

肝疾患におけるエンドトキシン抗体の 臨床的意義について

——免疫グロブリン・クラスの結果も含めて——

岡山大学医学部第1内科学教室（主任：長島秀夫教授）

土 屋 正 夫

（昭和61年11月6日受稿）

Key words：エンドトキシン，エンドトキシン抗体
エンドトキシン抗体の免疫グロブリン・クラス
肝疾患，ELISA

緒 言

すでに各種肝疾患において腸内細菌に由来するエンドトキシンの血中への出現が報告¹⁾され、エンドトキシンの肝疾患病態への関与について、肝疾患の結果としてのみならず原因としての関与の可能性についても各種方面から検討されている²⁾が、エンドトキシンの測定法、とくに血中阻害因子の問題などについて解決されるべき問題が残されており、必ずしも明らかにされていない。一方、古くから肝疾患においてエンドトキシンに対する抗体価が上昇することが報告³⁾され、その意義についても Nolan ら⁴⁾、McCabe ら⁵⁾、Wilkinson ら⁶⁾により肝網内系機能ならびにトランスの面から論じられているが、抗体の面からの検索においても、その詳細は明らかでない。

著者は、エンドトキシンの肝疾患病態への関与について液性免疫の面から明らかにする事を目的として、エンドトキシン抗体の ELISA 法による測定方法について基礎的検討を行い既に報告⁷⁾したが、今回その方法により、臨床例における抗体価の免疫グロブリン別成績について検討した。

対象と方法

対象症例は、岡山大学第一内科に入院し、腹腔鏡下肝生検により診断された各種肝疾患107例〔急性肝炎(AH)23例、慢性肝炎(CH)41例、肝硬変(LC)30例、アルコール性肝障害10例、劇症肝炎(FH)3例〕ならびに健常人29例であり、その血清を -20°C に保存し研究材料として用いた。また、慢性肝炎の病型分類はヨーロッパ分類⁸⁾に従って慢性肝炎活動性 severe type (CAH2B)、moderate type (CAH2A)と慢性肝炎非活動性(CPH)に区分した。また、それとは別に、経皮経肝門脈造影法の行われた肝疾患10例(LC7例、CH3例)について、その末梢静脈血、門脈本幹、上腸間膜静脈、脾静脈における血清を同様に研究材料として用いた。

エンドトキシン抗体の測定法としては、Fig.1の模式図に示したように、抗原として lipopolysaccharide (LPS) E.coli 026 : B6 (W), E.coli 0111 : B4 (W) (Difco 社)を用い、さきに報告⁷⁾したごとく Vos ら⁹⁾の方法に従った以下の方法により行った。すなわち、LPSの0.1M炭酸緩衝液溶液、pH9.6 (0.5 mg/ml) 1 ml に対して、メチル化 bovine serum albumin (BSA) (Sigma 社)の水溶液 (10 mg/ml) 50 μl を加え、室温にて20分間拡はん混和し、さきの炭酸緩衝液により

Method

E. coli 026:B6 (W) (Difco Lab.) 0.5mg/ml in sodium carbonate buffer (0.1M; pH 9.6)

1 ml ————— Methylated BSA (Sigma Lab.) 10mg/ml of water
0.05 ml
Stired at room temperature for 20 min.

Diluted with carbonate buffer (final concentration; 5 μ g/ml)

100 μ l
Microtiter plate, Imuron (Greiner Lab.)
3 h at 37 $^{\circ}$ C

Washed 3 times with tris-HCl buffer (0.04M; pH 7.4),
containing 0.01% Tween 20 and 0.004% NaN₃
Dried over silicagel, and stored at 4 $^{\circ}$ C

100 μ l
Serum solution ($\times 100$) in tris-HCl buffer (0.2M; pH 7.4),
containing 2% BSA, 0.05% Tween 20 and 0.02% NaN₃
2 h at 37 $^{\circ}$ C

Washed 3 times with tris-HCl buffer (0.2M; pH 7.4),
containing 0.05% Tween 20

100 μ l
Conjugate solution ($\times 100$) in tris-HCl buffer (0.2M; pH 7.4)
containing 2% BSA, 0.05% Tween 20
Conjugates; Peroxidase conjugated anti-human IgG, A, M, produced in
rabbit (Dako-patts Lab.)
2 h at 37 $^{\circ}$ C

Washed 4 times with the same washing buffer

100 μ l
Substrate solution; o-phenylene diamin, urea peroxide in phosphate-citrate
buffer (tablet from: Organon Teknika Lab.)
30 min. in the dark

The enzyme reaction was stopped by adding 100 μ l of 4 N H₂SO₄

O.D.₄₉₂ was measured with capillary photometer (Organon Teknika Lab.)

