

閉塞性黄疸のヒト natural killer 活性に及ぼす影響 についての実験的ならびに臨床的研究

新潟大学医学部第1外科学教室 (指導: 武藤輝一教授)

伊 賀 芳 朗

閉塞性黄疸の natural killer (NK) 活性に及ぼす影響とその要因について検討した。7例の閉塞性黄疸症例において4種の胆汁酸すなわち glycocholic acid (GCA), taurocholic acid (TCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), taurocheno-deoxycholic acid (TCDCA) は、著明な高値を示した。閉塞性黄疸症例のNK活性 ($12.2 \pm 2.8\%$) はコントロール ($43.9 \pm 6.7\%$) に比べ低値を示したが、減黄後には改善傾向を認めた。6例の黄疸血清で7日間, *in vitro* において前培養処理した健康人のリンパ球NK活性は顕著に抑制された ($4.9 \pm 5.6\%$)。抱合型ビリルビン, TCA, TCDCA およびGCAによる前培養処理では7日目まで影響を認めなかった。GCDCAでは5日目以降 (5日目: $5.6 \pm 2.6\%$, 7日目: $4.3 \pm 3.5\%$) に有意の低下を認めた ($p < 0.01$)。以上より閉塞性黄疸血清がヒトNK活性を抑制することが明らかとなり、GCDCAが重要な抑制因子の1つであることが示された。

Key words: inhibition of natural killer activity, obstructive jaundice, glycochenodeoxycholic acid

はじめに

閉塞性黄疸症例においては、外科手術および術後の合併症などの侵襲を契機として容易に敗血症や多臓器不全へと進展することがしばしば経験される。このような症例では、網内系機能をはじめとした種々の白血球機能の低下が観察され、いわゆる生体防御機構が著しく障害されていると思われる¹⁾²⁾。近年、多方面にわたる基礎的および臨床的研究により閉塞性黄疸の病態が明らかになるにつれて、このような点からも免疫担当細胞の機能維持の重要性が認識されるようになってきた³⁾。一方、閉塞性黄疸における細胞性免疫機能の低下の機序として、その原因を血清因子、とくにビリルビンおよび胆汁酸に帰する報告が散見される⁴⁾⁵⁾が、最近においても閉塞性黄疸に起因する細胞性免疫能の変動そのものに疑問を投げかけるもの⁶⁾や抑制因子に関してさらに検討の余地があると指摘した⁷⁾報告もみられ、必ずしも閉塞性黄疸症例での細胞性免疫能は十分に解明されてはいない。本稿においては、細胞性免疫能として natural killer 活性 (以下NK活性) に注目し、閉塞性黄疸の影響ならびにその要因について臨

床症例を対象として検討した。

対象と方法

1. 対象症例

閉塞性黄疸症例7例 (平均年齢 63.9 ± 7.7 歳) を対象としたが、7例のうち case 3 (慢性膵炎症例、ただし術前診断は膵頭部癌)、case 4 (総胆管結石症症例) の2症例を除き、他の5例は悪性疾患であった。黄疸の持続期間は case 4が4~6日と最も短期間で比較的明確であったが、他の6例においては少なくとも1週間以上の期間であったと推定されたが、不明瞭であった。経皮経肝胆道ドレナージ (以下PTCD) 施行後に採取した胆汁の培養により2例に細菌の存在が確認されたが、発熱、腹痛など臨床的に胆管炎を併発していると思われる症例はなかった。全例にPTCDが施行され、case 5の肝転移を併存した胆嚢癌症例を除いた6例で有効な減黄が得られた。case 1, 2, 3の3例はいずれも膵頭十二指腸切除術により根治手術が施行されたが、case 5, 6, 7は肝の広範転移や腹膜播種性転移が認められたため、切除不能 (case 5は非手術) であった。すべての症例において、PTCD後および手術後に重篤な合併症は認められなかった (Table 1)。

2. 対象症例の血清胆汁酸の測定

対象症例7例について、末梢血中の血清ビリルビン

<1991年12月10日受理> 別刷請求先: 伊賀 芳朗
〒951 新潟市旭町通1番町757 新潟大学医学部第1
外科

Table 1 Patients' profile

patient	age	sex	primary disease	serum total bilirubin (mg/dl)	serum direct bilirubin (mg/dl)
case 1.	68	male	pancreatic cancer	42.2	34.8
case 2.	67	male	pancreatic cancer	8.9	7.4
case 3.	48	male	chronic pancreatitis	11.0	9.6
case 4.	64	female	choledocholithiasis	25.7	21.8
case 5.	70	female	gall bladder cancer	19.2	14.9
case 6.	72	male	pancreatic cancer	23.4	20.9
case 7.	58	male	pancreatic cancer	12.8	9.6

