

慢性肝疾患のT cell subsets 検査(FCM— 直接免疫蛍光法による)の臨床的意義に対する検討

北川内科クリニック 北川 鉄 人

(本研究の要旨は58年5月29日、日本内視鏡学会、日本消化器病学会合同地方会にて発表した。)

はじめに

蛍光標識OKTシリーズ、モノクローナル抗体を用いて、細胞表面抗体の状態が定量的に調べられるようになった。しかし、蛍光顕微鏡による間接免疫蛍光法より、直接免疫蛍光法を用いて自動解析分離装置(以下FCM, Flow-cytometry と略す)で調べる方が、極めて高感度が得られるといわれる⁴⁾⁵⁾。今後このFCMの使用による研究開発が進展するものと考えられる。

目的と方法

慢性活動性肝炎(CAH)患者では、しばしば細胞性免疫異常や体液性免疫異常がみられる。近年における免疫学研究の進歩から、自己免疫の発現は、免疫学的恒常性を保つために必要な免疫調節機構の破綻の結果であり、その調節機構の一つとしてサブレッサーT細胞とヘルパーT細胞のバランスによる制御機構が重要な役割を果していることが明らかにされて来ている⁶⁾。

現在、OKTシリーズ、モノクローナル抗体を用いたFCMによるT cell subsetsの新技法の内容については、表1にリンパ球におけるOKT抗原保有細胞の百分率を示しており、OKT3はヒト末梢血Tリンパ球の同定、OKT8はヒトサブレッサー/細胞障害性Tリンパ球サブセットの同定ができることが報

表1 各々のOKT抗原保有細胞の百分率

OKT抗原	胸腺リンパ球	末梢血T細胞
1	5-10(%)	>95(%)
3	5-10	>95
4	80	55-60
5	80	20
6	70	0
8	80	30
9	10	0
10	95	<5
11	95	>95

告されている⁴⁾。また、OKT4とOKT8で同定されるT細胞 subsets の比、H/S比をとれば、ヒトの病態および治療効果を知る一つの指標となる。この発表では Biomedical laboratories の協力により、肝疾患の患者のT cell subsets 検査の成績を検討したものである。

成 績

58年2月より3ヵ月間、北川内科クリニックを訪れた慢性肝炎活動型17例と急性肝炎1例の計18例について、OKT3、OKT4、OKT8、OKT11を調べ、コントロール群9例と比較検討した。

図1は、これらの肝疾患と健常者群とのT cell subsets について、それぞれ比較検討した。黒三角印は、HBs 抗体陽性者である。OKT3、OKT4、OKT11では、慢性肝障害群は、コントロールに比して有意にその数値の低下がみられた。

図2では、慢性肝疾患でOKT4とOKT3の比、OKT8/OKT3、OKT4/OKT8(H/S比)を、それぞれコントロー

図1 肝疾患と健常者群との T cell Subsets の比較

(肝障害: ▲HBsAg(+), ○HBsAg(-))

