

## アルコールによる IMMUNE CIRCUIT 増幅作用の解析

奈良県立医科大学第3内科学教室

東野 正

## ANALYSIS OF ENHANCING EFFECTS OF IMMUNE CIRCUIT ELICITED BY ALCOHOL

TADASHI HIGASHINO

*The Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University*

Received July 21, 1994

*Abstract*: In order to acquire a better understanding of the precise mechanism of elevated serum IgA levels in patients with alcoholic liver diseases, the author investigated effects of alcohol (AL) on the immune circuit in C57BL/6 (high AL preference) mice and DBA/2 (low AL preference) mice.

Short-term administration of AL elicited polyclonal antibody production in C57BL/6 mice, but not in DBA/2 mice. Long-term oral administration of AL, however, elicited polyclonal antibody production in the spleen and Peyer's patch of DBA/2 mice as well as C57BL/6 mice.

When sheep red blood cells (SRBCs) were administered as an antigen, intraperitoneal injection of SRBCs induced stronger anti-SRBC responses than oral administration in both mice. After 1 month oral administration of AL, however, differences of anti-SRBC responses were not observed between intraperitoneal and oral administration. Moreover, after 4 months oral administration of AL, oral administration of SRBCs caused stronger anti-SRBC responses than intraperitoneal administration. Thus, long-term oral administration of AL altered the degree of immune responses that was caused by the difference of administration routes of the antigen. These results suggest that AL increased the permeability of antigens in the intestinal mucosal layer. Furthermore, it was demonstrated that long-term oral administration of AL activated T-cells and macrophages, and increased both Interleukin-1 and Interleukin-2 activity.

These results indicate that AL acts as a low-molecular-weight polyclonal B-cell activator, and enhances polyclonal antibody production in the gut-associated lymphoid tissue such as Peyer's patch. Therefore, it is suggested that AL enhances the immune circuit, resulting in the increase of serum IgA levels in patients with alcoholic liver diseases.

## Index Terms

alcoholic liver diseases, IgA, Peyer's patch, polyclonal antibody production, immune circuit

## 緒 言

アルコール性肝疾患では体液性免疫系の変化として高IgA血症をしばしばともない、他の肝疾患との鑑別に有

用であるといわれているが<sup>1)-5)</sup>、その機序についてはいまだ十分に解明されているとはいえない。

従来は、アルコールによる肝障害が肝線維症や肝硬変症に進行した段階で、肝や脾での網内系機能の低下<sup>6)</sup>や、

消化管粘膜での抗原透過性の亢進<sup>7)</sup>が生じ、これらが抗原刺激量を増大させて抗体産生系を増幅<sup>8)</sup>し、さらにIgA抗体の胆汁中への分泌の減少が加わって、血清IgA濃度の上昇が生じる可能性<sup>9)</sup>が考えられていた。

しかし近年では、肝に組織学的な障害のみられない時期から血清IgA濃度が上昇し、血中リンパ球の非特異的IgA抗体産生能も増大しているという報告<sup>5),10),11)</sup>もみられ、肝や脾での網内系機能の低下が生じていない段階ですでにIgA抗体産生系が増幅されている可能性も考えられている。

一方、IgA抗体は、小腸のパイエル板を中心としたgut associated lymphoid tissue(以下GALTと略す)と肝との間でhoming現象を介して循環し、調節を受けながら、消化管での局所免疫機構の中心的な役割を担っていることはよく知られている<sup>12),13)</sup>。

以上のことから、アルコールがGALTを中心とした消化管免疫機構を直接的あるいは間接的に活性化して、血清IgA濃度の上昇に向けてimmune circuitを増幅させている可能性が考えられる。そして、アルコール性肝疾患にみられる高IgA血症の機序を解明するためには、アルコールがimmune circuitにおよぼす影響を詳しく調べることは重要なことであると思われる。しかし、ヒトのアルコール性肝疾患の場合、食餌因子や肝炎ウイルスなどの関与があり、純粋にアルコールの影響が否かを明確には断定しえず、動物実験モデルによる検討が必要と考えられる。

そこで今回筆者は、アルコール高嗜好性のC57 BL/6マウス<sup>14)</sup>とアルコール低嗜好性のDBA/2マウス<sup>14)</sup>に、短期および長期的にエタノールを投与して動物実験モデルを作成し、アルコールがimmune circuitに与える影響を、脾細胞やパイエル板細胞での抗体産生能の変化を中心に検討した。また、これらの変化に関連するInterleukin-1(以下IL-1と略す)活性やInterleukin-2(以下IL-2と略す)活性の変化についても検討した。

## 材料と方法

### 1. 実験動物

アルコール投与の対象としては、近交系のアルコール高嗜好性C57 BL/6マウス、C57 BL/6-bgマウス、胸腺欠損C57 BL/6ヌードマウス、及びアルコール低嗜好性のDBA/2マウスの6週齢から32週齢の雄を用いた。飼育には通常の固形飼料を用いた。

IL-1活性の測定に用いる胸腺細胞は、4から8週齢のlipopolysaccharide(以下LPSと略す)不応答性のC3H/HeJマウスから採取した。

なお、これらのマウスは日本エスエルシー社から入手した。

### 2. アルコールおよびLPSの投与方法

短期実験では、C57 BL/6マウス、C57 BL/6-bgマウス、C57 BL/6ヌードマウスおよびDBA/2マウスに種々の濃度(20%、10%、5%、2%、1%)のエタノールを、量を変えて(0.1 ml, 0.5 ml, 1.0 ml)、経口的、経静脈的あるいは腹腔内に1回投与した。

長期実験では、20%に調整したエタノールをC57 BL/6とDBA/2の両マウスに1回に0.5 mlを隔日にて経口的に投与した。

また、既知のB細胞活性化物質として50  $\mu$ gのLPS<sup>15)</sup>(*Escherichia coli* 0111:B4株由来、Difco社製)を腹腔内に投与した。

なお、経口的投与に際しては、毎回胃管を挿入して注入した。

### 3. 特異抗原の投与方法

アジュバント作用や抗原特異的抗体産生能の変化を調べるために、ヒツジ赤血球抗原(以下SRBCと略す、日本生物材料社製)を腹腔内または胃管を用いて経口的に投与した。

アジュバント作用の検討には $5 \times 10^4$ 個のSRBCを腹腔内に1回投与し、抗原特異的抗体産生能の検討には $3 \times 10^8$ 個のSRBCを経口的に1週間間隔で2回投与した。

### 4. マクロファージの採取方法

マウス腹腔内に5 mlの生理的食塩水を注入し、腹部を十分にマッサージした後に回収する。こうして得たマウス腹腔細胞からプラスチック非付着細胞を除去した後、混入しているリンパ球を不活性化するため30分間で30 Gyのレントゲン線を照射したものを腹腔マクロファージとして用いた。

### 5. T細胞の採取方法

Juliusらの方法<sup>16)</sup>に準じて、マウスより摘出分離した有核脾細胞をナイロンウール(東レ社製)カラムに通し、ナイロンウール非付着細胞をT細胞として用いた。

### 6. パイエル板細胞の採取方法

マウス从小腸を摘出し、肉眼的に視認可能なパイエル板を6~8個、眼科用ハサミを用いて漿膜側から粘膜を巻き込まないように採取し、メッシュを用いて浮遊細胞としたものをパイエル板細胞として用いた。

7. IL-1活性およびIL-2活性の測定に用いる検体の調整方法。

IL-1活性の測定には、マクロファージを5%のfetal calf serum(以下FCSと略す、Flow Laboratory社製)

を添加した RPMI 1640 培養液(以下 RPMI と略す。日水製薬社製)中に  $1.0 \times 10^6$ /ml に調整し、37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間培養後に遠沈して得た上清液と血清中の分子量 10,000~20,000 の分画を検体として用いた。分子量 10,000~20,000 の分画は、Sarorius 社製のセントリザルト I(分子量 10,000 用; SM 132 39 E, 分子量 20,000 用; SM 132 49 E)のうち、まず SM 132 39 E で 2,500 G, 20 分間遠沈して分子量 10,000 以上の分画を得た。次にこの分画から SM 132 49 E で 2,500 G, 20 分間遠沈して分子量 20,000 以下の分画を得たものを検体として用いた。

IL-2 活性の測定には、マウス有核脾細胞を 5% FCS 加 RPMI 中に  $1.0 \times 10^6$ /ml になるように調整し、2.0 μg/ml の Concanavalin A(以下 Con A と略す。Difco 社製)存在下に 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間培養し、その培養上清液を検体として用いた。