Fig. 1 エンドトキシン抗体の測定法

100倍希釈液 (LPS の最終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$) とし、イムロン製 U 字型マイクロプレート (Greiner 社) を用いて抗原固相化プレートを作成した。作成した抗原固相化マイクロプレートは 0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4, 0.05% Tween 20 を含む: Tween-TBS) の 5 倍希釈液を用いて洗浄後、シリカゲルにより乾燥し、 4°C にて乾燥保存した。

抗体価測定の方法は、Engvall ら¹⁰⁾ の方法と基本的に同じであり、抗原固相化マイクロプレートの各ウェルに 100 倍希釈した被検血清 $100 \mu\text{l}$ を加え、反応後洗浄除去し、次にペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG, IgA, IgM (Dako-patts 社) のいずれかを Tween-TBS (2% BSA を含む) を用いて 100 倍希釈として各々 $100 \mu\text{l}$ 加え、反応後同様に洗浄除去をくり返し、最後にオルトフェニレンジアミン (Organon Teknika 社) を基質とした酵素反応を型のごとく 30 分間行い、 4 N 硫酸 $100 \mu\text{l}$ を用いて反応停止した後に、毛細管比色計 (Photo-ELISA 1: Organon Teknika 社) を用いて波長 492 nm における吸光度 (O.D.)

を測定した。

抗体価の表現方法は、抗 E.coli 026:B6 ウサギ抗血清 (Difco 社) の 5 倍希釈に相当する力価を示した患者血清を標準血清として Tween-TBS (2% BSA を含む) を用いて 100 倍希釈にて分注して凍結保存し、標準血清に対する百分率 (% of reference) により抗体価を表した。

成 績

各種肝疾患ならびに健常人についての E.coli 026:B6 に対する IgG 抗体の成績は、Fig. 2 に示した。すなわち健常人平均値が 18.0 ± 7.5 (% of reference) であり、CPH, CAH2A においては健常人と比較して大きな差を示さず、特に CAH2A においては高い例の少ない事が目立った。しかし、FH, LC, CAH2B においては平均値も高く、高値を示す例が多かったが、アルコール性肝障害、AH においても比較的高い例が見られた。また、健常人平均値の 2 倍以上を示す症例数の各病型における百分率を棒グラフで見ると、FH, LC, アルコール性肝障害、CAH2B,