Table 2 Serum bilirubin and bile acids levels in volunteers (NC), in the patients of obstructive jaundice (OJ) and post PTCD (analysed by Duncan's method)

	NC (n = 8)	OJ (n = 7)	OJ (post PTCD, n = 5)	NC vs OJ	OJ (post PTCD) vs OJ
age	31.9 ± 6.9	63.9 ± 7.7		p < 0.01	
T.B.(mg/dl)		20.5 ± 10.6	1.8 ± 1.5		p < 0.01
D.B.		17.0 ± 8.9	1.6 ± 1.1		p < 0.01
bile acid level (μ Mol/l)					
total	8.30 ± 7.14	289.84 ± 93.49	4.63 ± 2.70	p < 0.01	p < 0.01
free	1.92 ± 1.29	0.27 ± 0.16	1.26 ± 1.22	p < 0.01	N.S.
GLDCA	0.81 ± 0.80	4.25 ± 2.05	0.44 ± 0.32	N.S.	p < 0.01
TUDCA	N.D.	0.36 ± 0.24	N.D.		
UDCA	0.35 ± 0.34	N.D.	N.D.		
GCA	0.99 ± 1.38	77.87 ± 18.60	0.35 ± 0.26	p < 0.01	p < 0.01
TCA	0.17 ± 0.20	103.83 ± 46.35	0.13 ± 0.08	p < 0.01	p < 0.01
CA	0.40 ± 0.51	N.D.	N.D.		
GCDCA	4.01 ± 2.97	41.01 ± 14.32	1.87 ± 1.29	p < 0.01	p < 0.01
TCDC	0.42 ± 0.40	61.35 ± 46.83	0.25 ± 0.18	p < 0.05	p < 0.05
CDCA	0.91 ± 0.68	0.11 ± 0.04	0.56 ± 0.43	N.S.	N.S.
GDCA	0.58 ± 0.45	0.10 ± 0.08	0.23 ± 0.39	N.S.	N.S.
TDCA	0.13 ± 0.05	0.53 ± 0.11	0.05 ± 0.07	N.S.	p < 0.01
DCA	0.41 ± 0.28	N.D.	N.D.	N.S.	
GLCA	N.D.	0.15 ± 0.08	0.03 ± 0.03		
TLCA	N.D.	0.12 ± 0.05	N.D.		
LCA	N.D.	N.D.	N.D.		
G/T ratio	9.92 ± 2.26	1.02 ± 0.51	14.10 ± 19.86	p < 0.01	N.S.
C/CDC	0.62 ± 0.65	1.80 ± 0.63	1.83 ± 0.00	p < 0.01	N.S.
F/C	0.4344 ± 0.2530	0.0012 ± 0.0010	0.3692 ± 0.2958	p < 0.01	p < 0.05
positive bile culture		2/7			

NC : normal volunteers

OJ : patients of obstructive jaundice

Mean ± SD

N.S. : not significant

N.D. : not detected

濃度ならびに血清胆汁酸分画を測定した。採血は全例早朝空腹時とし、胆汁酸の測定には血清を遠心分離したのち-20℃にて凍結保存し、後日奥山ら⁸⁾の方法にしたがい、高速液体クロマトグラフィー法を用いて施行した。コントロールとして正常ボランティア(n=8, 平均年齢31.9±6.9歳)を用いた。また、7例のうち5例については減黄後の血清胆汁酸分画を測定した (Table 2)。

3. 閉塞性黄疸症例の末梢血 NK 活性の測定

閉塞性黄疸症例4例 (case 1, 2, 3, 4) について、末梢血 NK 活性を測定した。case 1と case 4は減黄後 (PTCD 後1週間) についても NK 活性を測定した。NK 活性の測定は標的細胞として K562 (本学医動物学教室より恵与) を用い、Hirschberg⁹⁾の方法に準じ、⁵¹Cr 放出法により施行した。すなわち早朝空腹時