#### 8. 抗体産生細胞数の測定方法

非特異的抗体産生細胞数は、ラビット抗マウス IgM, IgG, IgA 抗体を用いた protein-A plaque forming cell 法<sup>17),18)</sup>により、IgM, IgG, IgA 各クラスのプラーク形成細胞数(以下 PFC と略す)を測定した。

SRBC に対する抗原特異的抗体産生細胞数の測定は Jerne らの方法<sup>19)</sup>に従い、SRBC 特異的 IgM-PFC は直接法で、SRBC 特異的 IgG および IgA-PFC は間接法で測定した。

なお、ラビット抗マウス IgM, IgG, IgA 抗体は Litton Bionetics 社製、protein-A は Pharmacia LKB 社製のものを用いた。

#### 9. IL-1 活性の測定方法

4~8 週齢の LPS 不応答性の C3H/HeJ マウスの胸腺を取り出し、メッシュで浮遊細胞とし、20% FCS 加 RPMI 中に  $4.0 \times 10^6$ /ml になるように調整する。その 100 μl を 96 穴マイクロプレートに分注し、測定しようとする血清等の検体と 0.2 μg の Con A を含む混合液を、各ウェルに 100 μl ずつ入れる。37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 72 時間培養し、培養終了 4 時間前に 29.6 kBq の [<sup>3</sup>H]-thymidine(以下 [<sup>3</sup>H]-TdR と略す)でパ

ルスラベルし、培養終了後にセルハーベスターで細胞を集め、液体シンチレーションカウンターで [<sup>3</sup>H]-TdR 摂取率を測定した。

#### 10. IL-2 活性の測定方法

IL-2 依存性のマウス cytotoxic T-cell line を 5% FCS 加 RPMI 中に  $5.0 \times 10^4$  ml になるように調整する。その 50 μl を 96 穴マイクロプレートに分注し、測定しようとする検体を各ウェルに 50 μl ずつ入れる。さらに 5% FCS 加 RPMI を 50 μl ずつ入れ、37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 40 時間培養する。培養終了 6 時間前に 29.6 kBq の [<sup>3</sup>H]-TdR でパルスラベルし、培養終了後にセルハーベスターで細胞を集め、液体シンチレーションカウンターで [<sup>3</sup>H]-TdR 摂取率を測定した。

## 結 果

1. アルコール高嗜好性マウスと低嗜好性マウスにおける短期アルコール投与の抗体産生におよぼす影響。

アルコール高嗜好性の C57 BL/6 マウスに 20% エタノール 0.5 ml を経口的、経静脈的あるいは腹腔内に 1 回投与し、3 日目に脾細胞での非特異的抗体産生能の変化を調べた。

Table 1 に示すように IgM, IgG, IgA の各クラスとも、エタノールを投与していない群に比べエタノール投与群では、いずれの投与方法においても非特異的抗体産生細胞数の有意な増加が認められた。IgM, IgG, IgA の各クラス間での抗体産生細胞数の増加率については統計学的な有意差は認められないが、IgA の増加の程度は IgM, IgG に比べやや少ない傾向にあった。

次に、アルコール低嗜好性の DBA/2 マウスに 20% エタノールを 0.1 ml, 0.5 ml, 1.0 ml の各量を腹腔内に 1 回投与した。また、DBA/2 マウスの反応性をみるため、既知の B 細胞活性化物質である LPS をエタノール投与時に腹腔内に 1 回投与した。エタノール投与後 3 日目に非特異的抗体産生細胞数を調べたところ、Table 2 に示すようにアルコール低嗜好性の DBA/2 マウスでは非特異的抗体産生細胞数の有意な増加は認められなかった。しかし、LPS に対しては非特異的抗体産生細胞数の増加

Table 1. Enhancement of polyclonal antibody production induced by alcohol in C57BL/6 mice

Stimulant	Route	IgM PFC/Spleen	IgG PFC/Spleen	IgA PFC/Spleen
None		6,440 ± 636	4,800 ± 278	4,333 ± 201
Alcohol	I. P.	12,750 ± 1,705*	12,800 ± 768*	7,750 ± 847*
Alcohol	I. V.	19,250 ± 934*	17,800 ± 2,675*	11,200 ± 922*
Alcohol	Per Os	17,066 ± 2,237*	30,096 ± 2,439**	22,557 ± 1,266**

Differences in PFC/Spleen were tested for statistical significance compared with control(None) group, using the Student's t-test. \*P<0.001, \*\*P<0.0001.

がみられており、DBA/2 マウスはすべてのB細胞活性化物質に対して反応しないのではなく、少なくとも1回のアルコール投与に対しては応答しないと考えられる。

2. アルコールによる抗体産生増強時におけるT細胞とマクロファージの関与

マクロファージに機能不全のあるC57 BL/6-bg マウスに20%エタノール0.5 mlを腹腔内に1回投与したところ、非特異的な抗体産生の増大は認められなかった。次に、C57 BL/6 マウスのマクロファージを採取し、 $3 \times 10^5$ 個をC57 BL/6-bg マウスの腹腔内に注入した。24時間後、20%エタノール0.5 mlを腹腔内に1回投与し、その3日後に抗体産生能の変化を調べた。マクロファージのみを注入した群はマクロファージを注入しない群に比べ抗体産生が増大していた。さらに、マクロファージ注入後にエタノールを投与した群では、マクロファージのみを注入した群よりも抗体産生が一層増大する傾向がみられた(Table 3)。

次いで、胸腺欠損のあるC57 BL/6 ヌードマウスに20

%エタノール0.5 mlを腹腔内に1回投与したところ、非特異的な抗体産生の増加は認められなかった。しかし、C57 BL/6 マウスのT細胞を採取し、その $3 \times 10^5$ 個をC57 BL/6 ヌードマウスの腹腔内に注入し、24時間後に20%エタノール0.5 mlを腹腔内に1回投与し、3日後に抗体産生能の変化を調べたところ、T細胞のみを注入した群はT細胞を注入しない群に比べ抗体産生の増加がみられた。さらに、T細胞を注入した後、エタノールを投与した群では、抗体産生の増加がより一層増大する傾向がみられた(Table 4)。

また、C57 BL/6 マウス脾細胞の *in vitro* 培養実験では、アルコールによる非特異的な抗体産生の増大は認められなかった。

これらの結果から、アルコールは *in vivo* において間接的にマクロファージやT細胞を活性化することにより、B細胞に非特異的な抗体産生を誘導するものと考えられた。

3. アルコールのアジュバント作用

Table 2. Effect of alcohol on polyclonal antibody production in DBA/2 mice

Stimulant	Dose	IgM PFC/Spleen	IgG PFC/Spleen	IgA PFC/Spleen
None	0	10,667 ± 2,049	2,040 ± 421	1,733 ± 201
Alcohol	0.1 ml	10,660 ± 3,762*	2,640 ± 768*	1,700 ± 239*
Alcohol	0.5 ml	7,100 ± 1,207*	3,440 ± 504**	1,857 ± 170*
Alcohol	1.0 ml	3,700 ± 495**	1,200 ± 283**	600 ± 15**
LPS	50 µg	52,800 ± 15,249***	38,133 ± 1,454***	3,600 ± 430**

Differences in PFC/Spleen were tested for statistical significance compared with control (None) group, using the Student's t-test. \*not significant, \*\*P<0.005, \*\*\*P<0.001.

Table 3. Effect of C57BL/6 macrophages on alcohol-induced responses in C57BL/6-bg mice

Stimulant	C57BL/6 Macrophages	IgM PFC/spleen	IgG PFC/Spleen	IgA PFC/Spleen
None	-	15,620 ± 1,657	10,300 ± 3,522	8,350 ± 794
Alcohol	-	12,700 ± 1,383*	8,933 ± 1,072*	11,200 ± 1,222*
None	+	27,760 ± 8,483**	25,600 ± 2,025**	22,600 ± 4,073**
Alcohol	+	90,400 ± 10,810***	63,667 ± 15,733***	68,000 ± 2,898***

Differences in PFC/Spleen were tested for statistical significance compared with control (None, -) group, using the Student's t-test. \*not significant, \*\*P<0.005, \*\*\*P<0.001.