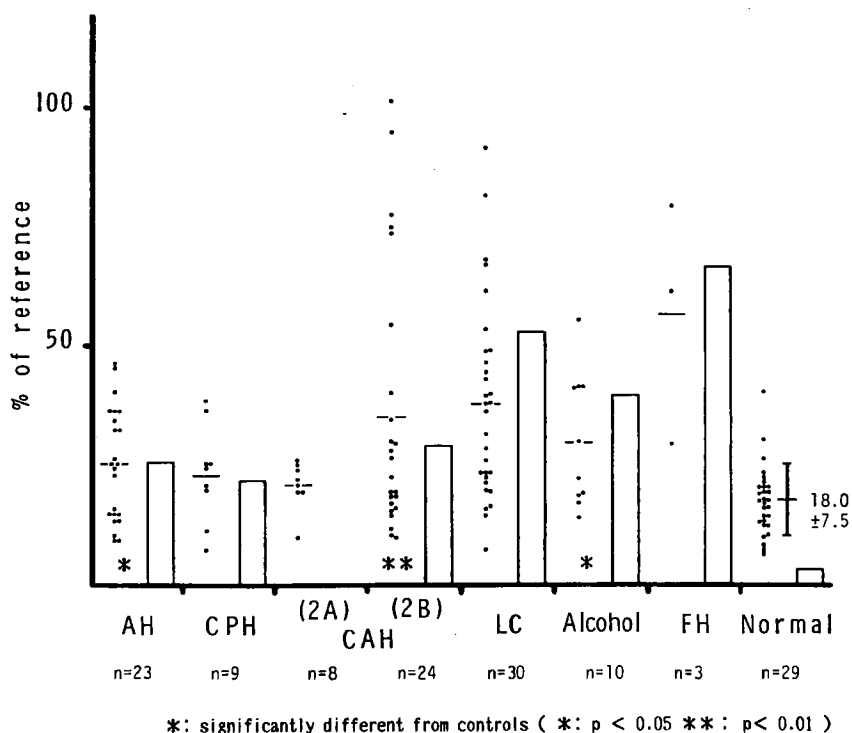


Fig. 2 E.coli 026:B6 に対する IgG 抗体価 (棒グラフは、健常人平均値の 2 倍以上の抗体価を示す症例数の、各病型における百分率を表す。)