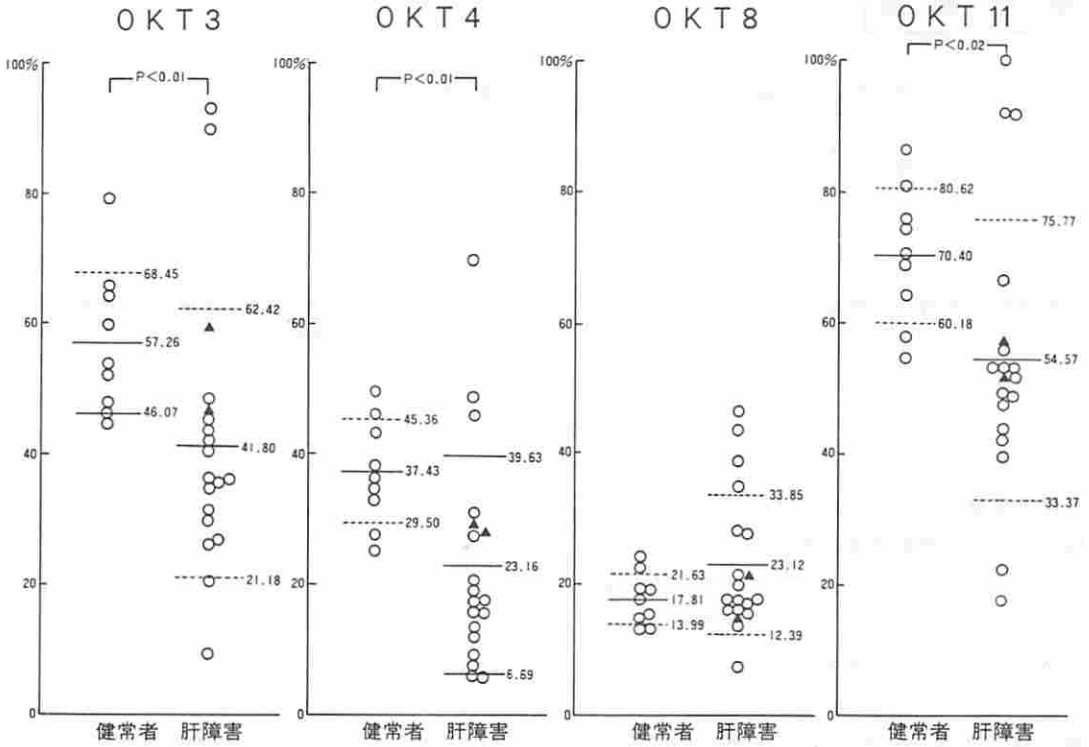


図2 肝疾患の T cell の OKT 比(コントロールとの比較)

(肝障害: ▲HBsAg(+), ○HBsAg(-))

