

無症候性原発性胆汁性肝硬変症の自然系とウルソデオキシコール酸投与後のリンパ球機能の変化について

著者	荻野 英朗, 鵜浦 雅志, 河合 博志, 寺崎 修一, 柳 昌幸, 松下 栄紀, 卜部 健, 金子 周一, 小林 健一, 中沼 安二, 服部 信
雑誌名	肝臓 = ACTA HEPATOLOGICA JAPONICA
巻	34
号	4
ページ	306-312
発行年	1993-01-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/7059

<原 著>

無症候性原発性胆汁性肝硬変症に対するウルソデオキシコール酸 投与後のリンパ球機能の変化について

荻野 英朗 鷓浦 雅志 河合 博志 寺崎 修一
柳 昌幸 松下 栄紀 卜部 健 金子 周一
小林 健一* 中沼 安二**

要 旨：原発性胆汁性肝硬変症（PBC）治療におけるウルソデオキシコール酸（UDCA）の作用機序の一つを明らかにするために、UDCA 投与の有無別にリンパ球機能を比較し、さらに胆汁酸のNK活性に及ぼす影響について検討した。UDCA 投与群では、UDCA 非投与群に比して、CD3陽性細胞数は有意に低く（投与群66.5%，非投与群74.4%， $p < 0.05$ ），またリンパ球幼若化試験は差を認めなかったが、NK細胞活性は有意に高く（15.4%，11.2%， $p < 0.05$ ），IL-2産生能は低い傾向が認められた。一方、*in vitro*においてケノデオキシコール酸（CDCA）ならびにUDCAのリンパ球機能に及ぼす影響を検討したところ、CDCAはNK細胞活性を有意に低下させたが、UDCAの同時添加によりNK細胞活性の低下が抑制された。以上より、UDCA投与による胆汁酸組成の変化がリンパ球機能の改善をもたらし、PBCの臨床病理学的改善効果の一機序となっている可能性が推測された。

索引用語： 原発性胆汁性肝硬変症 ウルソデオキシコール酸 リンパ球機能

緒 言

原発性胆汁性肝硬変症（以下PBC）は、中年女性に好発し皮膚掻痒感、黄疸などを主症状とし、進行性肝硬変へと至る慢性胆汁うっ滞性肝疾患である。PBCの病因に関しては未だ明らかではないが、高 γ グロブリン血症や、抗ミトコンドリア抗体、結核抗体などの自己抗体の出現、他の自己免疫性疾患の合併等から病態の成立ならびに進展に自己免疫異常が深く関わっているものと考えられている^{1,2)}。

一方、PBCの治療に関してはこれまで利胆剤として使用されてきたウルソデオキシコール酸（以下UDCA）投与により血液生化学的検査所見のみならず組織学的にも改善がみられることが報告されPBCの治療薬として注目されている^{3,4)}。UDCAの作用機序としては、これまで利胆作用、肝細胞保護作用、免疫学的効果などが指摘されているが⁵⁾、未だ不明な点が多い。そこで、著者らはUDCAの免疫学的効果を評価するために、UDCA投与の有無によるPBC患者のリン

パ球機能の変化を検討するとともに、*in vitro*においてケノデオキシコール酸（以下CDCA）ならびにUDCAのリンパ球機能に及ぼす影響を検討した。

対象と方法

1) 対象

過去11年間（1981～1991年）に金沢大学第1内科および関連病院にて、厚生省「難治性の肝炎」調査研究班によるPBC診断基準に従い診断された無症候性PBC患者28例（男性8例、女性20例、年齢 54.6 ± 12.3 歳）と健常者7例（男性2例、女性5例、年齢 61.3 ± 9.3 歳）を対象とした。組織学的には、Scheuer分類でStage I～II 18例、Stage III～IV 9例、肝生検未施行1例であった。対象患者28例中21例にUDCA 600mg/日の経口投与を行いUDCA投与群（平均投与期間10.1カ月）とし、UDCA投与を行わなかった7例をUDCA非投与群として両群間で比較するとともに、UDCA投与群中5例ではUDCA投与前後での変化について比較検討した。各群の臨床像をTableに示す。

2) 末梢血リンパ球機能検査項目

早朝空腹時にヘパリン加採血された末梢血から比重遠心法により単核球を分離し、以下の項目について測

* 金沢大学第1内科

** 同 第2病棟

Table Patients profiles.