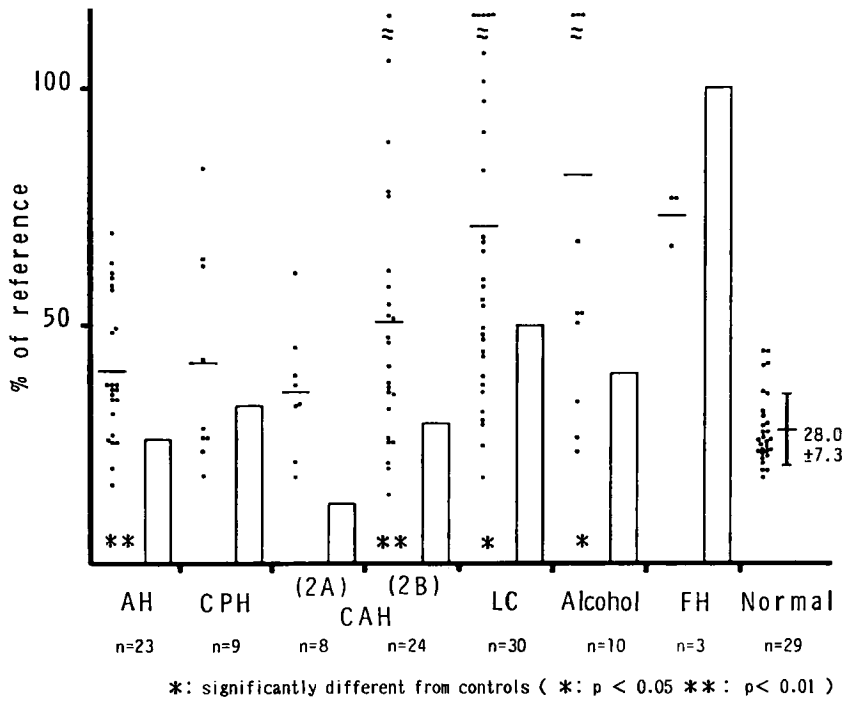


Fig. 3 E.coli 026:B6 に対する IgA 抗体価

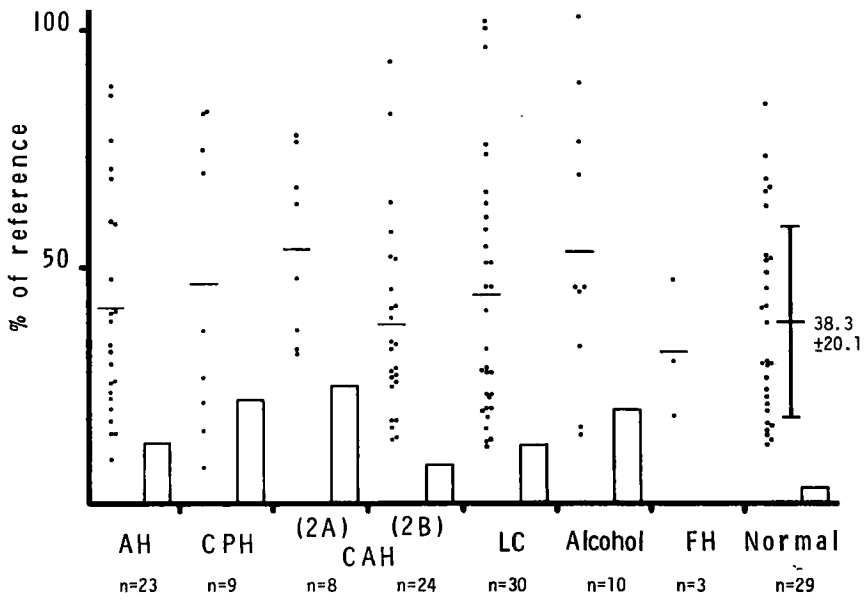


Fig. 4 E.coli 026:B6 に対する IgM 抗体価

AH, CPHの順に高い例が含まれていた。すなわち、IgGについては、肝疾患全般に高い例が多く、肝疾患の重症度との関連も考えられる成

績であったが、CAH2Aは例外的に低値であり、健常人との差がなかった。

同様に IgA 抗体については Fig. 3 に示した

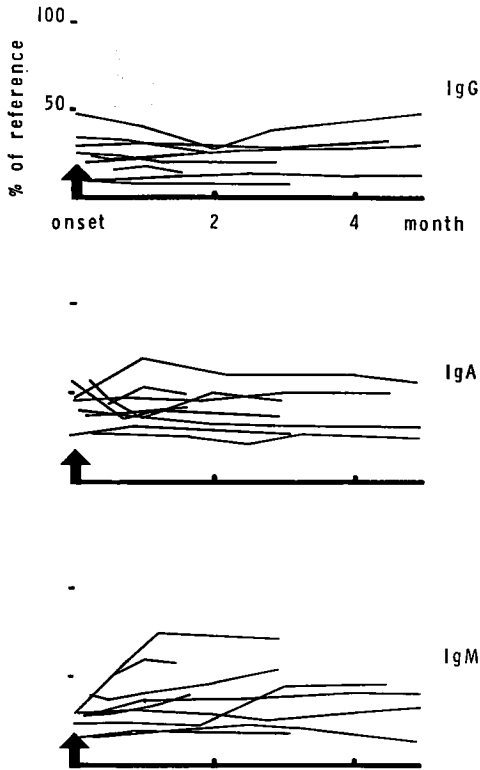


Fig. 5 急性肝炎発病後における抗体価の変動

が、抗体価の分布と高値を示す症例の百分率を病態別に見ると、IgG 抗体の成績と同様に、CAH2A を除き肝疾患全般に高かった。すなわち、その平均値においては、アルコール性肝障害、FH、LC、CAH2B、CPH、AH の順に高値を示し、高い症例の含まれる割合では、FH、LC、アルコール性肝障害の順序であったが、アルコール性肝障害は IgG 抗体の場合と異なり、平均値において最高値を示した事が注目される成績であった。

一方、IgM 抗体の成績については Fig. 3 に示したが、健常人においても比較的に高値を示し、平均値が 38.3 ± 20.1 であり、疾患群との間に大きな差を示さなかった。また、逆に IgG、IgA 抗体の成績において高値であった FH や CAH2B の重症例、とくに FH において健常人平均値よりもむしろ低値であり、疾患の重症度とは比例しない成績であった。

AH 9 例について、発病後の抗体価の変動を免疫グロブリン・クラス別にみた成績を Fig. 5

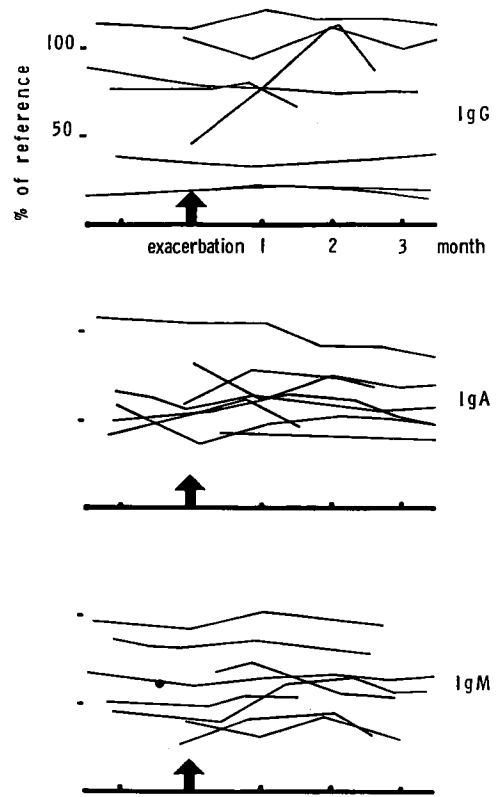


Fig. 6 慢性肝炎の急性増悪後における抗体価の変動

に示したが、IgG 抗体は比較的低値のまま不変であったが、1 例においては 2 ヶ月目に一旦低下し、その後復元したものもあった。IgA 抗体においては、2 ないし 4 週目に 2 例が上昇を示し、2 例が一旦低下、その他は不変であった。また、IgM 抗体では、6 例に発病後上昇の傾向が見られた。すなわち、AH において IgG は比較的に低く、IgA は初期に高く後に低下する例ないしは、しだいに上昇する例が含まれていたが、IgM については上昇傾向を示す症例が多かった。