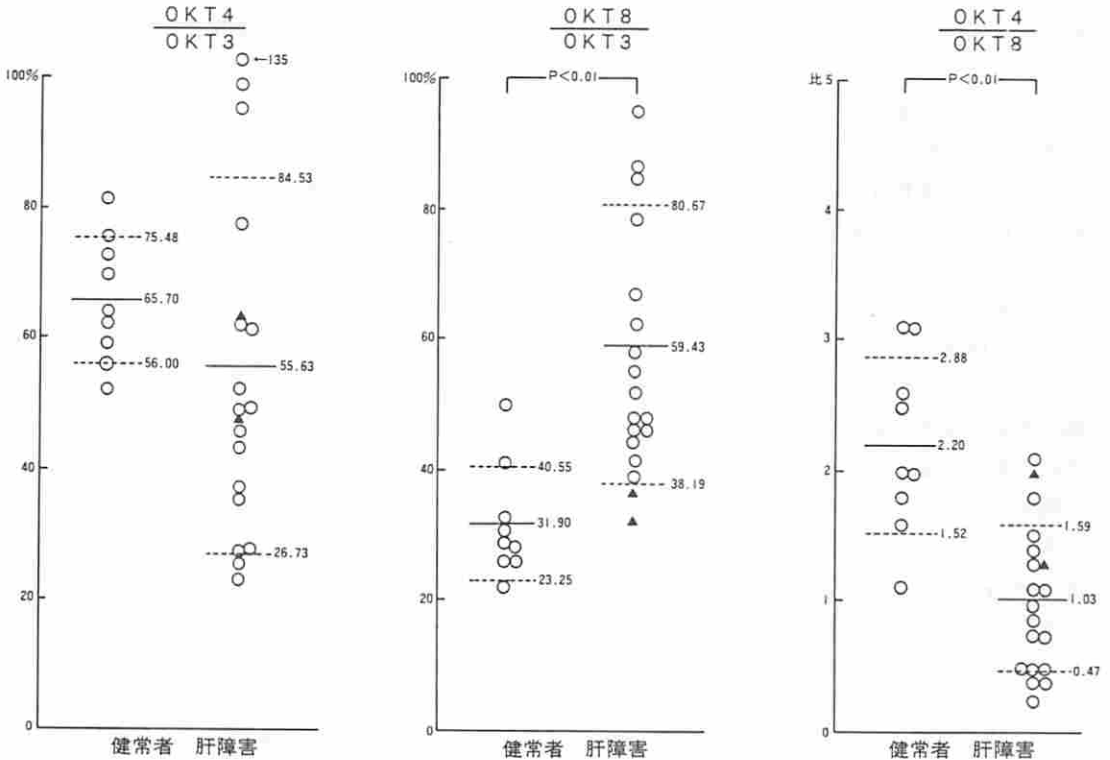


図3 OKT 4 /OKT 8 と肝機能検査の相関

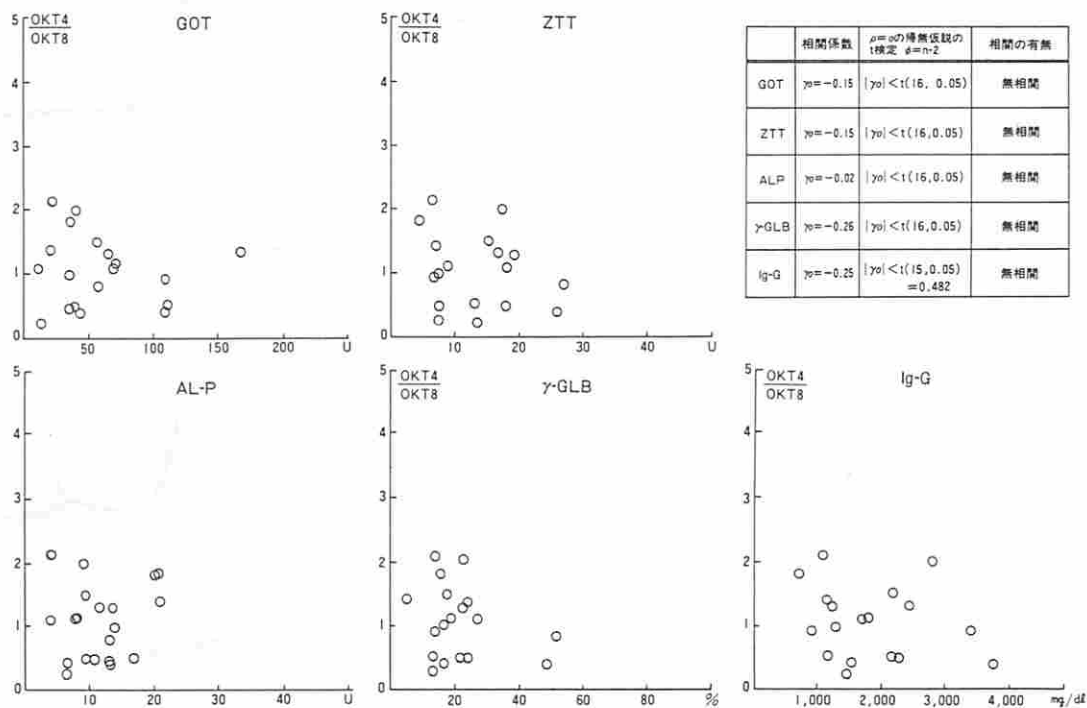


図4 肝疾患と OKT 4 /OKT 8 (H/S比)