	Non-UDCA group	UDCA group
Number	7	21
Age(years old)	58.8±7.7	53.6±12.9
Sex(Male/Female)	3/4	5/16
GOT(IU/L)	55.4±22.7	62.3±78.2
GPT(IU/L)	57.6±20.6	57.6±74.8
ALP(IU/L)	732.0±543.4*	371.2±270.1*
γ-GTP(IU/L)	277.0±204.6*	147.4±161.4*
γ-Globulin(g/dl)	1.5±0.3	1.6±0.6
IgM(mg/dl)	479.1±135.5	437.4±181.9
TBA(μM/L)	5.4±1.6*	24.5±34.8*
BA composition		
CDCA(%)	51.6±6.7*	24.9±7.0*
CA(%)	33.5±1.9*	22.1±24.1*
DCA(%)	9.3±6.7	6.8±5.6
UDCA(%)	5.6±4.0*	46.3±20.1*
Histological stage(Scheuer)		
I-II	5	13
III-IV	2	7

Non-UDCA group: patients non-treated with ursodeoxycholic acid treatment. UDCA group: patients treated with ursodeoxycholic acid treatment. TBA: total bile acid. BA: bile acid. CDCA: chenodeoxycholic acid. CA: cholic acid. DCA: deoxycholic acid. (*: p<0.05)

定を行った。

i) T細胞サブセット

CD3, CD4, CD8, 4/8比についてモノクローナル抗体を用いて, flowcytometry 法で測定した。

ii) リンパ球幼若化試験

mitogen として phytohaemagglutinin-P(PHA-P, DIFCO 社) 20μg/ml, concanavalin A (Con A, EY ラボラトリー社) 15μg/ml, pokeweed mitogen (PWM, GIBCO 社) 2.5μg/ml を添加し 37°C, 5%CO₂ の条件で48時間培養後, [6-³H]-チミジン(アマシャム社) 0.5μCi/well を加えてさらに24時間培養し, 取り込み能を測定し, 以下の式から stimulation index (S.I.) の算定を行った⁶⁾。

S.I.=mitogen 添加時の³H 取り込み能 (cpm)/mitogen 非添加時の³H 取り込み能 (cpm)

iii) Natural Killer (NK) 細胞活性

K562細胞を標的細胞として, Effector cell/Target cell (E/T)=10/1にて, ⁵¹Cr 放出法を用いて測定した⁷⁾。

iv) Interleukin 2 (IL-2) 産生能

PHA-P 20μg/ml を mitogen として48時間培養後の培養上清を採取し, マウス由来 IL-2依存性細胞株

(CTLL-2)を用いて ii)と同様に³H-チミジンの取り込み能を測定した⁸⁾。

3) in vitro での各種温度 CDCA ならびに UDCA の NK 細胞活性に及ぼす影響

まず, 健常者のリンパ球を CDCA または UDCA を無添加, 1.0, 10.0, 100.0μM の各条件で24時間培養後 NK 細胞活性を測定した。次に, CDCA 10.0μM 存在下に UDCA を無添加または1.0, 10.0, 100.0μM 添加し NK 細胞活性を測定した。