に患者末梢血をヘパリン化採血し Ficoll-Paque (d=1.077, PHARMACIA FINE CHEMICALS) を用いて比重遠心法によりリンパ球分画を分離し、5%FBS (GIBCO) 加 RPMI 1640 (NISSUI) 培養液にて洗浄後 5×10^6 /mlの細胞数に調整した。同時に標的細胞 K562 と⁵¹Cr を 5×10^6 cells/0.5ml/100μCi, 37℃にて60分間接触標識させ、洗浄後 1×10^5 /mlの標的細胞浮遊液とした。ついで96穴U型マイクロタイトレーションプレート (CORNING) の各孔に測定群として100μlのリンパ球浮遊液 (effector cell) と、100μlの標的細胞浮遊液 (target cell) とを加えた (E:T=50:1, 25:1) 反応系を、5%CO₂, 37℃下に4時間培養した。最大遊離 (maximal release) は100μlの標的細胞浮遊液に2%triton Xを加え、自然遊離 (spontaneous release) は100μlの標的細胞浮遊液に100μlの培養液

を加え、コントロールとした。反応終了後、上澄100 μ lを採取しガンマカウンターによりおのおの放射活性(experimental release)を測定し、次式により% cytotoxicityにて表示した。同時に、正常ボランティアの末梢血リンパ球を同日同様に処理しNK活性を測定して、コントロールとした。なお、リンパ球の分離処理はすべて2時間以内に行い、測定はすべて triplicateにて施行した。式： $\% \text{cytotoxicity} = (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) \times 100 / (\text{maximal release} - \text{spontaneous release}) (\%)$ 。

4. 黄疸血清による前培養 (in vitro) 後の正常リンパ球 NK 活性の測定

閉塞性黄疸症例6例(case 1, 2, 3, 5, 6, 7)および正常ボランティアの血清を56 $^{\circ}$ C, 30分間非働化処理し、マイクロフィルター(GELMAN SCIENCES)にて濾過したのち-80 $^{\circ}$ Cにて凍結保存し、使用時解凍して用いた。正常ボランティアの末梢血リンパ球分画を比重遠心法によって分離し、各黄疸症例の全血清中において 2×10^6 cells/mlの細胞濃度で7日間培養した。同時に、正常リンパ球を他の正常ボランティアの全血清中で同様に7日間処理(n=2)したのちNK活性を測定して、コントロールとした。

5. 前培養後の正常ボランティア末梢血 NK 活性の測定

正常ボランティア末梢血リンパ球を通常の10% FBS加RPMI 1640培養液にて通常の条件5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C下に培養したのち、2, 5, 7日目にNK活性を測定した。この間、細胞維持のために培養液の交換などの処置を施行しなかった。

6. エタノール添加, 前培養 (in vitro) 後の正常リンパ球 NK 活性の測定

10%FBS加RPMI 1640培養液に0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%の濃度となるようにエタノール(99.5, WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD)を添加し、正常ボランティア末梢血リンパ球を 2×10^6 cells/mlの細胞濃度で5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C下に7日間培養した。培養後NK活性を測定した。

7. 抱合型ビリルビン添加, 前培養 (in vitro) 後の正常リンパ球 NK 活性の測定

精製抱合型ビリルビン(PORPHIRIN PRODUCTS, INC.)を100 μ g/ml, 200 μ g/mlの濃度となるように10%FBS加RPMI 1640培養液に溶解添加し、マイクロフィルターにて濾過したのち、正常ボランティア末梢血リンパ球を培養した。培養後、おのおの

2, 5, 7日目にNK活性を測定した。

8. 遊離型胆汁酸添加, 前培養 (in vitro) 後の正常リンパ球 NK 活性の測定

コール酸(LORDAN FINE CHEMICALS), ケノデオキシコール酸(LFC), デオキシコール酸(LFC)およびリトコール酸(WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD)の各精製胆汁酸をあらかじめエタノールで溶解し、これを10%FBS加RPMI 1640培養液に溶解し最終濃度が100, 50, 25, 12.5 μ Mol/L, エタノールの最終濃度は1%となるように調整した。正常ボランティア末梢血リンパ球をこれらの培養液中において2日間培養したのち、NK活性を測定した。