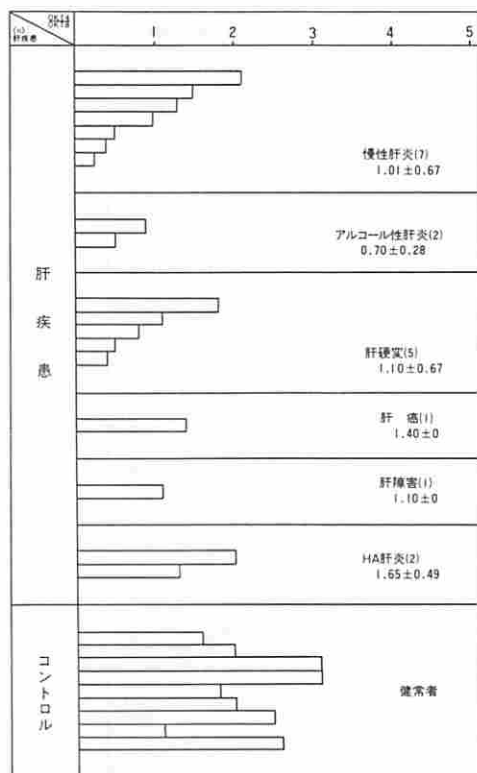


図5 肝疾患例の OKT 4 /OKT 8 経過観察

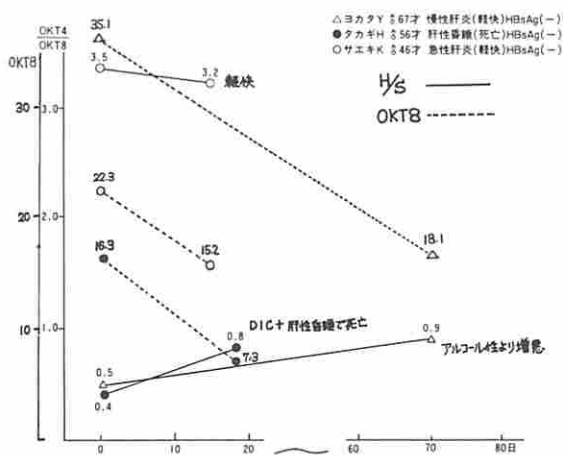


図6 肝疾患の OKT 8 のパターン

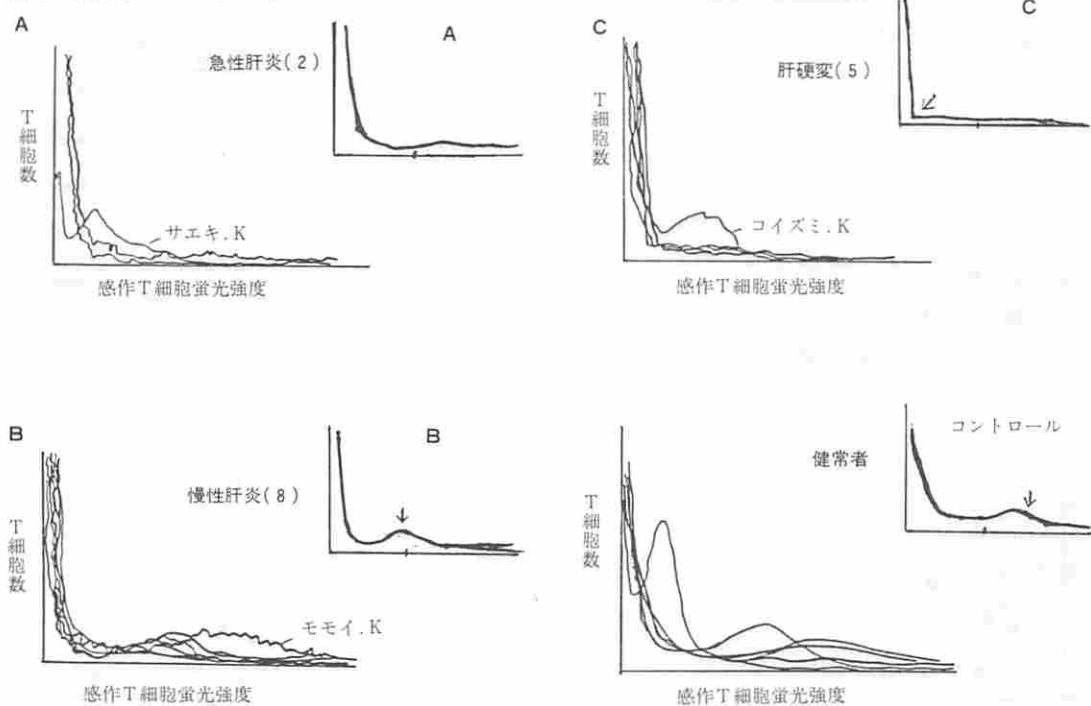


表2 肝炎患者(18例) T cell Subsets 値

月/日	患者名	性別	年齢	病名	HBsAg	OKT 3	OKT 4	OKT 8	OKT 11
2/7	コウサク T	♂	85	肝 癌	-	20.6	27.8	19.6	53.2
2/7	ヨカタ Y	♂	67	アルコール性肝炎 慢性肝炎	-	41.2	17.8	35.1	55.3
2/24	フルイシ H	♂	60	肝 硬 変	HA _{Ab} +	46.5	29.3	14.9	52.3
2/24	タカギ H	♂	56	肝 硬 変	-	26.3	6.1	16.3	22.3
2/24	サカイ Y	♂	61	慢性肝炎	-	34.5	16.9	13.5	42.0
2/24	ヤマモト S	♂	75	慢性肝炎	-	35.6	9.2	17.2	49.5
3/3	サカイ K	♀	60	肝 硬 変	-	31.2	30.8	17.3	53.2
3/4	キタムラ M	♀	47	肝 障 害	+	93.1	48.5	43.5	100
3/8	ハマタニ K	♂	44	慢性肝炎	-	48.2	45.8	21.6	66.6
3/15	タカギ H	♂	56	肝 硬 変	-	9.3	5.8	7.3	17.6
3/22	オイワケ S	♂	48	肝 硬 変	-	29.9	18.5	17.4	51.8
4/5	ノダ M	♀	38	急性肝炎	HA _{Ab} +	59.0	28.2	21.7	56.6
4/13	スザワ K	♂	43	慢性肝炎	+	26.8	7.1	28.4	92.2
4/13	コイズミ Y	♀	55	肝 硬 変	+	45.0	20.5	38.7	53.2
4/19	アイダ H	♂	53	慢性肝炎	-	42.0	11.7	28.2	39.3
4/19	シジマ K	♂	59	慢性肝炎	-	36.1	17.7	17.3	43.1
