 2.6-3.0) で解離させ、protein A-Sepharose を用いて抗体を回収する方法が推奨されているが³⁴⁾、protein A は pH 5.0 以上の条件でなければ IgG と結合せず、この方法では抗体が得られなかった。したがって本研究では抗原・抗体解離に 3M KSCN を用い、HLC により抗体分画の採取を試み成功した。

IC を PBS を用いて HLC で分画すると大部分は void volume にみられるが、MW 30~35 万に II 分画およびさらに MW の小さい III 分画が小さなピークとして認められる。しかし同一濃度の IC を 3M KSCN で解離させて分画すると、II 分画の増加が著明で、しかもこの分画に IgG が相対的に高濃度に認められ、IC から解離

した IgG 抗体の存在が示唆された。II 分画の溶出部位は IC の試料が異なってもほとんど変わらず、通常の IgG より MW が大きいのが、この理由は IgG の重合、補体との結合および一部の抗原との結合等が考えられるが、免疫化学的分析に十分な蛋白量が得られず、明らかにし得なかった。III 分画は MW 17~22 万と考えられるが、Ig の含量はきわめて少なく、疾患によりピークの高さに変動がみられたことから解離した抗原が含まれると推測されるので、今後の検討が必要である。

このようにして得られた IgG 抗体が含まれる II 分画を用いて、食餌性抗原、LPS、HB 抗原など外来性抗原に対する抗体を測定した。松谷・赤保内¹⁰⁾によると慢性肝疾患患者では食餌性抗原および LPS に対する抗体の増加、とくに IgA 型抗体の増加が報告されているが、CAH および LC の血清 IC より分画した IgG 型抗体にそれらに対する著明な抗体活性が存在することが示され、PBC でも中等度の抗体がみられた。用いた II 分画は Clq 結合 IC より分離しているため、IC 中の IgA 抗体については検索できなかったが、IgA 型および IgM 型抗体を分離するためには C3 を利用する IC 分析法を検討しなければならない。

また CAH および LC では肝の網内系機能、すなわち Kupffer 細胞の機能低下が知られ³⁵⁾、腸管などから由来する抗原の除去能力が低下しそれらに対する抗体産生が促される³⁶⁾。その結果生じた IC は網内系機能低下のため処理速度が遅く、慢性肝疾患では代謝面から血中 IC の増加が惹起されると考えられる。

IC 中の HB 関連抗体については HBs および HBe 抗原陽性の CAH、LC 患者より IC を精製して検討したが、患者の II 分画に HBs 抗体が弱陽性ながら検出された。この患者の血中には HBs 抗体は陰性であり、HBs に関連する IC としては抗原過剰の可溶性 IC が形成されていると考えられる。Gupta and Tan³⁴⁾ も conglutinin 結合 IC より抗体を完全に除去して抗原についての分析をし、MW 97000 と 49000 の HBs polypeptide が含まれることを明らかにしている。

さらに肝炎の慢性化には種々の肝細胞膜抗原^{37,38)} に対する自己免疫応答が関与すると考えられているが、それらの抗原および抗体のいずれもが血中に検出されていることから、それらが IC 形成に関与しているかどうかについても今後検討する必要がある。

一方、自己免疫機序がその病態形成に役割を演じていることが支持されている PBC³⁹⁾ においては、それに IC が関連するか否かは未だ明らかにされていない。従来 PBC の診断には高力価の AMA の証明が重視されて

きたが, Gupta *et al.*²²⁾はPBCの進展にはAMAとともにICが密接に関連すると述べている。本研究ではAMAとICレベルには直接の関連性が認められず, またAMAが高力価を示した2例のPBCから得たIC中の抗体分画にもAMA活性が認められず, AMAがIC形成に関与する証拠は得られなかった。しかし, PBCの1例から得たIC分画中にラットの細胆管上皮に対する抗体が見出されたことはPBCの病因を考える上にきわめて興味深い新知見である。Thomas *et al.*³⁾はPBCの病因にICの関与を考え, 胆汁中のある種の抗原に対して抗体が産生され細胆管上皮でICを形成し, 細胆管上皮の破壊を生ずるとの仮説を提唱している。PBCの胆管上皮にICが存在するか否かについては議論の多いところである⁴⁰⁾が, 本研究で証明されたICの胆管上皮抗体についてはその特異性とともPBCにおける病因的意義についても今後詳細に検討すべき問題と考えられる。