Table 4. Effect of C57BL/6 T-cells on alcohol-induced responses in athymic C57BL/6 nude mice

Stimulant	C57BL/6 T-cells	IgM PFC/spleen	IgG PFC/Spleen	IgA PFC/Spleen
None	-	4,100 ± 248	3,658 ± 722	1,006 ± 67
Alcohol	-	3,080 ± 365*	4,326 ± 1,072*	869 ± 222*
None	+	11,150 ± 3,674**	12,674 ± 2,025**	1,869 ± 743*
Alcohol	+	28,033 ± 4,016***	33,869 ± 8,733***	6,846 ± 1,348**

Differences in PFC/Spleen were tested for statistical significance compared with control (None, -) group, using the Student's t-test. \*not significant, \*\*P<0.005, \*\*\*P<0.001.

C57 BL/6 と DBA/2 の両マウスについて、T細胞依存性抗原である SRBC に対するアルコールのアジュバント作用を調べた。各々のマウスに  $5 \times 10^4$  個の SRBC を腹腔内に 1 回注入し、直後に 20% エタノール 0.5 ml を腹腔内に 1 回投与した。4 日後に SRBC に対する特異的抗体産生細胞数を測定した。Table 5 に示すように、アルコール高嗜好性の C57 BL/6 マウスでは著しいアジュバント効果がみられたのに対し、アルコール低嗜好性の DBA/2 マウスではほとんどその効果がみられなかった。このことから、アルコールのアジュバント作用もまたアルコール嗜好性の高低に関係するものと考えられた。

4. 長期アルコール経口投与の抗原非特異的抗体産生におよぼす影響

20% エタノールを C57 BL/6 と DBA/2 の両マウスに 1 日 1 回、0.5 ml ずつ、隔日にて経口投与した。1 カ月ごとに脾細胞における IgM, IgG, IgA 各クラスの特異的抗体産生細胞数を測定し、その経時的変化を検討した。

C57 BL/6 マウスでは、IgM, IgG, IgA の各クラスとも 1 カ月目では一度アルコールによる非特異的抗体産生の

増大はみられなくなるが、さらに投与を続けると、2 カ月目をピークとして再度、各クラスの特異的抗体産生の増大がみられるようになった (Fig. 1)。

DBA/2 マウスでは、1 回の経口投与でみられなかった非特異的抗体産生の増大が、IgM, IgG, IgA の各クラスとも 1 カ月目には認められるようになった。その後、IgM, IgG の両クラスでは一度反応性は低下したが、4 カ月目には再度、非特異的抗体産生能の増大がみられた。一方、IgA クラスでは、アルコールの投与期間が長くなるにつれ、非特異的抗体産生の増大がしだいに増強していく傾向がみられた (Fig. 2)。

次に、同じ実験系で小腸のマイエル板細胞を採取し、マイエル板における非特異的抗体産生の経時的変化につき検討した。

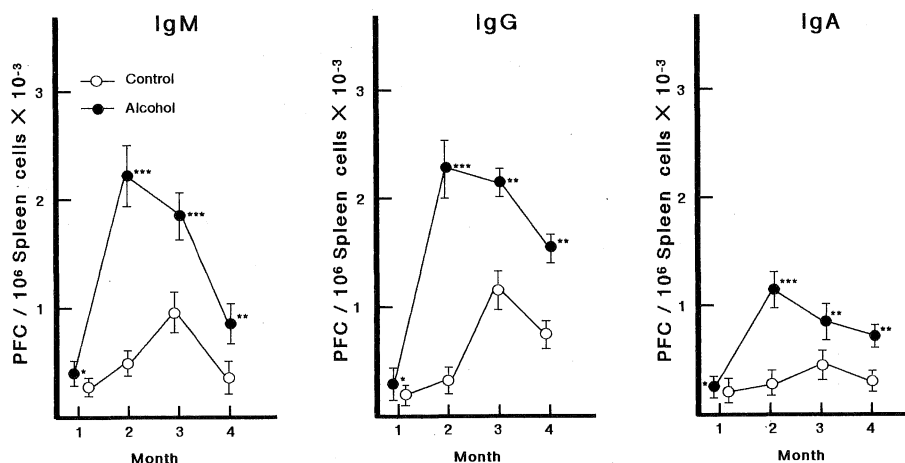
C57 BL/6 マウスでは 2 カ月目から、DBA/2 マウスでは 3 カ月目から、マイエル板での非特異的抗体産生の増大が認められるようになった (Fig. 3, 4)。

5. 長期アルコール経口投与の抗原特異的抗体産生におよぼす影響

Table 5. Effect of alcohol on T-cell-dependent antibody responses

Strain	Antigen	Adjuvant	Anti-SRBC PFC/Spleen	Anti-SRBC PFC/ $10^7$ Cells
C57BL/6	SRBC	None	1,775 ± 479	160 ± 32
	SRBC	Alcohol	27,650 ± 2,290**	3,105 ± 217**
DBA/2	SRBC	None	3,960 ± 270	210 ± 6
	SRBC	Alcohol	4,560 ± 949*	347 ± 40*

Differences were tested for statistical significance compared with control (SRBC alone) group, using the Student's t-test. \*not significant, \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



\* not significant, \*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , Student's t-test.

Fig. 1. Kinetics of the effect of long term oral alcohol administration on polyclonal antibody production in C57BL/6 mice.

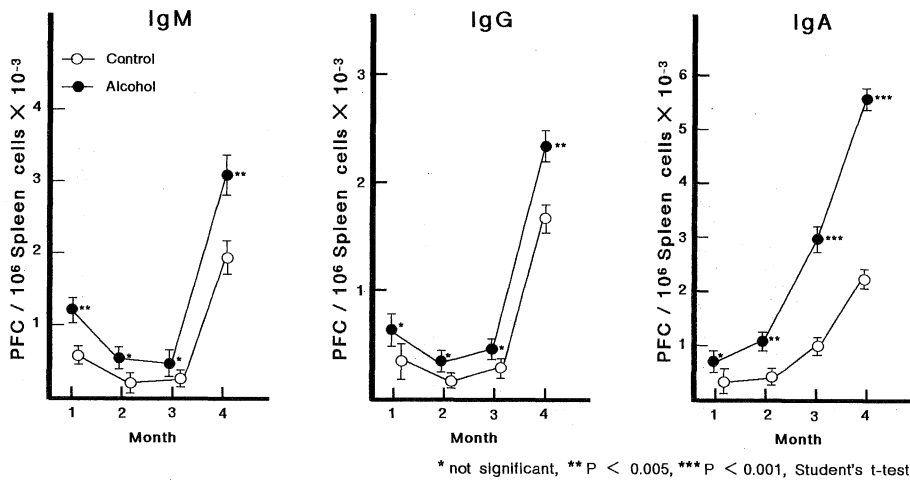


Fig. 2. Kinetics of the effect of long term oral alcohol administration on polyclonal antibody production in DBA/2 mice.

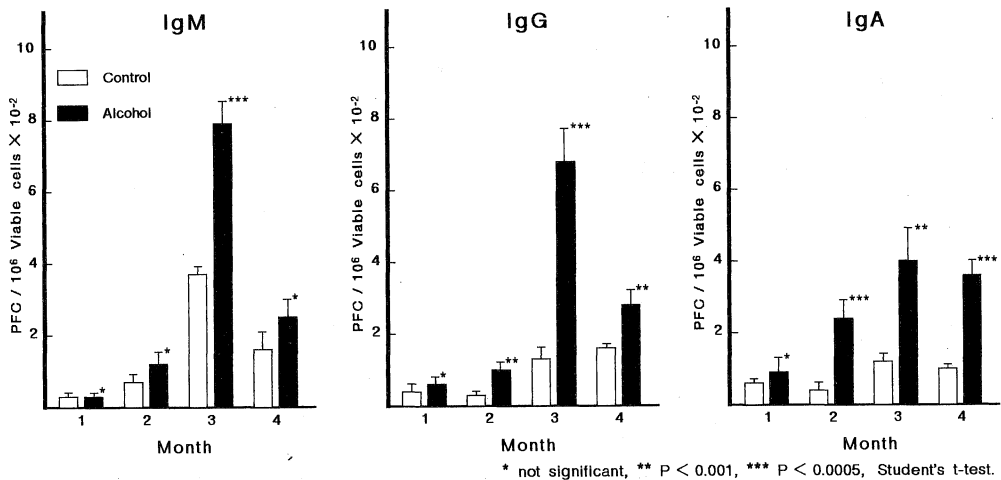


Fig. 3. Kinetics of the effect of long term oral alcohol administration on polyclonal antibody production in Peyer's patch cells of C57BL/6 mice.