4/19	ヨカタ Y	♂	67	アルコール性肝炎	-	43.8	15.6	18.1	47.5
4/22	モモイ K	♂	58	慢性肝炎	-	89.4	69.3	46.4	92.1

コントロール群(9例) T cell Subsets 値

♂	22	健 常 者	—	53.8	27.8	17.6	86.5
♂	23	//	—	78.8	49.2	24.3	80.7
♂	23	//	—	65.9	45.8	14.7	70.6
♀	23	//	—	53.2	43.3	13.9	69.4
♂	25	//	—	46.4	35.1	19.2	58.1
♀	28	//	—	65.2	38.3	19.1	74.2
♂	31	//	—	59.6	37.9	15.5	75.1
♂	32	//	—	45.0	25.1	22.5	54.8
♂	47	//	—	47.4	34.4	13.5	64.2

ルと比較すると、とくに慢性肝疾患にはH/S比に有意の低下がみられた。すなわち、慢性肝疾患ではOKT3の減少があるが、H/S比の低下、すなわち疾患の免疫抑制状態があらると考えられた。

そこで図3に示すように、肝機能検査GOT、ZTT、Al-P、 γ -glob、IgGなどとH/S比との相関を調べた。しかし、いずれもH/Sとこれらの肝機能異常との相関はみられなかった。

さらに、このH/S比を、慢性肝臓病との病名別に分類し、コントロールと比較した。すでに述べたように、コントロールとは一般にH/S比は低下があるが、各疾患で特に慢性肝炎や肝硬変の中でその数値の差があるのは病態時期の差によるものではないかと考えられる。

図5は、肝障害3症例についてH/S比の経過をみた図である。○は、今回のデータには含まれていないが、46才の男性、HA肝炎の症例で発病時はH/S比が高い。すなわち他の症例よりinducerが活発であったと考えられる。●は、56才の男性、肝硬変・肝性昏睡・DICで死亡した症例でH/S比が極めて低い。△は、67才の男性、慢性肝炎でアルコールにより増悪した症例である。この肝硬変、慢性肝炎の例は、その経過でサプレッサーが低下しているのにH/S比が経過で上昇傾向にあるのはサプレッサーが高まっているとも考えられるが死因には他の病