9. 抱合型胆汁酸添加, 前培養 (in vitro) 後の正常リンパ球 NK 活性の測定

タウロコール酸(LARODAN FINE CHEMICALS), タウロケノデオキシコール酸(SIGMA CHEMICAL CO.), グリコール酸(SIGMA CHEMICAL CO.)およびグリコケノデオキシコール酸(SIGMA CHEMICAL CO.)の各精製胆汁酸をエタノールで溶解し、これを10%FBS加RPMI 1640培養液に溶解し最終濃度が100 μ Mol/L, エタノールの最終濃度は1%となるように調整した。正常ボランティア末梢血リンパ球をこの培養液中において培養し、おのおの2, 5, 7日目にNK活性を測定した。培養後の培養液の浸透圧, pHを測定したが、コントロールとの間に差を認めなかった。

10. 統計学的解析

各平均値間の差の検定は多重比較試験(DuncanまたはDunnettの方法)を用いて行い、危険率5%未満をもって統計学的有意とした。

成 績

1. 閉塞性黄疸症例の血清胆汁酸分画

閉塞性黄疸症例においては、血清ビリルビン濃度と総胆汁酸濃度の増加とともに抱合型胆汁酸であるタウロコール酸(以下TCA), タウロケノデオキシコール酸(以下TCDC), グリコール酸(以下GCA)およびグリコケノデオキシコール酸(以下GCDCA)が著明な高値を示した。またコール酸/ケノデオキシコール酸比(以下C/CDC比)の増加とグリシン抱合型胆汁酸/タウリン抱合型胆汁酸比(以下G/T比)の減少が認められた。一方、5種類の遊離胆汁酸すなわちウルソデオキシコール酸(以下UDCA), コール酸(以下CA), ケノデオキシコール酸(以下CDCA), デオキシコール酸(以下DCA)およびリトコール酸(以下LCA)

Table 3 NK activity of peripheral blood lymphocytes in patients with or without jaundice or normal volunteers (treated within 2 hs, % cytotoxicity K562)

patient	jaundice	E : T = 25 : 1	E : T = 50 : 1
case 1.	+	9.4	8.6
case 2.	+	9.1	14.9
case 3.	+	4.9	10.3
case 4.	+	13.2	14.8
(n = 4, mean ± SD)		9.2 ± 3.0	12.2 ± 2.8
case 1. post PTCD	-	35.1	43.9
case 4. post PTCD	-	25.5	28.1
normal volunteer (n = 7, mean ± SD)	-	32.6 ± 8.1	43.9 ± 6.7

E:T : effector to target ratio

Table 4 NK activity of normal volunteers' peripheral blood lymphocytes in decompensated sera from patients with jaundice or other normal volunteers' on the 7-day in vitro culture (% cytotoxicity K562)

serum	E : T = 25 : 1	E : T = 50 : 1
case 1	5.3	11.4
case 2	0.1	0.0
case 3	-0.1	-1.0
case 5	5.6	13.4
case 6	1.6	4.0
case 7	0.4	1.6
(n = 6, mean ± SD)	2.2 ± 2.4	4.9 ± 5.6
normal volunteer	7.9	20.9
normal volunteer	12.9	25.3

はいずれも検出できない程度の低値となり、遊離型胆汁酸/抱合型胆汁酸比 (以下 F/C) は著明に低下した。また、減黄後における GCA, TCA, GCDCA, TCDCA はいずれも減黄前値に比べ有意に低下した (Table 2)。