4) 統計学的検討

測定値は平均値±標準偏差で示し, 統計学的検討は Student's paired t test または unpaired t test を用い検定した。

結果

T 細胞サブセットは, 正常対象と UDCA 非投与群ならびに UDCA 投与群の各群間で明らかな差はな

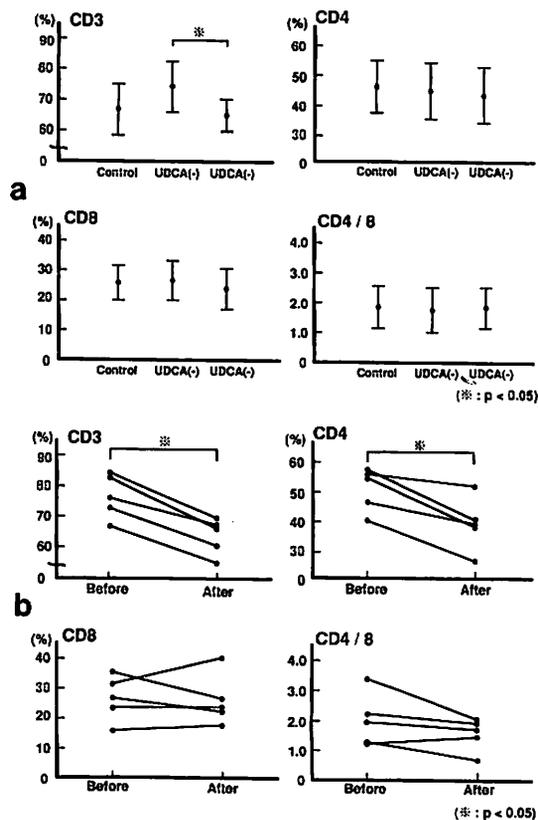


Fig. 1 Peripheral T cell subsets of the patients with primary biliary cirrhosis.

a) Difference between non-UDCA group and UDCA group. b) Comparison of before and after UDCA therapy.

かったが、UDCA 非投与群と UDCA 投与群の比較では、CD3陽性細胞数は UDCA 非投与群で平均74.4%に対して UDCA 投与群では平均66.5%と有意な低下を認めた ($p < 0.05$)。経過の追えた5症例では、UDCA

投与後 CD3陽性細胞数ならびに CD4陽性細胞数において有意な低下がみられた ($p < 0.05$) (Fig. 1)。

リンパ球幼若化試験では、mitogenとして用いた PHA, Con A, PWM のいずれにおいても正常対象、

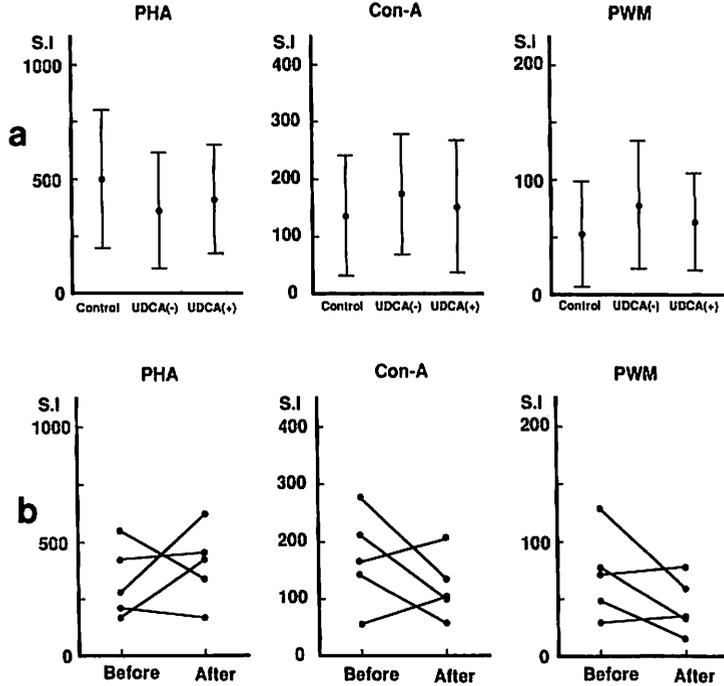


Fig. 2 The lymphocyte stimulation tests of the patients with primary biliary cirrhosis.

a) Difference between non-UDCA group and UDCA group. b) Comparison of before and after UDCA therapy.

PHA : phytohaemagglutinin, Con-A : concanavalin, PWM : pokeweed mitogen

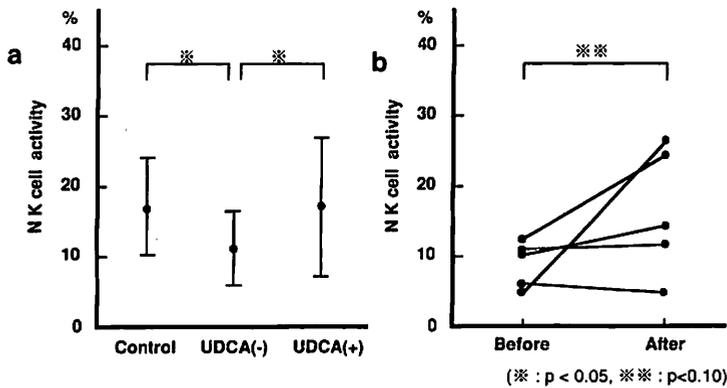


Fig. 3 The natural killer cell activity of the patients with primary biliary cirrhosis.

a) Difference between non-UDCA group and UDCA group. b) Comparison of before and after UDCA therapy.