態因子が当然加わってしよう。

肝炎ウイルスの抗原・抗体系とその免疫機能との関係をT cell subsetsより何か考えることができないかは、肝炎でのT cell subsets検査の最も意義あるものであろう。HBs抗原陽性例の症例は少ないので、何ともいえないが、HBs抗原陽性の慢性肝炎ではOKT3・4の低下が見られ、3例のHBs抗原陽性でOKT8の上昇、OKT8/OKT3の上昇、H/S比の低下が見られた(表3)。最後にFCMによって検索した肝疾患のグラフをOKT8リンパ球についてのパターンの分類を試みた(図6)、縦軸にT細胞数、横軸に感作T細胞をとった。コントロール・急性肝炎・慢性肝炎・肝硬変の曲線のパターンが明らかに区別された。すなわち、OKT8リンパ球には肝疾患の組織像に応じたパターンがあるのではないかと考えられた。

考察とまとめ

モノクローナル抗体を用いた細胞表面抗原の検索に直接免疫蛍光法を用いた自動解析FCMによるものでは、従来例の約50倍の精度を有するといわれている⁴¹⁵⁾。BML社の協力により、この方法を用いて慢性肝障害例を中心にT cell subsetsによる臨床免疫学的意義について検討した。自己免疫の発現には、その免疫学的恒常性を保つために必要な免疫調節機構の破綻の結果であり、それらのMarker

表3 肝疾患と健常者群の平均値

モノクローナル抗体 OKT	OKT3	OKT4	OKT8	OKT11	$\frac{OKT4}{OKT3}$	$\frac{OKT8}{OKT3}$	$\frac{OKT4}{OKT8}$
T cell subsets							
健常者平均 Mean ± S.D. n = 9	57.26 ± 11.19	37.43 ± 7.93	17.81 ± 3.82	70.40 ± 10.22	65.70 ± 9.78	31.90 ± 8.65	2.20 ± 0.68
患者平均 Mean ± S.D. n = 18	41.80 ± 20.62	23.16 ± 16.47	23.12 ± 10.73	54.57 ± 21.20	55.63 ± 28.90	59.43 ± 21.24	1.03 ± 0.56

(S.D.標準偏差・N-1の使用)

肝炎ビールの抗原抗体系と T cell Subsets 平均値

モノクローナル抗体 OKT	OKT3	OKT4	OKT8	OKT11
HBs抗原系				
HBsAg(+) Mean ± S.D. n = 3	54.97 ± 34.26	↓ 25.37 ± 21.12	↑ 36.87 ± 7.16	81.80 ± 25.07
HBsAg(-) Mean ± S.D. n = 14	↓↓ 37.42 ± 17.98	↓↓ 21.89 ± 17.30	↑ 20.86 ± 9.79	↓ 48.76 ± 17.82
HA抗体 Mean ± S.D. n = 2	↓ 52.75 ± 8.87	28.75 ± 0.78	18.30 ± 4.81	↓ 54.45 ± 3.04
健常者 Mean ± S.D. n = 9	57.26 ± 11.19	37.43 ± 7.93	17.81 ± 3.82	70.40 ± 10.22

肝炎ビール抗原抗体系と T cell Subsets の構成比

(%)

モノクローナル抗体 OKT	$\frac{OKT4}{OKT3}$	$\frac{OKT8}{OKT3}$	$\frac{OKT4}{OKT8}$
HBs抗原系			
HBsAg(+) Mean ± S.D. n = 3	↓ 41.43 ± 13.32	↑ 79.60 ± 30.18	↓ 0.62 ± 0.43
HBsAg(-) Mean ± S.D. n = 14	58.70 ± 32.61	↑ 58.68 ± 17.10	1.04 ± 0.53
HA抗体 Mean ± S.D. n = 2	55.40 ± 10.75	34.40 ± 3.39	1.65 ± 0.49
健常者 Mean ± S.D. n = 9	65.70 ± 9.78	31.90 ± 8.65	2.20 ± 0.68