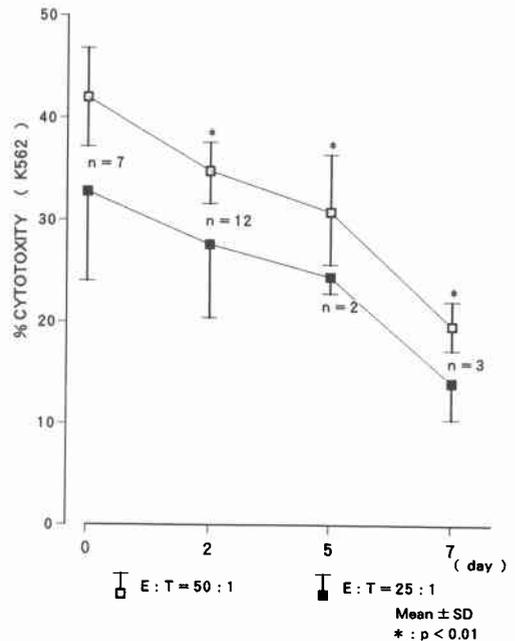
2. 閉塞性黄疸症例の末梢血 NK 活性

閉塞性黄疸症例 4 例の NK 活性はいずれも低値であったが、うち 2 例では減黄後の NK 活性も測定しえ、明らかな改善が認められた (Table 3)。

3. 黄疸血清の影響

コントロールの NK 活性は 7 日間培養後、E : T = 50 : 1 にて 20.9%、25.3% であったのに対して、case 2, 3, 6, 7 の血清で 7 日間培養した正常リンパ球 NK 活性は、おのおの 0.0%、-1.0%、4.0%、1.6% (4.9 ± 5.6%) とほぼ消失していた。case 1, 6 ではおのおの 11.4%、13.4% と活性を認めたもののコントロールに比べ低値を示した (Table 4)。

Fig. 1 Time kinetics of NK activity in the 7-day in vitro culture



4. 培養期間の影響

前培養せず、採血後 2 時間以内に処理した正常ボランティアの末梢血リンパ球分画の NK 活性は E : T = 50 : 1 にて 43.9 ± 6.7% であった。一方、5% FBS 加 RPMI 1640 培養液のみで 2 日間前培養した後の正常リンパ球の NK 活性は 36.3 ± 3.4%、5 日間では 31.4 ± 6.8%、7 日間では 18.4 ± 2.0% と前培養の期間とともに低下する傾向を認めた (Fig. 1)。

5. エタノールの NK 活性に及ぼす影響

0.5% エタノール添加培養液で培養後、正常リンパ球 NK 活性は E : T = 50 : 1 にて 22.5 ± 10.9%、1.0% では 22.8 ± 6.6%、2.0% では 23.4 ± 18.3%、3.0% では 0.3 ± 0.2%、5.0% では 0.4 ± 0.7% と 3.0% および 5.0% では正常リンパ球 NK 活性は消失した。すなわち本実験系に影響を及ぼさないエタノール添加の濃度は 2.0% 以下であった (Table 5)。

6. 抱合型ビリルビンの NK 活性に及ぼす影響

抱合型ビリルビン 100 μg/ml を培養液に添加して、2 日間培養した後の正常リンパ球 NK 活性は 32.7 ± 6.9%、5 日間では 21.5 ± 3.6%、7 日間では 23.5 ± 8.4% であった。200 μg/ml 添加では 2 日目 30.5 ± 2.5%、5 日目 21.0 ± 4.2%、7 日目 20.9 ± 7.9% と経時的に低下したが、コントロールとの間に差を認めな

Fig. 2 Influence of added conjugated bilirubin on peripheral lymphocyte NK activity in the 7-day in vitro culture

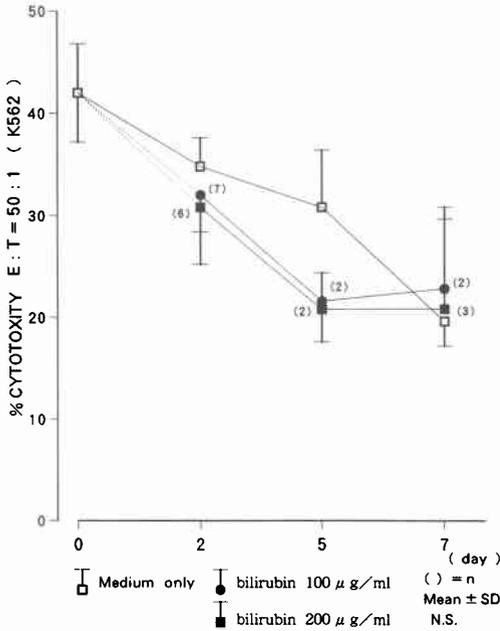


Fig. 4 Influence of added conjugated bile acids on peripheral lymphocytes NK activity in the 7-day in vitro culture