一方、CAH2B 4 例と CAH2A 4 例の計 8 例の慢性肝炎 (CH) について急性増悪との関連を同様に観察したが (Fig. 6)、IgG 抗体は AH の場合と異なり比較的に高値であり、その変動は必ずしも一定しなかったが、1 例においては急上昇を示した。また、IgA 抗体は上昇例が 5 例であり、IgM 抗体は 6 例が急性増悪後の上昇

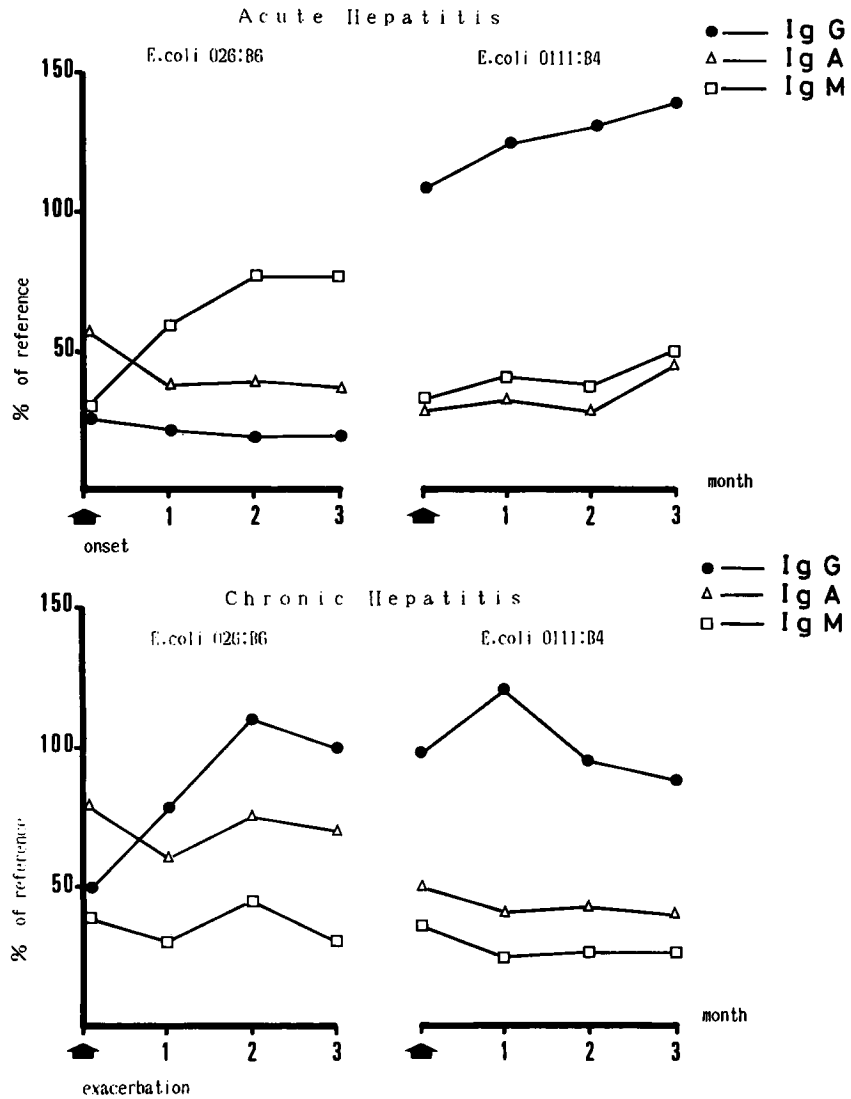


Fig. 7 菌種により異なる抗体の動きを示した急性ならびに慢性肝炎の症例

表 1 肝硬変における食道静脈瘤ないし腹水の有無による抗体価の差

Immunoglobulin class	G	A	M
Varices and/or Ascites			
PRESENT (n=19)	41.8 ± 20.0	87.5 ± 47.4	49.0 ± 27.6
ABSENT (n=11)	32.4 ± 18.6	41.8 ± 15.3	34.2 ± 20.2
TOTAL (n=30)	38.4 ± 20.0	70.7 ± 44.6	43.6 ± 26.2