アルコールによる抗原特異的抗体産生の変化を調べるため、抗原として  $3 \times 10^8$  個の SRBC を 1 週間間隔で 2 回経口投与し、脾臓内における抗 SRBC 抗体産生細胞数を測定した。

C57 BL/6 マウスと DBA/2 マウスの両者とも、2 日間アルコールを経口投与した後に SRBC を経口投与した群では抗 SRBC 抗体産生細胞数の増加はみられないが、長期間アルコールを経口投与し続けることにより、1 カ月後、4 カ月後には、IgM、IgG、IgA の各クラスの抗 SRBC 抗体産生細胞数の増加が認められるようになった (Fig. 5, 6)。

次に、抗原投与経路の影響を検討するため、先の実験系で経口投与した SRBC を腹腔内投与し、経口投与群と比較した。また、アルコールを投与せずに SRBC のみを経口投与または腹腔内投与した群とも比較検討した。

Fig. 7 に示したのは、C57 BL/6 における結果である。アルコールを投与せず、SRBC のみを投与した場合、IgM、IgG、IgA の各クラスとも、全経過を通じて、SRBC を経口投与した群よりも、腹腔内投与した群でより強い抗 SRBC 抗体産生の誘導がみられた。

アルコールを 2 日間投与した後に、SRBC を投与した場合でも、やはり経口投与群に比べ、腹腔内投与群でよ

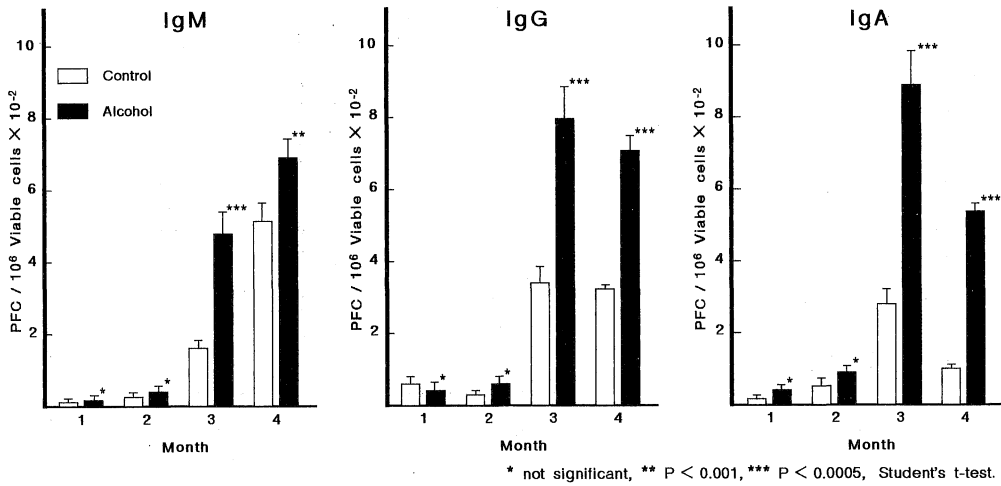


Fig. 4. Kinetics of the effect of long term oral alcohol administration on polyclonal antibody production in Peyer's patch cells of DBA/2 mice.

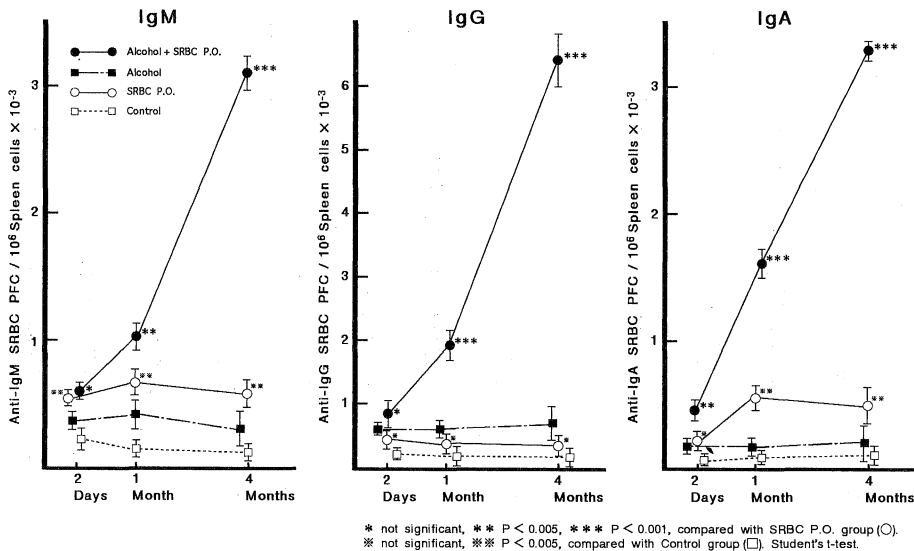


Fig. 5. Kinetics of the effect of long term oral alcohol administration on anti-SRBC antibody responses in C57BL/6 mice.

り強い抗 SRBC 抗体産生の誘導がみられた。

しかし、アルコールを1カ月間経口投与した後に SRBC を投与した場合、IgM、IgA の両クラスでは、SRBC の腹腔内投与群と経口投与群とで抗 SRBC 抗体産生誘導能に差がなくなってくる傾向がみられた。

さらに、アルコールを4カ月間投与した後に SRBC を投与した場合では、IgM、IgG、IgA の各クラスとも、SRBC を腹腔内投与した群よりも経口投与した群で、より強い抗 SRBC 抗体産生の誘導がみられるようになった。

た。

また、SRBC のみを投与したものと、経口的にアルコールを投与した後に SRBC を投与したものとを比較した場合、特に SRBC を経口投与した群では、アルコールの投与期間が長くなるにしたがい、しだいに抗 SRBC 抗体産生が増大する傾向を認めた。

なお、DBA/2 マウスにおいても、C57 BL/6 マウスとほぼ同様の傾向がみられた (Fig. 8)。

6. 長期アルコール経口投与により活性化された腹腔

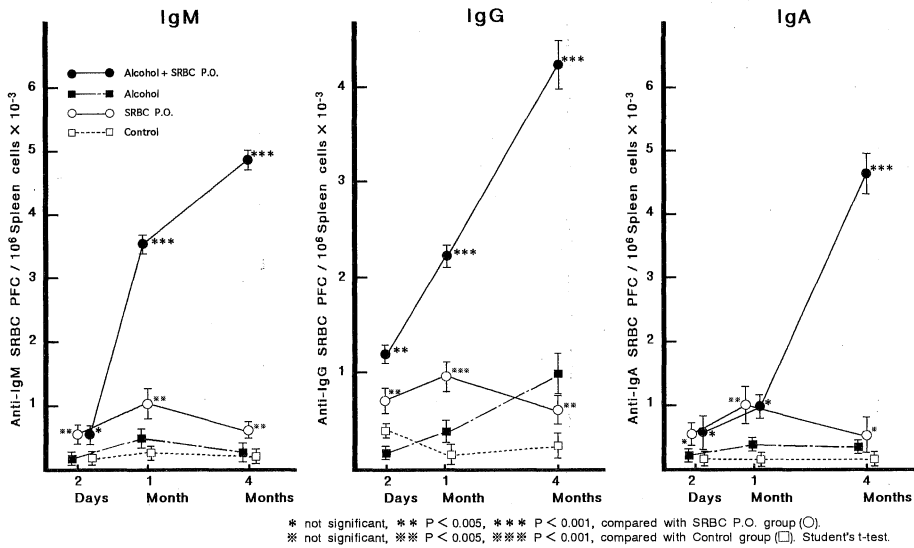


Fig. 6. Kinetics of the effect of long term oral alcohol administration on anti-SRBC antibody responses in DBA/2 mice.