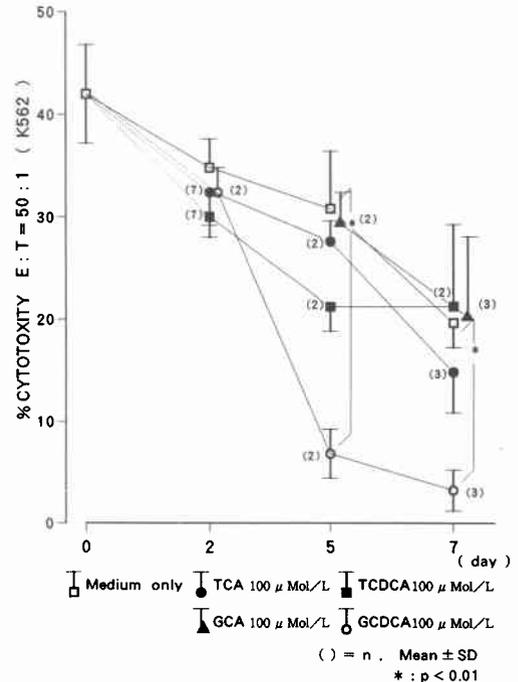


Fig. 3 Influence of added free bile acids on peripheral lymphocytes NK activity on the 2-day in vitro culture

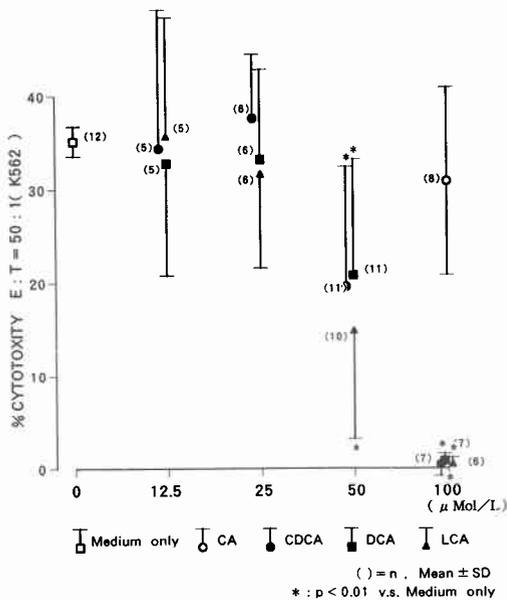


Table 5 Influence of added ethanol in concentration of 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0% on peripheral lymphocytes NK activity on the 7-day in vitro culture (%cytotoxicity, K562, E: T=50:1)

Ethanol conc.	0.5%	1.0%	2.0%	3.0%	5.0%
% Cytotoxicity	22.5 ± 10.9	22.8 ± 6.6	23.4 ± 18.3	0.3 ± 0.2*	0.4 ± 0.7*
n	3	3	3	3	3
Medium only	18.4 ± 2.0 (n=3)				

mean ± SD
*: p < 0.01

CDCA, DCA, LCA 100μMol/L の培養 2 日目において正常リンパ球 NK 活性は消失し, 50μMol/L でも低下を認めた。同胆汁酸25μMol/L までの濃度ではいずれも低下を認めず, CA は100μMol/L 濃度の前培養でも影響を受けなかった (Fig. 3).

8. 抱合型胆汁酸のNK活性に及ぼす影響

黄疸血清中に増加する4種類の抱合型胆汁酸について, in vitro 添加試験を施行した。TCA, TCDC, GCA 100μMol/L の前培養により正常リンパ球のNK活性の経時的低下を認めたが, 培養液のみの前培養との間に差を認めなかった。GCDCA 100μMol/L 濃度では, 2 日間の前培養後の正常リンパ球NK活性は33.1±

かった (Fig. 2).

7. 遊離型胆汁酸のNK活性に及ぼす影響

2.1%と差を認めなかったが、5日目では $5.6 \pm 2.6\%$ 、7日目では $4.3 \pm 3.5\%$ と明らかに低下した(Fig. 4)。

考 察

閉塞性黄疸症例では細胞性免疫機能が抑制されていることが指摘され、その原因として黄疸血清中に増加する胆汁酸の影響が注目されてきた¹⁾²⁾。また、閉塞性黄疸³⁾あるいは胆汁酸⁴⁾¹⁰⁾によってT細胞、B細胞、好中球およびマクロファージなどの機能低下がみられることがすでに明らかにされている。

