



# 論 文 内 容 要 旨

慢性B型肝炎ウイルスキャリア（HBVキャリア）における肝細胞障害の機序については、HBウイルス自体には肝細胞障害性はなく、肝炎の発症はHBウイルス感染肝細胞に対する宿主の免疫反応により惹起されると考えられている。B型慢性肝炎患者の自己末梢血単核球と自己肝細胞を用いたin vitroにおける肝細胞障害性の研究から、肝細胞障害の機序として、HLA-class I抗原の存在下にHBc抗原を標的とした細胞障害性Tリンパ球による細胞障害が想定されているが、in situにおいては未だ明確な結論は出されていない。

## 【目 的】

筆者は今回、HBVキャリアのin situにおける肝細胞障害の機序を明らかにするため、標的抗原と考えられるHBc抗原と、HLA-class I抗原のサブユニットである $\beta_2$ -microglobulin (BMG)の肝組織内局在を検討した。また一部の症例について、肝細胞障害部位におけるHLA-class I抗原、HBc抗原陽性肝細胞と、Leu2a陽性リンパ球の存在様式を免疫電顕を用いて検討した。

## 【方 法】

1982年～1989年の期間に当科および関連病院で肝生検を施行したHBVキャリアのなかで、免疫組織化学的検討により肝組織内HBc抗原が陽性の117例を対象とした。症例の内訳は男性92例、女性25例、平均年齢は33才（13～75才）であり、肝組織所見はヨーロッパ分類のCPH39例、CAH 2 A33例、CAH 2 B33例と、非特異性反応性肝炎（NSRH）12例であった。肝組織内HBc抗原とBMGの局在は、10%ホルマリン固定パラフィン包埋肝組織標本から連続切片を作成し、ABC法により検討した。0.3% $H_2O_2$ 加80%メタノールにて内因性ペルオキシダーゼ活性をブロック後、一次抗体として家兎HBc抗体および家兎抗BMG（共にDAKO社）を反応させ、次に二次抗体としてビオチン化山羊抗家兎IgG（EY社）、更にABC（Vector社）を反応させ、DAB染色およびヘマトキシリンによる核染色を施行後脱水封入した。免疫電顕による検討は、PLP固定を行った5例の肝生検標本から10 $\mu$ mの連続切片を作成し、酵素抗体間接法を施行した。一次抗体としてマウスモノクローナル抗ヒトHLA-A, B, C（Immunotech社）および抗Leu2a（Becton-Dickinson社）を用い、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識山羊抗マウスIgG F(ab')<sub>2</sub>（EY社）を反応させた。DAB染色を施行後1% $O_3O_4$ にて後固定を行い、エタノール系列で脱水しエポキシ包埋を行った。超薄切片を作成し電子染色を施行後、電子顕微鏡下にリンパ球の接着した肝細胞につ

いて写真撮影を行い、(1)リンパ球が接着したHLA-class I抗原陽性肝細胞内のcore粒子またはDane粒子の出現頻度、(2)Leu2a陽性リンパ球が接着した肝細胞内のcore粒子またはDane粒子の出現頻度、および(3)肝細胞に接着したリンパ球に占めるLeu2a陽性リンパ球の比率、について検討した。

## 【結 果】

I. HBc抗原とBMGの肝組織内局在：1. HBc抗原は、NSRH、CPHと比べてCAHにおいて有意に肝細胞質内への表出がみられた。2. BMG陽性肝細胞の肝小葉内局在はRappaportのzoneに一致した分布を示す例が多く、NSRH、CPHでは陰性ないし肝小葉中心型を示す傾向にあり、CAHでは有意にびまん型および門脈周囲型を示し、炎症部位とBMGの肝小葉内局在との間に密接な関連が認められた。3. BMGの表出が陰性だった11例全例でHBc抗原の肝細胞内局在は核優位型を呈し、BMGの局在がびまん型および門脈周囲型を示す例では、HBc抗原は有意に肝細胞質内に表出された。4. 5例においてBMGとHBc抗原の肝小葉内局在性が一致し、両抗原が共に陽性部位に著明なリンパ球浸潤を認めた。以上の検討から、肝細胞障害部位においてBMG陽性かつ肝細胞質にHBc抗原が陽性の肝細胞がリンパ球による細胞障害を受ける可能性が示唆された。II. 免疫電顕による検討：1. 肝細胞障害部位において、リンパ球が接着したHLA-class I抗原陽性肝細胞、およびLeu2a陽性リンパ球が接着した肝細胞内に高率（それぞれ90%、74%）にcore粒子ないしはDane粒子を認めた。2. 肝細胞に接着したリンパ球の93%がLeu2a抗原陽性であった。

## 【結 語】

以上の光顕的および電顕的免疫組織化学による検討結果は、HBウイルスの増殖が活発なHBVキャリアにおける肝細胞障害の機序として、HLA-class I抗原陽性かつHBc抗原陽性肝細胞が、細胞障害性Tリンパ球による細胞障害を受けていることをin situにおいて直接示すものと考えられた。

## 審査結果の要旨

本論文は、免疫組織化学という確立された方法を用いて慢性B型肝炎患者肝組織内HBc抗原、主要組織適合抗原の局在と浸潤リンパ球の同定を行うことにより、慢性B型肝炎における肝細胞障害の機序の中で、細胞障害性Tリンパ球による細胞障害が中心的役割を持つことを論じている。臨床サンプルを用いた研究は、疾患の病期や個体差などにより分散が大きいため、結果から結論を導き出すには多数例における検討が必要であるが、本論文は結論を導くのに十分な症例数について検討を行っている。更に光顕レベルでは解析が困難な肝細胞障害部位における肝細胞と浸潤リンパ球とのinteractionに関しては、免疫電顕を用いた詳細な検討がなされており、光顕と免疫電顕による検討を組み合わせることにより、著者の結論の裏付けが十分なされている。技術的には、光顕および電顕写真はいずれも反応産物が明瞭に認められ、組織の形態も十分に保たれており、また陰性コントロールでは染色されないことから、反応産物の特異性、その局在に関しては問題がない。

本研究において初めて明らかにされた事実は、免疫電顕による検討で、肝細胞障害部位においてリンパ球と接着したHLA-class I抗原陽性肝細胞の細胞質内に高率にcore粒子が認められ、またcore粒子陽性の肝細胞に接着したリンパ球の大多数が細胞障害性Tリンパ球であった点である。この結果は、従来より、in vitroで想定された『HLA-class I抗原の存在下でHBc抗原を標的とした細胞障害性Tリンパ球による肝細胞障害』と一致するものであり、同じ現象が慢性B型肝炎患者の生体内で起こっている事を証明した点で大きな意義がある。但し、本論文で示された以外の機序が肝細胞障害に関与している可能性も否定できず、本機序が慢性B型肝炎における細胞障害の唯一の機序であるか否かは今後の課題と考えられる。しかし現時点で明らかにされた肝細胞障害の機序は、今後の慢性B型肝炎に対する治療の指針となる臨床的意義があり、本論文は臨床的研究として学位論文に値すると思われる。