* : p < 0.01

を示した。すなわち、IgA と IgM においては AH に類似した動きが見られたが、IgG においては AH と異なり、既に高値である例が含まれており、さきの病型別の平均値の成績とも一致する成績であった。

また、AH の 1 例ならびに CH の 1 例について、E. coli 026:B6 と E. coli 0111:B4 に対する抗体価の変動の違いについて比較し Fig. 7 に示したが、AH の 1 例においては、菌種により反応する免疫グロブリン・クラスの違いがあり、CH の 1 例においては、同じ IgG の反応であっても、菌種により反応の時期が異なるという成績であった。

LC 30 例における、食道静脈瘤ないし腹水の有無による抗体価の差については、表 1 に示したが、IgG、IgA、IgM のいずれの免疫グロブリン・クラスについても、食道静脈瘤ないし腹水の有る症例に高い傾向が見られた (IgA でのみ $p < 0.01$)。

経皮経肝門脈造影法により得られた血清を用いての、採血部位による抗体価の差については、いずれの免疫グロブリン・クラスにおいても差はなかった。また、各病型別において、HBs 抗原の有無による差は見られず、性別による差、20才～69才までの年齢による抗体価の差も認めなかった。

考 察

エンドトキシン血症についての臨床的研究は、Levin ら¹¹⁾ によるリムルステストの開発を契機に飛躍的な進歩をとげたが、さらに定量性に優れた方法として、合成基質を用いた測定法¹²⁾ による肝疾患における臨床成績¹³⁾ についても蓄積されつつある。しかし、エンドトキシン測定における問題として、その測定値に影響を与える血中阻害因子その他の問題が残されており、現在尚その測定法、特に血漿の前処理法改良のための研究も同時に行われている。一方、古くから行われている肝疾患におけるエンドトキシン抗体出現の意義に関する研究³⁾ についても、その測定法ならびに対象とする抗原の多様性において多くの問題が残されているのみならず、その意義づけについては容易ではない。すなわち、

クッパー細胞の抗原処理能力が既存の肝障害のため十分発揮できなくなり、spill over した抗原物質が脾をはじめとする抗体産生臓器に達するためであるとする考え³⁾ や、別に、肝疾患においては、自己抗体をはじめ種々の抗体が非特異的に増加する¹⁴⁾ からとし、すなわち肝障害に伴う二次的な現象であるとする考え方がある。また一方、Nolan ら⁴⁾ は、四塩化炭素肝障害やコリン欠乏ラットにおける肝障害をエンドトキシンにより修飾し得るとする実験成績に着目すると共に、また逆に腸内細菌を抑えることにより肝障害増悪因子の除去となり得るか否かについての研究を進めている。さらに、Galvin ら²⁾ は、エンドトキシンが肝細胞内ライソゾームに及ぼす影響を中心に同様な研究を進めているが、これらの研究は、エンドトキシンによる直接の肝障害の可能性を強く意識しているものと考えられる。

著者も、そのような考えから肝疾患におけるエンドトキシンの関与について、とくに液性免疫の面から明らかにすることを目的とし、既に報告した測定法⁷⁾ を用いて、肝疾患臨床例について病型別ならびに抗体の免疫グロブリン・クラス別に検討を進めると共に、経時的観察を行い検討した。

エンドトキシン抗体の病型別比較における抗体の免疫グロブリン型の IgG ならびに IgA については、FH、LC、CAH2B、アルコール性肝障害、AH など比較的肝障害の強いものに高値を示す症例が多いのに対し、IgM については、健常者にも高い例があり、逆に、FH あるいは CAH2B において、むしろ低値を示す症例の多いことに興味を持たれた。すなわち、免疫応答を一次応答と二次応答とに区別すれば、重症肝障害あるいは慢性肝疾患においては、より二次応答に近い状態であると考えられた。