以上より肝疾患のICはその病態により抗原・抗体が多様であるが, B型肝炎におけるIC中のHBs抗体およびPBCにおける細胆管上皮抗体が検出されたことからICがその病因に関連性をもつものと推測される。しかしICの血中増加には肝の網内系機能などの低下により通常ではすみやかに処理される外来性抗原や内因性抗原に対する非特異的なICが蓄積する可能性もあり, また, これらがいかなる体液性および細胞性免疫機序に関わるのか, 今日なお不明の点が多く今後検討すべきであると考えられる。

5 結 論

各種肝疾患患者76例および健康対照37例の血中ICをClq assayおよびaC3 assayにより測定し, 以下の成績を得た。

1. Clq assayはIgG-Sepharose columnより生物活性の高いClqを大量に精製して用い, 再現性の良い測定法に改善し得た。またaC3 assayではIgクラス別にICを測定することに成功した。

2. Clq assayおよびaC3 assayにより測定したIC値間には有意の相関を認めはしたが, 両者に解離を認める場合も少なからずみられ, またIgクラス別IC間にも同様の相関性がみられたが, 両法により性状の異なるICを測定している可能性が示唆された。

3. CAH, LCおよびPBCでは健康対照に比し各Igクラス血中ICの有意の増加がみられたが, とくにCAHではIgM型IC, LCではIgA型およびIgM型IC, PBCではIgM型ICが高率に陽性を示し, 疾患により

ICの性状に特徴があることが明らかにされた。

4. HBs抗原陽性群では抗原陰性群および抗体陽性群に比しIgG型ICおよびIgM型ICの有意の増加を示した。またHBe抗原陽性群は陰性群に比しIgM型ICの有意の増加を認めた。

5. 血中ICと慢性肝炎患者のZTTとは強い相関がみられ, Clq assayでは血清IgG濃度との相関がみられたが, 補体およびその他の肝機能検査との関連性は認められなかった。

6. HBs抗原陽性AHでは肝炎極期と回復期に二峰性のIgG型IC増加を示し, CAHではtransaminaseのシェーブの前後でIgM型ICの変動がみられ, 肝炎の活動性との関連性が推測された。いずれの場合にもIgG型ICとIgM型ICは異なる変動を示したが, 増加機序は明らかにし得なかった。

7. CAH, LCおよびPBC患者血清よりPEG, 抗Clq affinity columnを用いて純度の高いICを採取し, 抗原・抗体に解離して, HLCによりMW 30~35万のIgG型抗体分画を得ることに成功した。

8. IC中のIgG型抗体活性を検討し, LCではHBs抗体を, CAH, LCおよびPBCではlactalbunin, LPSなどの外来性抗原に対する抗体を, さらにPBCではラットの細胆管上皮細胞に対する抗体を検出した。

以上の成績より肝疾患では血中ICの増加と病変の活動性および進行度との関連性が示唆された。これらのICの一部には病因に関与すると考えられる抗体が検出されたが, 非特異的な抗体も検出されICの多様性が示唆された。

御指導, 御校閲いただいた本学内科学第一講座谷内昭教授, 研究に際して御指導をいただいた本講座の赤保内良和講師ならびに御協力をいただいた諸先生に謝意を表します。

文 献

1. Almeida, J. D. and Waterson, A. P.: Immune complexes in hepatitis. *Lancet* 2, 983-986 (1969).
2. Nydegger, U. E., Lambert, P. -H., Gerber, H., and Miescher, P. A.: Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus (SLE) and in carrier of hepatitis B antigen: quantitation by binding to radiolabelled Clq. *J. Clin. Invest.* 54, 297-305 (1974).
3. Thomas, H. C., Potter, B. J. and Sherlock, S.: Is primary biliary cirrhosis an immune complex disease? *Lancet* 2, 1261-1263 (1977).
4. Hay, F. C., Nineham, L. J., Perumal, P. and