↓ ↑ コントロール群との比較

として、Suppressor T cell と Helper T cell のバランスによる免疫機構が問題視^{1)~3),6)~11)}されている。HBウイルス肝炎の慢性化にはH/S比が低下し、HAウイルスにはH/S比が上昇する^{1)~3)}という報告がある。慢性肝障害における今回の研究もそれにほぼ似た成績がみられた。

HBウイルス陰性例でも自己免疫疾患の関与が考えられており、本症例中では、OKT4の減少がみられた。臨床的にはHA肝炎のようにH/S比の高い例は予後がよく、HB肝炎ではH/S比の低い例は予後がわるいと考えたい。OKT8については、症例が少ないの

で全体像として慢性肝障害に有意の低下がみられなかったが、重症肝疾患の経過をみると明らかな低下例がみられる。

また、OKT8については、肝疾患の組織像に応じたT細胞によると感作T cell 蛍光強度曲線のパターンに差があることも想定された。蛍光顕微鏡を用いた用手法では、蛍光強度が減弱した蛍光陽性細胞を偽陰性と判定する可能性があり、そのためサブプレッサー／キラーT細胞が低下することもあるといわれる⁵⁾。しかし、最近慢性肝炎増悪期にH/S比の上昇するという報告^{7),8),9),10)}やHB抗体陽性慢性肝炎では、OKT8が減少し、OKT4/OKT8は上昇するので、E抗体の出現は suppressor T cell の変化を伴うものであるという報告¹¹⁾もある。OKTをMarker とするには、HBs抗原抗体や他のウイルスの抗原抗体とその経過が複雑に関与しており、サブプレッサーやキラーT細胞をコントロールしている要素や、さらにオーソミュンがT細胞膜抗原をとらえる方法に於ても、今後の研究の進展に興味深い感銘を覚えるものである。

(本発表の資料の検討について、金大第二病理 野々村昭孝助教授に助言をいただいたので深謝する。)

文 献

- 1) Thomas, H. C., et al., Inducer and Suppressor T-cells in HBV induced liver disease. *Hapatol*, Manuscript submitted for publication, 1981.
- 2) Bach, M. A. & Bacck, J. F., Imbalance in T-cell subsets in human disease. *Int. J. Immunopharmacol.* 3: 269, 1981.
- 3) Thomas, H. C., T-cell subsets in patients with acute and chronic HBV infection, Primary Biliary Cirrhosis and Alcohol induced liver disease. *Int. J. Immunopharmacol.* 3: 301, 1981.
- 4) 矢田純一, モノクローナル抗体によって同定されるT細胞亜群とその疾患における変動 *臨床免疫* 13(11): 891, 1981.
- 5) 岩田良則ほか, モノクローナル抗体を用いたリンパ球の解析 *Medical Technology* 11(2): 110, 1983.
- 6) Waldmann, T.A. et al: Disorders of suppressor immunoregulatory cells in the pathogenesis of immunodeficiency and autoimmunity *Ann. Int. Med.* 88: 226, 1978.
- 7) 野々村昭孝ほか, 慢性活動性肝炎患者の免疫調節機能に関する検討 *日本消化器病学会雑誌* 78(5): 1068, 1981.
- 8) 大森浩司ほか, 慢性肝疾患のリンパ球 subsets — 単クローン性抗体による検索 *消化器と免疫* 9: 128-132, 1982.
- 9) Howard C. T. et al., Inducer and Suppressor T cells in Hepatitis B Virus-induced liver Disease *Hepatology* 2(2): 202, 1982.
- 10) 恩地森ら, 慢性活動性肝炎の経過に伴う末梢血 T cell subsets の変動 *日本消化器病学会雑誌* 81: 268, 1984 (発表抄録)
- 11) 古沢明彦ら, HBs抗原陽性慢性活動性肝炎における抗原, E抗体系と末梢血 T cell subsets についての検討 *日本消化器病学会雑誌* 81: 268, 1984 (発表抄録)
(最近、多数の文献がありますが、頁数の都合で省略した。)