(※ : $p < 0.05$, ※※ : $p < 0.10$)

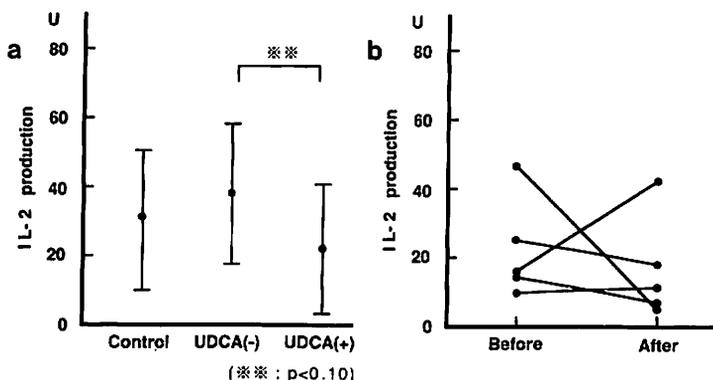


Fig. 4 The interleukin 2 production of the patients with primary biliary cirrhosis.
 a) Difference between non-UDCA group and UDCA group. b) Comparison of before and after UDCA therapy.

UDCA 非投与群, UDCA 投与群の各群間ならびに UDCA 投与前後の比較で差を認めなかった (Fig. 2).

NK 細胞活性では, 正常対象での平均15.2%に対して, UDCA 非投与群では平均11.2%と有意に低く ($p < 0.05$), UDCA 投与群では15.4%と正常対象と同程度であった。また, 経過追跡例でも, UDCA 投与後に NK 細胞活性値の上昇傾向が認められた ($p < 0.10$) (Fig. 3)。

IL-2産生能については, 正常対象と UDCA 非投与群ならびに UDCA 投与群との比較では差はみられなかったが, UDCA 非投与群と UDCA 投与群の比較ではそれぞれ平均36.1単位, 18.0単位と UDCA 投与群で低値の傾向がみられた ($p < 0.10$)。経過追跡例では, 5例中3例で UDCA 投与後に低下を認めた (Fig. 4)。

in vitro での検討では, CDCA をそれぞれ1.0, 10.0, 100.0 μ M 存在下に24時間培養した際の NK 細胞活性は, 無添加時を100としたとき 63.5 ± 32.1 , 58.3 ± 20.6 , $49.2 \pm 23.3\%$ と有意な低下を示した ($p < 0.05$)。これに対して, UDCA の添加時では 90.6 ± 18.9 , 91.8 ± 16.0 , $75.2 \pm 9.2\%$ と UDCA 1.0または10.0 μ M 添加時では NK 細胞活性の抑制はみられず, 100 μ M 添加時のみ NK 細胞活性は有意に低下した (Fig. 5)。

また, CDCA 単独添加で NK 細胞活性の有意な低下を認めた濃度である CDCA 10.0 μ M の存在下に, UDCA をそれぞれ1.0, 10.0, 100.0 μ M 同時に加えた際の NK 細胞活性はそれぞれ 112.8 ± 20.1 , 108.9 ± 15.1 , $84.5 \pm 28.6\%$ であり, UDCA 1.0 μ M ならびに 10.0 μ M 同時添加時には NK 細胞活性の低下が認め

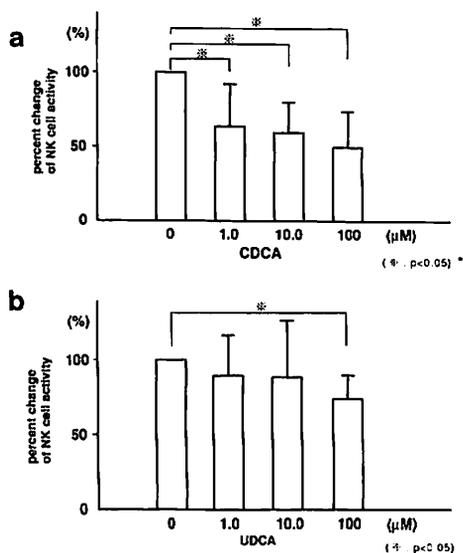


Fig. 5 Effect of CDCA or UDCA on the natural killer cell activity *in vitro*.

a) Effect of CDCA on the natural killer cell activity. b) Effect of UDCA on the natural killer cell activity.