しかし、アルコール性肝障害については、抗体の免疫グロブリン型別で、特に IgA の高い症例が多い点が注目された。最近 Nolan ら¹⁵⁾ は、エンドトキシンの化学構造の中でも最も共通部分であり生物活性を有するとされるリピッド A に対する抗体を測定し、特にアルコール性肝障害において IgA が高いという成績を示した。著

者の行った測定方法においては、必ずしも多種の菌種に対応する抗体を測定した事にはならないが、病型別の比較において興味ある成績が得られた。すなわち、肝障害の重症度から予測される値とは異なり、著明な高値を示す例が多く、Nolanらの成績に一致すると同時に、IgA抗体の産生が腸管粘膜など局所の抗体産生細胞に依存している事を考え合わせると、クッパー細胞の働きとは関係しない腸管粘膜を介してのエンドトキシンの吸収量の問題や、抗体産生の行われる場所の違いなどの可能性を示唆しており、他の病型の内でも高い成績を示したFH、LC、CAH2BやAHの病態とも考え合わせて興味ある成績であった。

また、肝疾患経過中における抗体価の変動については、AHの発病、CHの急性増悪のいずれもIgM値、IgA値に影響ないしは抗体価を上昇させる例が多く見られた。しかし、抗体のIgG型については、AHでは変動を示さない例が多く、CHにおいても少数例に上昇を認めるに過ぎなかったにもかかわらず、CHにおいては観察時、既に高い抗体価を示していた。すなわち、CH経過中におけるいずれかの時期に、IgGの上昇があるものと思われるが、更に長期にわたる経過観察が必要と考えられた。

その意味において、個々の症例について、菌種の違いによる免疫応答の違いをみると、同じ症例であっても菌種に対応する免疫グロブリン・クラスに違いがあることや、反応の時期の違いがあることがわかった。すなわち、AHの発病やCHの増悪の時期に、一様に抗体が産生されるのではないとすれば、たまたま腸管内常在菌の菌種の違いがあるにせよ、必ずしも肝障害に続く2次的な抗体産生ではなく、エンドトキシンが肝障害の増悪に直接関与している可能性、すなわち、クッパー細胞の機能を修飾するのみならず、何かクッパー細胞の機能を低下させる原因が他にあつて、エンドトキシンが肝実質障害に関与する可能性が考えられた。

肝疾患における高ガンマグロブリン血症については、著者は、lipid Aなどエンドトキシンにおける共通部分に対する抗体に関する成績を持たないが、エンドトキシン抗体が、主としてIgM

の免疫グロブリン・クラスに属するとの報告¹⁶⁾と異なり、エンドトキシン抗体におけるIgM以外の抗体が高ガンマグロブリン血症における重要な部分を占めるだろうと思われること、すなわち、エンドトキシン以外の抗原刺激も含めて、抗原の多様性とその抗原刺激の頻度の違いが肝疾患の病態により異なり、エンドトキシンと高ガンマグロブリン血症との関連性を不明確にしているのであつて、エンドトキシンを含める各々の抗原に対する抗体の全体を反映しているものと著者の成績からも推察された。

結 論

E.coli 026:B6に対するエンドトキシン抗体価について、ELISA法を用いて免疫グロブリン・クラス別に測定し、病型別に検討した。

その結果、IgG抗体価は、肝硬変、劇症肝炎、慢性肝炎活動性(CAH2B)、アルコール性肝障害、急性肝炎において高い例が多く、肝障害の重症度と関連する傾向が有った。一方、IgA抗体価は、アルコール性肝障害、劇症肝炎、肝硬変、CAH2B、急性肝炎において高い例が多く、アルコール性肝障害で特に高い例があつた。IgM抗体価は、肝障害の重症度との関連は見られなかったが、急性肝炎と慢性肝炎の急性増悪時に上昇した。また、慢性肝炎においては、IgG抗体価は高かつたが、急性増悪時に更に上昇する症例があつた。

E.coli 026:B6とE.coli 0111:B4に対するエンドトキシン抗体価を同時に検討した症例においては、菌種により異なる免疫グロブリン・クラスの上昇を示す症例や、菌種により異なる時期に上昇する症例があつた。