- Roitt, I. M.: Routine assay for the detection of immune complexes of known immunoglobulin class using solid phase Clq. *Clin. Exp. Immunol.* **24**, 396-400 (1976).
5. Pereira, A. B., Theofilopoulos A. N. and Dixon, F. J.: Detection and partial characterization of circulating immune complexes with solid-phase anti-C3. *J. Immunol.* **125**, 763-770 (1980).
6. Kolb, W. P., Kolb, L. M. and Podack, E. R.: Clq: Isolation from human serum in high yield by affinity chromatography and development of a highly sensitive assay. *J. Immunol.* **122**, 2103-2111 (1979).
7. McConahey, P. J. and Dixon, F. J.: A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. *Int. Arch. Allergy* **29**, 185-189 (1966).
8. Kilgallon, W., Amlot, P. L. and Williams, B. D.: Anti-Clq column: ligand specific purification of immune complexes from human serum or plasma. Analysis of the interaction between Clq and immune complexes. *Clin. Exp. Immunol.* **48**, 705-714 (1982).
9. 嵐 方之: 血清IgAおよびリンパ球培養上清中IgAのheterogeneityの解析—とくに血清IgAの産生起源について— *札幌医誌* **51**, 207-224 (1982).
10. 松谷茂幸, 赤保内良和: 慢性肝疾患における高免疫グロブリン血症, とくに高IgA血症の機序に関する研究—外来性抗原に対する抗体産生の面から— *札幌医誌* **51**, 301-317 (1982).
11. Sobel, A. T., Bokisch, V. A. and Müller Eberhard, H. J.: Clq deviation test for the detection of immune complexes, aggregates of IgG and bacterial products in serum. *J. Exp. Med.* **142**, 139-150 (1975).
12. Zubler, R. H., Nydegger, U., Perrin, L. H., Fehr, K., McCormick, J., Lambert, P.-H. and Miescher, A. B.: Circulating and intraarticular immune complexes in patients with rheumatoid arthritis. Correlation of ¹²⁵I-Clq binding activity with clinical and biological features of the disease. *J. Clin. Invest.* **57**, 1308-1319 (1976).
13. Theofilopoulos, A. N., Wilson, C. B. and Dixon, F. J.: The Raji cell radioimmunoassay for detecting immune complexes in human sera. *J. Clin. Invest.* **57**, 169-182 (1976).
14. Casali, P., Bossus, A., Nicole, A., Carpentier, A. and Lambert, P.-H.: Solid-phase enzyme immunoassay or radioimmunoassay for the detection of immune complexes based on their recognition by conglutinin: conglutinin binding test. A comparative study with ¹²⁵I-labelled Clq binding and Raji-cell RIA test. *Clin. Exp. Immunol.* **29**, 342-345 (1977).
15. Siegel, J., Rent, R. and Gewurz, H.: Interaction of C-reactive protein with the complement system: I. protamine-induced consumption of complement in acute phase sera. *J. Exp. Med.* **140**, 631-647 (1974).
16. Yonemasu, K. and Stroud, R. M.: Clq: rapid purification method for preparation of monospecific antisera and for biochemical studies. *J. Immunol.* **106**, 304-313 (1971).
17. Müller Eberhard, H. J.: Complement. *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 697-724 (1975).
18. Inman, R. D. and Day, N. K.: Immunologic and clinical aspects of immune complex diseases. *Am. J. Med.* **70**, 1097-1106 (1981).
19. Theofilopoulos, A. N. and Dixon, F. J.: The biology and detection of immune complexes. *Adv. Immunol.* **28**, 89-220 (1979).
20. Lambert, P.-H., Dixon, F. J., Zubler, R. H., Agnello, V., Cambiaso, C., Casali, P., Clarke, J., Cowdery, J. S., McDuffie, F. C., Hay, F. C., MacLennan, I. C. M., Masson, P., Müller Eberhard, H. J., Penttinen, K., Smith, M., Tappeiner, G., Theofilopoulos A. and Verroust, P.: A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum. *J. Clin. Lab. Immunol.* **1**, 1-15 (1978).
21. Thomas, H. C., De Villiers, D., Potter, B., Hodgson, H., Jain, S., Jewell, D. P. and Sherlock, S.: Immune complexes in acute and chronic liver disease. *Clin. Exp. Immunol.* **31**, 150-157 (1978).
22. Gupta, R. C., Dickson, E. R., McDuffie, F. C. and Baggenstoss, A. H.: Circulating IgG complexes in primary biliary cirrhosis. A serial study in forty patients followed for two years. *Clin. Exp. Immunol.* **34**, 19-27 (1978).
23. 辻 孝夫: 肝疾患に関与する諸因子—Immune complexes. 浪久利彦, 山本祐夫, 織田敏次編集: 肝と免疫 95-118 中外医学社, 東京 (1981).
24. Gupta, R. C., Dickson, E. R., MuDuffie, F. C. and Baggenstoss, A. H.: Immune complexes in primary biliary cirrhosis. Higher prevalence of circulating immune complexes in patients with associated autoimmune features. *Am. J. Med.* **73**, 192-198 (1982).
25. Cano, P. O., Jerry, L. M., Sladowski, J.P. and Osterland, C. K.: Circulating immune complexes in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* **29**, 197-204 (1977).