CDCA : chenodeoxycholic acid

られなかった (Fig. 6)。

考 案

Poupon らが, PBC に対する UDCA 療法の有効性を報告して以来³⁾, UDCA 療法により生化学的検査成績のみならず病理学的にも改善を認めることが報告されている^{4,5)}。さらに, UDCA 投与前後の肝生検組織に

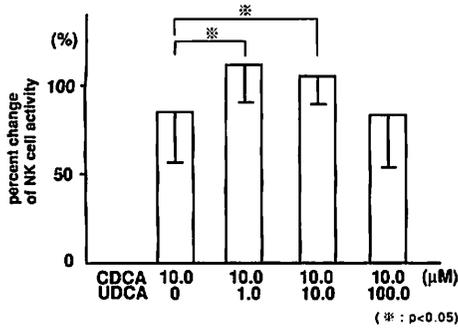


Fig. 6 Effect of UDCA administration on the natural killer cell activity.

において肝細胞の HLA 抗原の表出が消失または低下することも報告され、UDCA 投与後に免疫学的変化が生ずることも推測されている^{9,10}。今回の検討において、UDCA 投与例では末梢血 T 細胞サブセットの CD3 陽性細胞数の低下がみられ、また経過追跡例において CD3 と CD4 陽性細胞の低下を認めた。一般に PBC では、サプレッサー T 細胞機能低下があり相対的にヘルパー T 細胞の増加がみられるとされており¹¹、今回認められた変化から UDCA 投与によりヘルパー T 細胞系への抑制が生じている可能性が推測された。CD4/8 比に関しては、今回の検討では変化を認めなかったが、UDCA 投与前後の検討で低下傾向を認めたとの報告もされている¹²。

NK 細胞活性については、UDCA 非投与群において健常者に比して有意に低下していたが、UDCA 投与群では健常者と同程度となり、UDCA 投与により NK 細胞活性が回復を示すことが示唆された。これまでの報告でも NK 細胞活性の低下は PBC に特異的な異常であると考えられているが、末梢血ならびに肝組織中で NK 細胞数は健常者に比して変化していないことから NK 細胞の機能異常と推察され、NK 細胞の活性化に関与するサイトカインネットワークなどの異常も想定されている¹³。UDCA 投与の有無による変化について報告はないが、今回の検討から UDCA の投与により NK 細胞活性化に関与する免疫系への変化が生じ、NK 細胞活性の回復がもたらされた可能性が示唆された。

IL-2 産生能では、UDCA 投与群で UDCA 非投与群に比して低く UDCA 投与により IL-2 産生を抑制している可能性も推測されたが、健常者とは両群ともに差を認めず、経過追跡例で一定の傾向がみられなかった

ことから UDCA 投与によるリンパ球の IL-2 産生能に及ぼす影響についてはさらなる検討が必要であると考えられた。

胆汁酸の免疫系への影響に関しては、これまでに多くの報告がなされている¹⁴⁻¹⁸。胆汁うっ滞時に血中に増加した胆汁酸が個体の免疫能を低下することが指摘されており、その機序として胆汁酸の有する detergent 作用によるリンパ球膜の障害やリンパ球の増殖に不可欠なコレステロール合成に関与する酵素系の障害などが推測されている¹³⁻¹⁷。PHA や レクチンによるリンパ球幼若化反応を用いた検討でも CDCA やデオキシコール酸(以下 DCA)などで幼若化反応の抑制が顕著にみられることが示されているが、UDCA ではその抑制効果は軽微であるとされている¹³⁻¹⁵。これに対して、UDCA は IgM, IgG, IgA などの免疫グロブリン産生を抑制し、さらに IL-2, IL-4, Interferon- γ などのサイトカイン産生も抑制したとする *in vitro* での検討も報告されている¹⁸。

一方、肝細胞や赤血球を用いた研究で CDCA や DCA と UDCA を同時に添加した場合 CDCA や DCA で認めた細胞障害が有意に軽減されることが報告されている¹⁹。