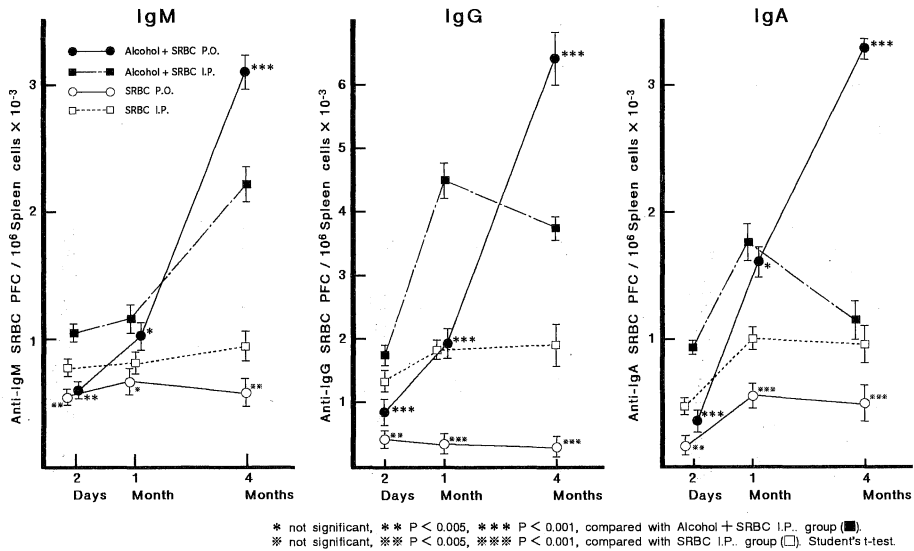


Fig. 7. Effect of long term oral alcohol administration on anti-SRBC antibody responses in C57BL/6 mice immunized orally or intraperitoneally with SRBC.

マクロファージの非特異的抗体産生におよぼす影響

C57 BL/6 と DBA/2 の両マウスに 2 カ月間アルコールを経口投与した後、腹腔マクロファージを採取し、同系の正常マウスに 1 匹につき 10<sup>6</sup>個を経静脈的に投与し、3 日後に非特異的抗体産生細胞数を測定した (Fig. 9, 10).

両マウスとも、全く処置を加えていない群 (Control

group) や同系の正常マウスから採取した腹腔マクロファージを投与した群 (Mc-group) に比べ、アルコールを投与したマウスから採取したマクロファージを投与した群 (M<sub>A</sub>-group) で IgM, IgG, IgA の各クラスにおける非特異的抗体産生の増大がみられた。なかでも IgA クラスの増大は著明であった。

7. 長期アルコール経口投与により活性化された T 細



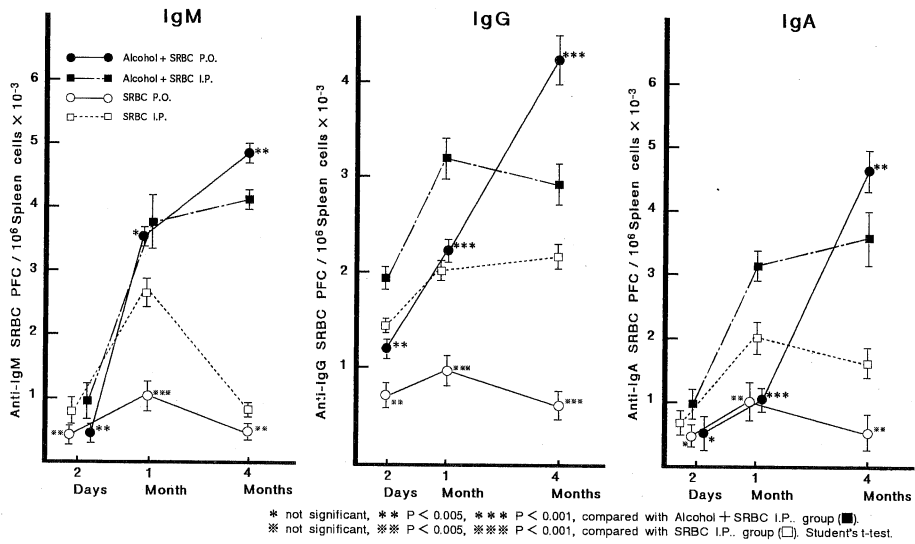


Fig. 8. Effect of long term oral alcohol administration on anti-SRBC antibody responses in DBA/2 mice immunized orally or intraperitoneally with SRBC.

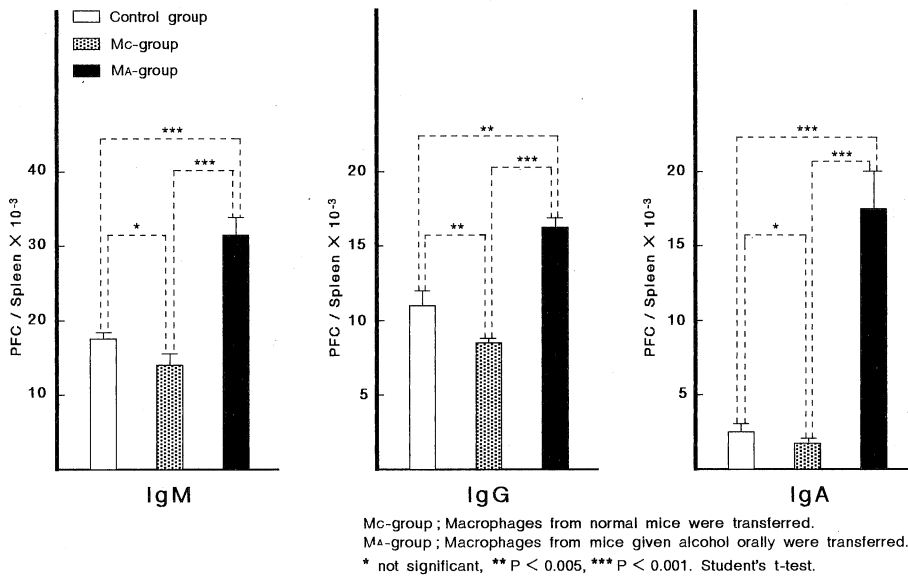


Fig. 9. Enhancing effect of the adoptive transfer of peritoneal macrophages from C57BL/6 mice given alcohol orally for two months on polyclonal antibody production in normal mice.

胞の非特異的抗体産生におよぼす影響

C57 BL/6 と DBA/2 の両マウスに 2 カ月間アルコールを経口投与した後、T 細胞を採取し、同系の正常マウスに 1 匹につき 10<sup>7</sup>個を経静脈的に投与し、3 日後に非特異的抗体産生細胞数を測定した(Fig. 11, 12).

両マウスとも、全く処置を加えていない群(Control group)や同系の正常マウスから採取した T 細胞を投与した群(T<sub>c</sub>-group)に比べ、アルコールを投与したマウスから採取した T 細胞を投与した群(T<sub>A</sub>-group)で IgM, IgG, IgA の各クラスにおける非特異的抗体産生の増大

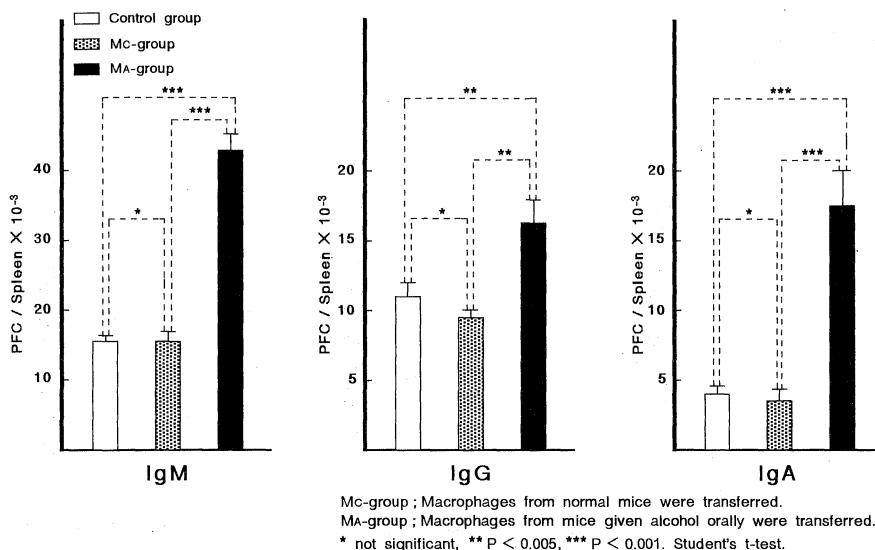


Fig. 10. Enhancing effect of the adoptive transfer of peritoneal macrophages from DBA/2 mice given alcohol orally for two months on polyclonal antibody production in normal mice.