26. Nydegger, U. E., Zubler, R. H., Gabay, R., Joliat, G., Karagevrekis, CH., Lambert, P. -H. and Miescher, P. A.: Circulating complement breakdown products in patients with rheumatoid arthritis. Correlation between plasma C3d, circulating immune complexes, and clinical activity. *J. Clin. Invest.* **59**, 862-868 (1977).
27. Manigand, G., Taillandier, J., Morel Maroger, L. and Deparis, M.: Glomerular nephropathies in hepatic cirrhosis. *Ann. Med. Interne* **132**, 178-182 (1981).
28. Swerdlow, M. A., Chowdhury, L. N. and Thomas, H. C.: Patterns of IgA deposition in liver tissues in alcoholic liver disease. *Am. J. Clin. Pathol.* **77**, 259-266 (1982).
29. Pernice, W., Sodomann, C. P., Luben, G., Seiler, F. R. and Sedlacek, H. H.: Antigen-specific detection of HBsAg-containing immune complexes in the course of hepatitis B virus infection. *Clin. Exp. Immunol.* **37**, 376-380 (1979).
30. Gupta, R. C.: Characterization of antigen moiety of HBsAg in the complement fixing immune complexes of hepatitis B virus positive chronic active hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* **49**, 543-551 (1982).
31. Steffelaar, J. W., Tan Kate, F. J. W., Nap, M., Swaak, A. J. G., De Draaff-Reitsma, C. B., Van Elven, E. H. and Feltkamp Vrosm, T. M.: Immune complex detection by immunofluorescence on polymorphonuclear leucocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **27**, 391-396 (1977).
32. Reed, W. P. and Williams, R. C.: Immune complexes in infectious diseases. *Adv. Intern. Med.* **22**, 49-72 (1977).
33. Canalese, J., Wyke, R. J., Vergani, D., Eddleston, A. L. W. F. and Williams, R.: Circulating immune complexes in patients with fulminant hepatic failure. *Gut* **22**, 845-848 (1981).
34. Gupta, R. C. and Tan, E. M.: Isolation of circulating immune complexes by conglutinin and separation of antigen from dissociated complexes by immobilized protein A. *Clin. Exp. Immunol.* **46**, 9-19 (1981).
35. Triger, D. R., Boyer, T. D. and Leivin, J.: Portal and systemic bacteremia and endotoxaemia in liver diseases. *Gut* **19**, 935-939 (1978).
36. Wright, R.: Role of the liver in normal immunological responses. *Curr. Top. Immunol.* **8**, 61-67 (1979).
37. Meyer zum Büschenfelde, K. H., Manns, M., Hütteroth, T. H., Hopf, U. and Arnold, W.: LM-Ag and LPS—two different target antigens involved in the immunopathogenesis of chronic active hepatitis? *Clin. Exp. Immunol.* **37**, 205-212 (1979).
38. Schuurman, H. J., Vogten, A. J. M., Schalm, S. W. and Fevery, J.: Clinical evaluation of the liver cell membrane autoantibody assay. *Digestion* **23**, 184-193 (1982).
39. 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* **1**, 1166-1168 (1981).
40. 大田五六, 中沼安二: 原発性胆汁性肝硬変症の胆管崩壊の電顕像. *肝胆膵* **4**, 189-195 (1982).

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1講座 吉崎榮泰