今回、リンパ球機能に影響を及ぼしていると考えられている胆汁酸である CDCA と UDCA について NK 細胞活性に及ぼす影響を検討した。CDCA では、1.0 μ M の低濃度から NK 細胞活性の低下がみられ濃度を増加するとさらに低下したのに対して、UDCA では 1.0 μ M や 10.0 μ M では NK 細胞活性の低下はみられなかった。すなわち、これまでの報告と同様に NK 細胞活性に及ぼす影響でも CDCA に比較し UDCA は明らかに軽微であると考えられた。さらに、CDCA が NK 細胞活性を低下させるに十分な量の存在する条件で各種濃度の UDCA を同時添加した際には NK 細胞活性の低下が抑制されたことから、UDCA は CDCA の NK 細胞活性抑制効果を軽減することが示唆された。

PBC 患者での UDCA 投与前後の血中の胆汁酸量および胆汁酸組成の変化の検討では、UDCA 投与後には総胆汁酸量は増加し胆汁酸組成は UDCA 分画が優位になり、CDCA や DCA などの細胞障害性の強い胆汁酸量は不変であることから、細胞障害性の強い胆汁酸組成から細胞傷害性のより弱い胆汁酸組成への変化、すなわち血中胆汁酸の hepatotoxicity index の低下が UDCA の PBC に対する有益な作用として考えら

れると報告されている²⁰⁾。今回、*in vivo* でみられた UDCA 投与後のリンパ球機能異常の改善についても、UDCA の胆汁酸組成の改善を寄与していると考えられ、PBC に対する UDCA 療法の作用機序としても UDCA の有する肝細胞保護作用に加えて、胆汁酸組成の改善によるリンパ球機能の改善が関与している可能性が示唆された。

結 語

PBC 治療における UDCA の作用機序の一つを明らかにするために、UDCA 投与の有無によるリンパ球機能の検討を行った。UDCA 投与群では UDCA 非投与群に比して CD3陽性細胞数の低下、NK 細胞活性の上昇、IL-2産生能の低下が認められた。また、*in vitro* において CDCA ならびに UDCA のリンパ球機能に及ぼす影響を検討したところ、CDCA は NK 細胞活性を有意に低下させたが、UDCA の同時添加により NK 細胞活性の低下が抑制された。

以上より、UDCA 投与による胆汁酸組成の変化がリンパ球機能の改善をもたらし、この改善が UDCA による PBC の臨床病理学的改善効果の機序の一つになっている可能性が推測された。

謝辞：本研究にご協力いただいた黒部市民病院牧野 博先生、森岡 健先生、富山労災病院野田八嗣先生、富山通信病院平井信行先生、富山県立中央病院広瀬昭一郎先生、中川彦人先生、厚生連高岡病院木谷 恒先生、砺波総合病院杉本立甫先生、金井正信先生、金沢市立病院米島学先生、公立石川中央病院古沢明彦先生、福井済生会病院田中延善先生、福岡賢一先生、加登病院加登康洋先生、ビーエムエル総合研究所田沢 正氏、五十嵐寛氏に深謝致します。また本研究の一部は厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究班の援助によった。

文 献

- 1) Dickson ER, Fleming CR, Ludwig J, et al: Primary biliary cirrhosis. *In*: Popper H, Schaffner F, eds. Progress in Liver Diseases. vol VI. Grune & Stratton. New York, 1977, p487-502
- 2) 石原 清, 朝倉 均: 原発性胆汁性肝硬変と免疫調節異常. *Medical Immunology* 17: 683-686, 1989
- 3) Poupon R, Chretien Y, Poupon RE, et al: Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? *Lancet* 1: 834-836, 1987
- 4) Leuschner U, Fischner H, Kurtz W, et al:

- Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: Results of a controlled double-blind trial. *Gastroenterology* 97: 1268-1274, 1989
- 5) Matsuzaki Y, Tanaka N, Ousuga T, et al: Improvement of biliary enzyme levels and itching as a result of long-term administration of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 85: 15-23, 1990
- 6) Winchurch RA, Cimino E: Analysis of variability of *in vitro* lymphocyte responses as measured by laser cytometry and thymidine incorporation. *J Immunol Methods* 23: 269-274, 1978
- 7) 原田弘智, 河合 忠: NK 細胞活性の測定法. *臨床検査* 28: 72-78, 1984
- 8) 向田直史, 笠原 忠: インターリュウキンの検査. *臨床検査* 30: 109-117, 1986
- 9) Calmus Y, Gane P, Rouger P, et al: Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: Effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 11: 12-15, 1990
- 10) Terasaki S, Nakanuma Y, Ogino H, et al: Hepatocellular and biliary expression of HLA antigens in primary biliary cirrhosis before and after ursodeoxycholic acid therapy. *Am J Gastroenterol* 86: 1194-1199, 1991
- 11) Sherlock S: Primary Biliary cirrhosis. *In*: Diseases of the Liver and Biliary System, Edited by Sherlock S, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989, p273-288
- 12) 和田達郎, 神代龍吉, 谷川久一: 原発性胆汁性肝硬変に対するウルソデオキシコール酸の長期投与による効果. *Tokyo Tanabe Quarterly* 1989(臨時増刊): 39-46, 1989
- 13) James SP, Jones EA: Abnormal natural killer cytotoxicity in primary biliary cirrhosis: Evidence for a functional deficiency of cytolytic effector cells. *Gastroenterology* 89: 165-171, 1985
- 14) Newberry WM, Shorey JW, Sanford JP, et al: Depression of lymphocyte reactivity to phytohemagglutinin by serum from patients with liver disease. *Cell Immunol* 6: 87-97, 1973
- 15) Gianni L, Di Padova F, Zuin M, et al: Bile acid-induced inhibition of the lymphoprolife-

- rative response to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen: An *in vitro* study. Gastroenterology 78: 231-235, 1980
- 16) Hamprecht B, Roscher R, Waltinger G, et al: Influence of bile acids on the activity of rat liver 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase. 2. Effect of cholic acid in lymph fistula rats. Eur J Biochem 18: 15-19, 1971
- 17) Calandra S, Tarugi P, Battistini N, et al: Cholesterol synthesis in isolated rat hepatocytes. *in vitro* effect of sterols and bile acids. Exp Mol Pathol 30: 434-448, 1979
- 18) Yoshikawa M, Tsujii T, Matsumura K, et al: Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses. Hepatology 16: 358-364, 1992
- 19) Heuman DM, Pandak WM, Hylemon PB, et al: Conjugates of ursodeoxycholate protect against cytotoxicity of more hydrophobic bile salts: *In vitro* studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. Hepatology 14: 920-926, 1991
- 20) Crosignani A, Podda M, Battezzati PM, et al: Changes in bile acid composition in patients with primary biliary cirrhosis induced by ursodeoxycholic acid administration. Hepatology 14: 1000-1007, 1991

Effect of ursodeoxycholic acid therapy on lymphocyte function of patients with primary biliary cirrhosis

Hedero OGINO, Masashi UNOURA, Hiroshi KAWAI, Shuichi TERASAKI, Masayuki YANAGI, Eiki MATSUSHITA, Takeshi URABE, Shuichi KANEKO, Kenichi KOBAYASHI* and Yasuni NAKANUMA**

Primary biliary cirrhosis (PBC) is a chronic autoimmune liver disease. In order to elucidate the role of ursodeoxycholic acid (UDCA) treatment through immune reaction, we studied lymphocyte function of patients with primary biliary cirrhosis with or without UDCA treatment. 28 patients with asymptomatic PBC (21 treated and 7 non-treated with UDCA (600 mg/day, p.o.)) and 7 normal subjects were studied. 5 patients were evaluated before and after treatment with UDCA. In T cell subsets, the ratio of CD3 positive cell was low in patients treated with UDCA compared to that in patients without UDCA treatment ($p < 0.05$). Although no significant difference among three groups was shown in the lymphocyte stimulation tests, the natural killer cell activity was significantly high and the interleukin 2 production was significantly low in patients treated with UDCA compared with those in patients without UDCA treatment ($p < 0.05$). *In vitro* study, the natural killer cell activity became significantly low when peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were incubated with 1.0, 00.0 or 100.0 μM of chenodeoxycholic acid (CDCA). However, the effect of CDCA on the natural killer cell activity was diminished when PBMCs were incubated with UDCA simultaneously. Thus, these data suggest that the effect of UDCA treatment for patients with PBC may be mediated through immune reaction induced by the change of bile acid composition.

* First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University (Kanazawa)

** Second Department of Pathology, School of Medicine, Kanazawa University (Kanazawa)