肝硬変における腹水と食道静脈瘤の有無との関係では、腹水ないしは食道静脈瘤有り群でエンドトキシンIgA抗体はとくに高値であつた。

以上の成績から、エンドトキシン抗体は、単に肝障害の2次的結果で非特異的に高値であるのではなく、肝障害に直接関与していることが示唆された。

尚、本論文の要旨は第8回日本臨床免疫学会総会、第3回エンドトキシン臨床研究会で発表した。

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜った岡山大学保健管理センターの辻孝夫助教授に深謝します。
山大学医学部第1内科学教室の長島秀夫教授と岡山

文 献

1. Triger D R, Boyer T D and Levin J: Portal and systemic bacteraemia and endotoxaemia in liver disease. *Gut* (1978) 19, 935-939.
2. Galvin M J, Shupe K and Lefer A M: Anti-endotoxin actions of methylprednisolone in the isolated perfused cat liver. *Pharmacology* (1978) 17, 181-190.
3. Triger D R, Alp M H and Wright R: Bacterial and dietary antibodies in liver disease. *Lancet* (1972) i, 60-63.
4. Nolan J P: The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology* (1975) 69, 1346-1356.
5. McCabe W R, Kreger B E and Jones M: Typespecific and cross-reactive antibodies in gram-negative bacteremia. *N Engl J Med* (1972) 287, 261-267.
6. Wilkinson S P: Review. Endotoxin and liver disease. *Scand J Gastroent* (1977) 12, 385-386.
7. 土屋正夫: ELISA 法による肝疾患患者血清中のエンドトキシン抗体の測定法. 岡山医学会雑誌 (掲載予定)
8. De Groote J, Desmet V J, Gedick P, Korb G, Popper H, Poulsen H, Scheuer P J, Schmit M, Thaler H, Uehlinger E and Wepler W: A classification of chronic hepatitis. *Lancet* (1968) ii, 626-628.
9. Vos J G, Buys J, Hanstede J G and Hagenars A M: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and passive hemagglutination method for quantification of antibodies to lipopolysaccharide and tetanus toxoid in rats. *Infect Immunity* (1979) 24, 798-803.
10. Engvall E and Perlmann P: Enzyme-linked immunosorbent assay. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled antiimmunoglobulin in antigen coated tubes. *J Immunol* (1972) 109, 129-135.
11. Levin J, Tomasulo P A and Oser R S: Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. *J Lab Clin Med* (1970) 75, 903-911.
12. 原田敏枝, 森田隆司, 岩永貞昭: カプトガニの凝固酵素を用いた内毒素の新しい定量法. *医用酵素* (1978) 3, 43-60.
13. 阿部弘彦, 中野 均, 谷川久一: 肝疾患とエンドトキシン血症. *肝胆膵* (1986) 12, 551-556.
14. Wright R: *Immunology of Gastrointestinal and Liver Disease*. Edwald Arnold, London (1977) pp 93-109.
15. Nolan J P, DeLissio M G, Camara D S, Feind D M and Gagliardi N C: IgA antibody to lipid A in alcoholic liver disease. *Lancet* (1986) i, 176-179.
16. Simjee A E, Hamilton-Miller J M T, Thomas H C, Brumfitt W and Sherlock S: Antibodies to *Escherichia coli* in chronic liver disease. *Gut* (1975) 16, 871-875.

**Clinical significance of enzyme-linked immunosorbent assay for
antibody against endotoxin in sera from
patients with liver diseases**

Masao TSUCHIYA

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. H. Nagashima)

The antibody, and its immunoglobulin class, against endotoxin (LPS ; E. coli 026 : B6) in sera from patients with various liver diseases was examined by the use of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The IgG-antibody titer to endotoxin was high in sera from patients with liver cirrhosis (LC), fulminant hepatitis (FH), severe chronic active hepatitis (CAH2B), alcoholic hepatitis and acute hepatitis (AH), and its titer was associated with the severity of liver injury. The IgA-antibody titer was high in sera of patients with alcoholic hepatitis, FH, LC, CAH2B and AH. The patient with the highest titer had alcoholic hepatitis. The IgM-antibody titer was not associated with the severity of liver injury, but it was associated with the acute stage of acute hepatitis and acute exacerbation of chronic hepatitis. The antibody titer was higher in sera of LC patients with ascites and/or esophageal varices than in LC patients without them (especially IgA-antibody : $p > 0.01$). The ELISA for detection of antibody to endotoxin was useful for clinical observation of patients with liver diseases.