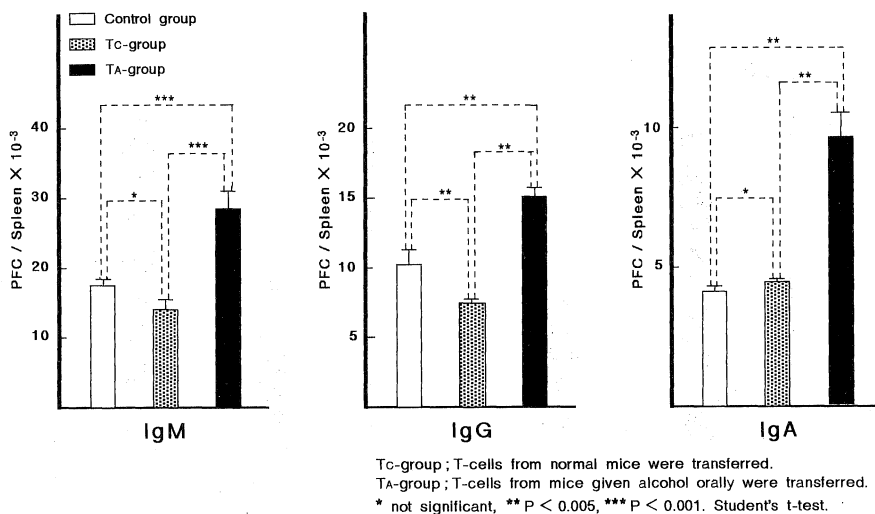


Fig. 11. Enhancing effect of the adoptive transfer of T-cells from C57BL/6 mice given alcohol orally for two months on polyclonal antibody production in normal mice.

がみられた。

8. 長期アルコール経口投与によるIL-1活性の変動  
 長期間アルコールを経口投与し、2カ月目と4カ月目に腹腔マクロファージ培養上清および血清中のIL-1活性を測定した。

C57 BL/6 マウス (Fig. 13) と DBA/2 マウス (Fig. 14) の両者において、コントロール群に比べ、アルコール投

与群で腹腔マクロファージの培養上清および血清中のIL-1活性の増大を認めた。

9. 長期アルコール経口投与によるIL-2活性の変動  
 長期間アルコールを経口投与し、2カ月目と4カ月目に有核脾細胞培養上清のIL-2活性を測定した結果をFig. 15に示した。C57 BL/6およびDBA/2の両マウスで、長期間のアルコール経口投与がIL-2活性を増大さ

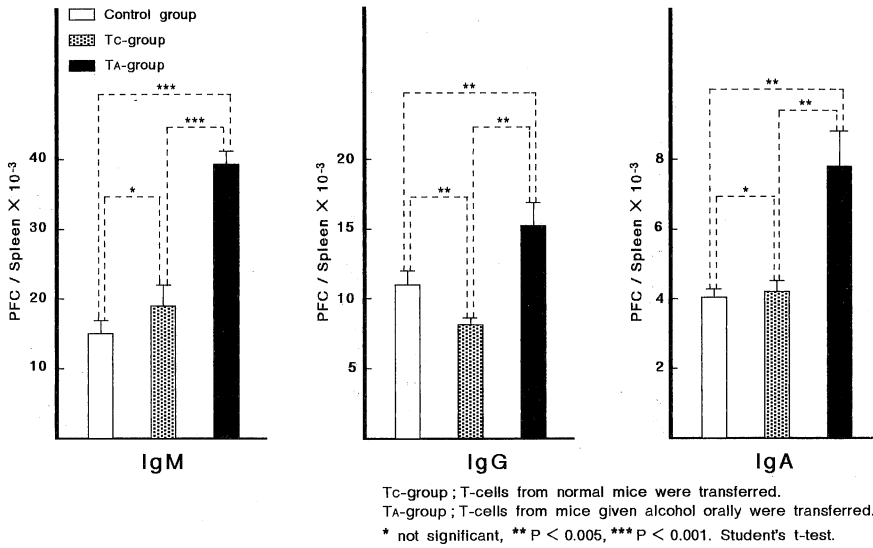


Fig. 12. Enhancing effect of the adoptive transfer of T-cells from DBA/2 mice given alcohol orally for two months on polyclonal antibody production in normal mice.

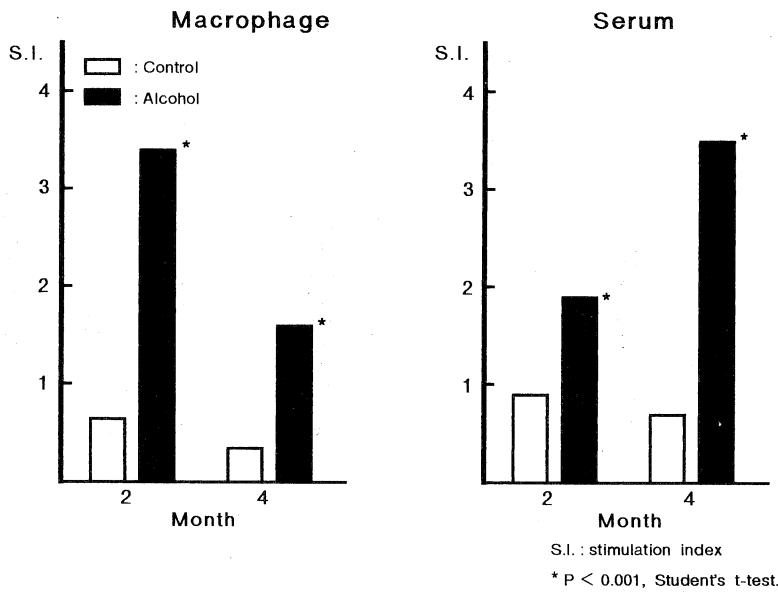


Fig. 13. Kinetics of the effect of long-term oral alcohol administration on IL-1 activity in C57BL/6 mice.

せた。

10. 長期アルコール経口投与により活性化された腹腔マクロファージの培養上清が非特異的抗体産生におよぼす影響

2カ月間アルコールを経口投与した後、腹腔マクロファージを採取し、その培養上清中のIL-1を含有する分

子量10,000~20,000の分画を同系の正常マウスに腹腔内投与し、3日後に非特異的抗体産生細胞数を測定した。

C57BL/6マウス(Fig. 16)とDBA/2マウス(Fig. 17)の両者とも、全く処置を加えていない群(Control group)や同系の正常マウスから採取したマクロファージの培養上清を投与した群(Fc-group)に比べ、アルコールを長期

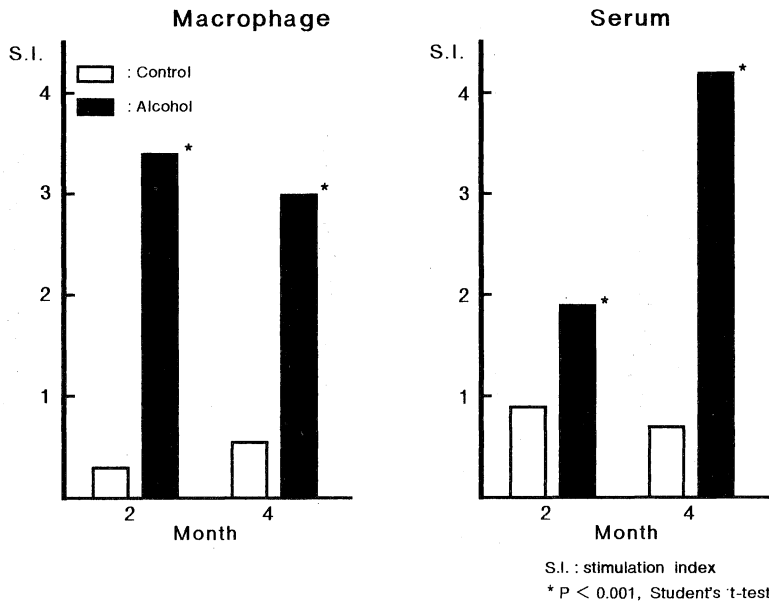


Fig. 14. Kinetics of the effect of long-term oral alcohol administration on IL-1 activity in DBA/2 mice.