一方、閉塞性黄疸のリンパ球NK活性に対する影響についてもいくつかの報告があるが⁶⁾⁷⁾、現在のところその評価は必ずしも一定していない。また胆汁酸による影響について論じた報告もみられない。NK活性は前感作なしに *in vitro* で腫瘍細胞を障害する機構で、生体においては免疫学的監視機構に参与し生体防御機構の重要な構成因子であると考えられる。そのためNK活性の抑制因子に関しても、担癌、低栄養¹¹⁾、手術侵襲¹²⁾、化学療法¹³⁾など多くの報告があり、胆道、膵臓の進行した悪性腫瘍に合併することが多い閉塞性黄疸症例の複雑な免疫環境を一元的に論ずることは困難である。しかしながら自験例の検討においては、閉塞性黄疸症例のNK活性はいずれも明らかな低値を示し、*in vitro* においても黄疸血清は正常ヒトのNK活性に対して強い抑制効果を及ぼした。また今回の7症例に含まれていた2例の良性疾患による黄疸症例においても、NK活性の低下が認められたことや、減黄後の2症例のNK活性に改善傾向を認めたことから、閉塞性黄疸そのものによってNK活性が抑制を受けているものと思われる。また閉塞性黄疸症例は、正常ボランティアに比べ有意に高齢であったが、一般にヒト末梢血のNK細胞¹⁴⁾あるいはNK活性¹⁵⁾は生涯にわたって維持されるかまたは増加するとされ、このNK活性の低下を高齢の影響のみによって説明することもできなかった。ビリルビンに関してはとくに小児科領域において非抱合型ビリルビンが細胞性免疫能抑制因子のひとつとして注目されている¹⁶⁾が、今回閉塞性黄疸で上昇する抱合型ビリルビンの添加試験では、NK活性は経時的低下を認めたものの、コントロールとの間に差を認めず、閉塞性黄疸におけるNK活性の抑制因子としては除外されるべきであると思われた。またT、B細胞、好中球、マクロファージおよびクッパー細胞ではすでに証明されている遊離型胆汁酸による抑制効果は、今回、NK活性についても確認された。しかしながら、従来の報告¹⁷⁾と同様、血清胆汁酸分析によれば閉塞性黄

疸症例の血清中遊離型胆汁酸は著明に減少していたことから、閉塞性黄疸症例の末梢血におけるNK活性抑制因子としてはやはり除外されるべきであろう。逆に、4種類の抱合型胆汁酸すなわちTCA、GCA、TCDCA、GCDCAは黄疸血清中に著明に増加しており、そのうちのGCDCAとの接触培養によって、NK活性に低下を認めた。以上より、GCDCAは閉塞性黄疸において肝細胞あるいは胆管上皮細胞に対して障害性を有する¹⁸⁾のみならず、NK活性を抑制する因子のひとつであることが判明した。

Gianniら⁴⁾の *in vitro* 実験モデルでは、黄疸生体の平均的な胆汁酸濃度に比べてはるかに高濃度で接触試験を施行しているが、それによればCAよりもCDCAが、タウリン抱合型よりもグリシン抱合型のほうが、よりリンパ球機能に対する抑制作用が強かったとしている。自験例の閉塞性黄疸7例の4種類の平均胆汁酸濃度がTCA($103.83 \mu\text{Mol/L}$)、GCA($77.87 \mu\text{Mol/L}$)、TCDCA($61.35 \mu\text{Mol/L}$)、GCDCA($41.01 \mu\text{Mol/L}$)の順に低くなっており、C/CDC比の増加およびG/T比の低下がみられた。このことは、リンパ球NK活性の上からもより障害作用の強い胆汁酸の蓄積を避ける胆汁酸の代謝反応¹⁹⁾を示しているのかもしれない。

さて、黄疸の持続により、肝障害の程度が増強することは多数の報告によって認められており²⁰⁾²¹⁾、その理由のひとつとしてBloemerら²²⁾は、黄疸が遷延することによりCDCAが優位になることを指摘している。細胞性免疫についてFox²³⁾は、正常ヒトリンパ球と黄疸血清とを *in vitro* で72時間接触させた場合PHAに対する反応性が低下したと報告したが、Fraserら⁶⁾は同様の24時間接触試験でNK活性を含めたリンパ球機能に抑制を認めなかったとしており、接触時間すなわち黄疸持続期間がリンパ球機能を評価するうえで、大きな要因であることがうかがわれる。今回の検討の結果では、GCDCAの *in vitro* における正常リンパ球NK活性に対する抑制効果は2日間の前培養では認められず、5日目および7日目においてはじめて認められることが確認された。自験例の正確な黄疸期間は不明確ではあったが、少なくとも1週間前後の期間は経過していたと推察され、その時点ですでにNK活性が低下していたこと、減黄によりすでに血中胆汁酸のほとんどが消失した症例のNK活性は改善されていたことから、臨床例においてもNK活性抑制因子としてGCDCAの関与が強く示唆された。