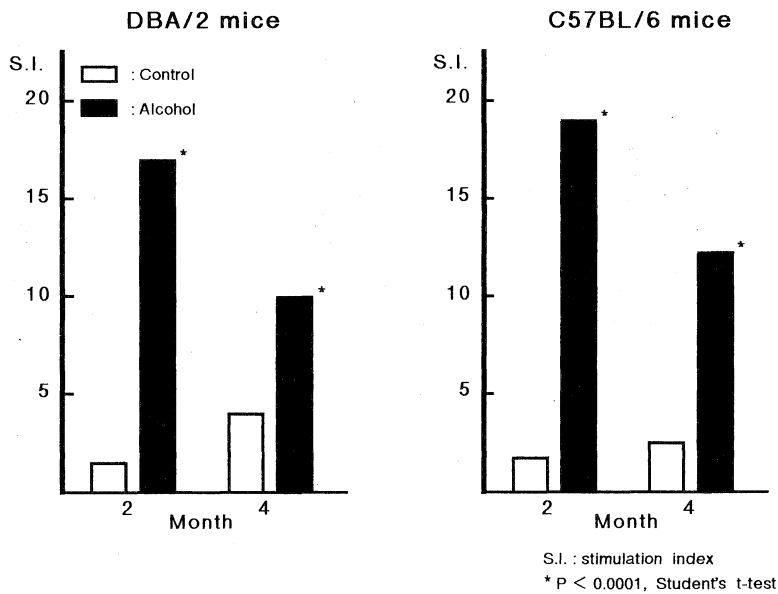


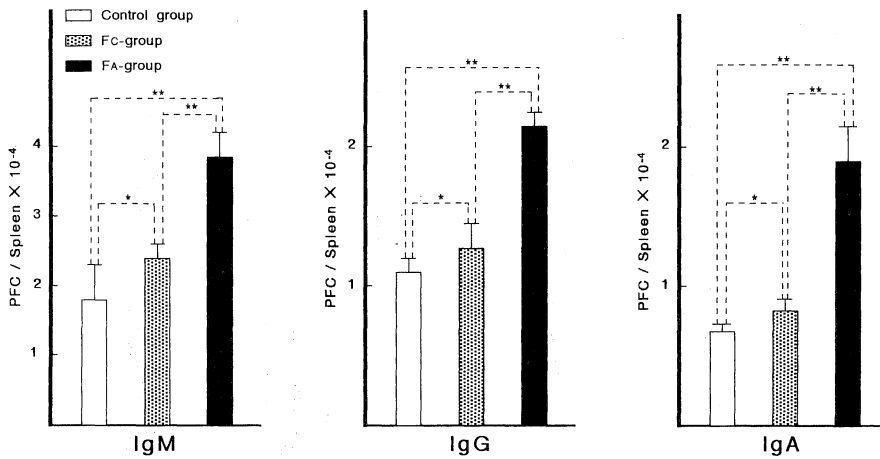
Fig. 15. Kinetics of the effect of long-term oral alcohol administration on IL-2 activity in C57BL/6 mice and DBA/2 mice.

間経口投与した後のマウスから採取したマクロファージの培養上清を投与した群(F<sub>A</sub>-group)で、IgM、IgG、IgAの各クラスにおいて非特異的抗体産生の増大がみられた。

11. 長期アルコール経口投与による肝の組織学的変

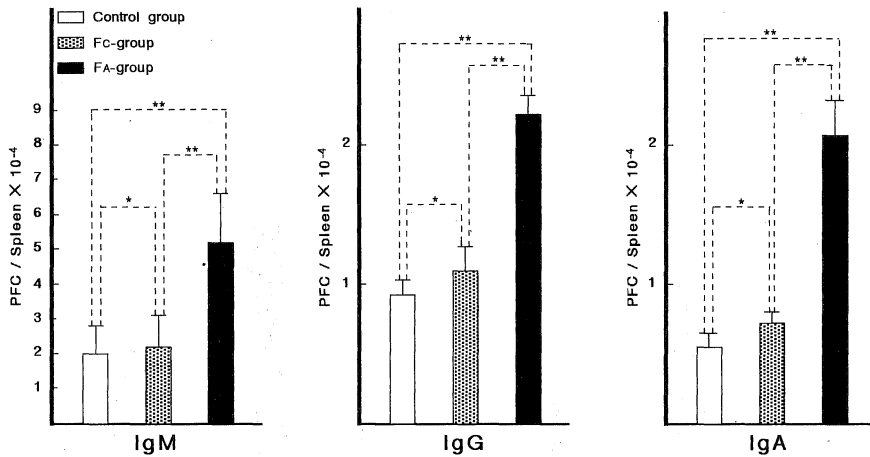
化。

全経過を通じ、1カ月ごとに各マウスの肝臓を摘出し、エオジン-ヘマトキシリン染色標本で組織学的変化を検討したが、1から4カ月間のアルコール経口投与では、



Fc-group; IL-1 fraction from normal mice was injected.  
 FA-group; IL-1 fraction from mice given alcohol orally was injected.  
 \* not significant, \*\* P < 0.001. Student's t-test.

Fig. 16. B-cell differentiating factor activity of IL-1 fraction acting with long term oral alcohol administration on normal spleen cells in C57BL/6 mice.



Fc-group; IL-1 fraction from normal mice was injected.  
 FA-group; IL-1 fraction from mice given alcohol orally was injected.  
 \* not significant, \*\* P < 0.001. Student's t-test.

Fig. 17. B-cell differentiating factor activity of IL-1 fraction acting with long term oral alcohol administration on normal spleen cells in DBA/2 mice.

C57 BL/6 と DBA/2 の両マウスには、アルコール性肝障害に特徴的な組織学的変化はみられなかった。

考 察

1968年に Feizi<sup>20)</sup>が、肝硬変症における体液性免疫系の変化の一つとして、非特異的な高免疫グロブリン血症を認めることを報告し、つづいて1969年に Wilsonら<sup>1)</sup>や Agostoniら<sup>2)</sup>が相次いでアルコール性肝硬変症では、他の成因による肝硬変症と異なり、IgM, IgG クラスに比

べて IgA クラスの免疫グロブリンの上昇が特に強いことを報告した。そしてその機序について、1979年に Stovoら<sup>9)</sup>はアルコールが腸管の抗原透過性亢進と肝や脾の網内系機能の低下を誘導し、この結果、外来抗原が生体内で増大して血清 IgA 濃度を上昇させる可能性を提唱した。

近年では、肝障害のない段階でも常習飲酒家以上のアルコール常用者は、健常者に比べて血清 IgA 濃度が増加し、IgA クラスの非特異的抗体産生能が亢進していると

いう報告<sup>10)</sup>や、アルコール性脂肪肝程度の軽微な肝障害の段階で、すでにIgAクラスの非特異的抗体産生能の誘導が始まり、網内系の機能の低下が生じる肝線維症や肝硬変症に進行することにより血清IgAの増加が著しくなるという報告<sup>5),11)</sup>もみられる。

一方、GALTにおいて抗原刺激を受けたIgA抗体産生前駆細胞が腸管リンパ節を経て大循環に移行、成熟し、腸管を含む局所粘膜に到達し、IgA抗体を産生するというhoming現象を介したIgA抗体の腸肝循環が消化管での局所免疫機構の中心的な役割を担っていることもよく知られている<sup>12),13)</sup>。そしてパイエル板はこのGALTで抗原刺激を直接的に受容し、しかもIgA抗体産生細胞がhomingする主な場所でもある。また、パイエル板由来のT細胞がIgAクラスに特異的なヘルパー機能を有するという報告<sup>21)</sup>もある。

以上のことから、アルコール性肝疾患における血清IgAの上昇の機序を考える上で、アルコールが免疫担当細胞や腸管粘膜の抗原透過性に与える影響、そしてそれと関連するパイエル板機能の変化を調べることは重要なことと考えられる。

そこで今回、筆者はマウスを用いた実験系で短期間のアルコール投与と長期間のアルコール投与がimmune circuitに与える影響を検討した。

短期間アルコールを投与した実験系では、アルコール高嗜好性のC57 BL/6マウスにおいて非特異的に抗体産生が増大され、その機序としてアルコールが*in vivo*でT細胞とマクロファージを活性化している可能性が示唆された。しかし、アルコールのこれらの作用はアルコール低嗜好性のDBA/2マウスでは認められなかった。C57 BL/6マウスとDBA/2マウスのアルコールに対する嗜好性の高低は、アセトアルデヒド脱水素酵素活性の高低によって生じているものと考えられている<sup>14)</sup>。筆者は石坂らとの共同研究で、アルコールの最終代謝産物である酢酸がC57 BL/6とDBA/2の両マウスに非特異的抗体産生を誘導することを明らかにしている<sup>22)</sup>。以上のことから、アルコールやその代謝産物である酢酸が*in vivo*で非特異的に抗体産生を活性化する可能性が示唆された。

長期間アルコールを投与した実験系では、脾細胞での非特異的抗体産生能の増大については、C57 BL/6マウスでは1カ月目で一度非特異的抗体産生誘導能の低下がみられたが、2カ月目以後ではより強い非特異的抗体産生能の増大がみられるようになった。DBA/2マウスでは短期間のアルコール投与ではみられなかった非特異的抗体産生能の増大が、1カ月間のアルコール投与でみられるようになり、そしてC57 BL/6マウスと同じように、

2カ月目で一度反応性の低下が生じた後に、3カ月目により一層強い非特異的抗体産生能の増大がみられるようになった。

同じ実験系での小腸パイエル板での変化をみると、C57 BL/6マウスでは2カ月目から、DBA/2マウスでは3カ月目からアルコールによる非特異的抗体産生能の増大がみられるようになった。これらのことから、長期間のアルコール投与では小腸パイエル板での非特異的抗体産生能の増大が、脾細胞で一度低下した反応性を回復させ、さらにはより一層の増強につながっていくものと考えられた。

次に、SRBCを抗原として用いて長期アルコール経口投与が抗原特異的抗体産生誘導能に及ぼす影響について検討してみた。まず、アルコールを投与しない状態では、同量の抗原を投与したにもかかわらず腹腔内投与の方が、経口投与よりも特異的抗体産生の誘導は強くみられている。このことは、アルコールを投与していない状態では腹腔内投与の方が経口投与よりも実際の抗原刺激量が大いことを示すものと考えられる。一方、アルコールを長期間経口投与し続けることにより、抗原の投与経路による差が次第にみられなくなり、ついには抗原を経口投与した方が、腹腔内投与した方よりもより強く反応するようになってくる。このことは、長期間のアルコール経口投与が、腸管粘膜の抗原透過性を増大させ、さらには抗体産生系をも活性化している可能性を示唆するものである。

また、アルコールを長期間投与し続けた後に採取したマクロファージやT細胞を正常の同系マウスに移入する実験から、長期間のアルコール経口投与が抗体産生能を増大させる方向に向かってマクロファージやT細胞を活性化していることが明らかになった。

そして、この長期間のアルコール経口投与がもたらす抗体産生系の増大にともなって、アジュバント作用を示すIL-1やT細胞活性化作用を有するIL-2の活性の増大もみられることも明らかになった。

さらに、教室の木下は筆者らとの共同研究<sup>23)</sup>で、マウスを用いた実験系では長期間のアルコール投与が肝に組織学的な障害がなく網内系の機能の低下も生じていない段階で、血清IgA濃度を増加させ、腸管粘膜での卵白アルブミンの透過性を亢進させていることを報告している。

以上のことから、アルコールにはマクロファージやT細胞を活性化させて抗体産生系を増幅させる作用と、腸管粘膜での抗原透過性を亢進させることで、小腸パイエル板を中心とするGALTを活性化させる作用があることが明らかになった。そして、これらの作用がIgA抗体

産生が増大する方向に immune circuit を増幅させ、血清 IgA 濃度の上昇を導く可能性が示唆された。

また、これらのアルコールによる抗体産生系の増幅につながる変化は、組織学的に肝障害がみられず、網内系機能の低下も生じていない段階でみられていることから、アルコールによる肝障害が肝硬変にまで進行した段階では、網内系機能の低下<sup>6)</sup>と IgA 抗体の肝内胆汁中への分泌の低下が加わって<sup>8),9)</sup>、より著しい高 IgA 血症をもたらしているものと考えられた。

## 結 語

アルコール性肝障害における血清 IgA 抗体上昇の機序を解明する目的で、アルコール高嗜好性 C57 BL/6 マウスとアルコール低嗜好性 DBA/2 マウスに、短期および長期的にエタノールを投与して動物実験モデルを作成し、アルコールが immune circuit に与える影響について検討し、以下の成績を得た。

1. 短期間のアルコール投与は、C57 BL/6 マウスでは非特異的に抗体産生を増大させたが、DBA/2 マウスではこの現象はみられなかった。
2. C57 BL/6 マウスにみられた短期間のアルコール投与による非特異的な抗体産生の増大には、T細胞とマクロファージの関与が必要であることが示唆された。
3. 長期間のアルコール投与は、C57 BL/6 と DBA/2 の両マウスにおいて、抗原特異的抗体産生と非特異的抗体産生の増大を誘導した。
4. 長期間のアルコール投与は、C57 BL/6 と DBA/2 の両マウスにおいて、小腸のパイエル板での非特異的抗体産生を増大した。
5. 長期間のアルコール投与により、消化管粘膜での抗原透過性が亢進する可能性が示唆された。
6. 長期間のアルコール投与により、T細胞とマクロファージが非特異的抗体産生能を増大させる方向に活性化されている可能性が示唆された。
7. 長期間のアルコール投与は、IL-1の活性とIL-2の活性を増大させる可能性が示唆された。
8. これらのアルコールによる抗体産生系の増幅につながる変化は、肝に組織学的障害のない状態でみられた。
9. 以上の成績から、アルコールがIgA抗体産生の増大に向けて immune circuit を増幅させる可能性が示唆された。

本稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師辻井 正教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研

究に際し、終始御教示頂きました寄生虫病学教室石坂重昭助教授(前第3内科学教室講師)ならびに御助言を頂きました第3内科学教室の諸兄に深謝致します。

## 文 献

- 1) Wilson, I. D., Onstard, G. and Williams R. C. : Gastroenterology 57 : 59-67, 1969.
- 2) Agostoni, A., Vergani, C. and Stabilini, R. : Clin. Chim. Acta 26 : 351-355, 1969.
- 3) Husby, G., Skrede, S., Blomhoff, J. P., Jacobson, C. T., Berg, K. and Gjone, E. : Scand. J. Gastroenterol. 12 : 297-304, 1977.
- 4) Delacroix, D. L., Elkon, K. B., Geubel, A. L., Hodgson, H. F., Dive, C. and Verman, J. F. : J. Clin. Invest. 71 : 358-367, 1983.
- 5) Van de Wiel, A., Van Hattum, J. and Schurman, H. J. : Gastroenterology 94 : 457-462, 1988.
- 6) Liu, Y. K. : J. Reticuloendothel. Soc. 25 : 605-613, 1979.
- 7) Bjarnason, I., Ward, K. and Peters, T. J. : Lancet 1 : 179-182, 1984.
- 8) Stovo, J. D. : Dig. Dis. Sci. 24 : 737-740, 1979.
- 9) Orleans, E., Peppard, J. and Raynold, J. : J. Exp. Med. 147 : 588-592, 1978.
- 10) Drew, P. A., Clifton, P. M., Labrooy, J. T. and Shearman, D. J. C. : Clin. Exp. Immunol. 57 : 479-486, 1984.
- 11) 田中美和 : 肝臓 28 : 1550-1557, 1987.
- 12) Graig, S. W. and Cebru, J. J. : J. Exp. Med. 134 : 188-200, 1971.
- 13) Lamm, M. E. : Adv. Immunol. 22 : 223-290, 1976.
- 14) Sheppard, J. R., Albersheim, P. and McClearn, G. : J. Biol. Chem. 245 : 2876-2882, 1970.
- 15) Anderson, J., Sjoeborg, O. and Moeller, G. : Eur. J. Immunol. 2 : 349-353, 1972.
- 16) Julius, M. H., Simpson, E. and Herzenbag, L. A. : Eur. J. Immunol. 3 : 645-649, 1973.
- 17) Ishizaka, S. : Immun. Letters 6 : 343-350, 1983.
- 18) Gronowicz, E., Coutinho, A. and Melcher, F. : Eur. J. Immunol. 6 : 588-590, 1976.
- 19) Jerne, N. K. and Nordin, A. A. : Science 140 : 405-406, 1965.
- 20) Feizi, T. : Gut 9 : 193-198, 1968.
- 21) Richman, L. K. : J. Immunol. 126 : 2079-2083,

- 1981.
- 22) **Ishizaka, S., Kikuchi, E., Higashino, T., Kinoshita, K. and Tujii, T.** : Int. J. Immunopharmacol. 12: 135-143, 1990.
- 23) **木下國浩, 東野 正, 長本一成, 狭間真澄, 石坂重昭, 辻井 正** : アルコール代謝と肝. Vol. 7, 東洋書店, 東京, p233-239, 1988.