閉塞性黄疸症例の手術を安全に施行し、術前後にお

ける管理を容易とするため、術前減黄が有効である²³⁾とされているが、生体防御機構を維持するという意味においてその一翼を担うリンパ球NK活性の検討からも減黄術の必要性が裏付けられた。

本論文の要旨は第37回日本消化器外科学会総会において発表した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました武藤輝一教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始御指導いただきました藍沢喜久雄博士、渡部久実博士、大野正文博士ならびに御協力を賜りました教室の諸先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 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
- 2) Fox RA, Dudley FJ, Samuels M et al: Lymphocyte transformation in response to phytohemagglutinin in primary biliary cirrhosis: The search for a plasma inhibitory factor. *Gut* 14: 89-93, 1973
- 3) 谷川久一, 吉田 博: 閉塞性黄疸. 肝・胆・膵 17: 553-559, 1988
- 4) Gianni L, DiPadova F, Zuin M et al: Bile acid-induced inhibition of the lymphoproliferative response to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen: An in vitro study. *Gastroenterology* 78: 231-235, 1980
- 5) 高瀬幸次郎: 胆汁酸のリンパ球幼若化反応に及ぼす抑制効果とその機序について. *日消病会誌* 84: 1110-1120, 1987
- 6) Fraser IA, Krakowka S, Ringler S et al: Lymphocyte function in obstructive jaundice. *Am J Surg* 157: 405-409, 1989
- 7) Roughneen PT, Kulkarni S, Kumar SC et al: The influence of hepatocellular function on NK and T cell tumoricidal activity. *Surgery* 104: 888-893, 1988
- 8) 奥山澄彦: 高速液体クロマトグラフィ法と固定化酵素カラムの組合せによる血清遊離およびグリシン抱合・タウリン抱合各胆汁酸分画の分析. *臨病理* 24: 446-458, 1981
- 9) Hirschberg EB, Skare H, Thorsby E: Cell mediated lympholysis: CML. A microplate technique requiring few target cells and employing a new method of supernatant collection. *J Immunol Method* 16: 131-141, 1977
- 10) Keane RM, Gadacz TR, Munster AM: Impairment of human lymphocyte function by bile salts. *Surgery* 95: 439-443, 1984
- 11) 多幾山渉, 峠 哲哉, 柳川悦朗ほか: 胸部食道癌患者における細胞性免疫能の検討. *日胸外会誌* 30: 1428-1433, 1982
- 12) 吉原久司, 田中紀章, 大井田二郎: 術後NK活性抑制の機序. *消と免疫* 11: 188-191, 1983
- 13) Stratton JA, Braly PS, Rettenmaier MA: Depressed natural killer cell of immunotherapy and cytoreductive chemotherapy. *Clin Immunol Immunopathol* 28: 170-176, 1983
- 14) Abo T, Cooper MD, Balch CM: Postnatal expansion of the natural killer and killer cell population in humans identified by the monoclonal HNK-1 antibody. *J Exp Med* 155: 321-326, 1982
- 15) Lanza E, Djeu JY: Age-independent natural killer cell activity in murine peripheral blood. Edited by Herberman RB. *NK cells and other natural effector cells*. Academic Press, New York, 1982, p335-340
- 16) Rubaltelli FF, Granati B, Fortunato A: Inhibitory effects of bilirubin and photobilirubin on neonatal and adult T lymphocytes and granulocytes. *Biol Neonate* 42: 152-158, 1982
- 17) Makino I, Nakagawa S, Mashimo K: Conjugated and unconjugated serum bile acids levels in patients with hepatobiliary diseases. *Gastroenterology* 56: 1033-1039, 1969
- 18) Galle PR, Theilmann L, Stiehl RRA: Hepatotoxicity of bile salts in human primary hepatocyte cultures is reduced by ursodeoxycholate. Edited by Paumgartner G, Stiehl A, Barbara L et al. *Strategies for the treatment of hepatobiliary diseases*. Kluwer Academic Publishers, London, 1990, p57-60
- 19) 真部邦彦, 柿田 章, 高橋雅俊ほか: 閉塞性黄疸における血清胆汁酸分画の検討. *腹部救急診療の進歩* 9: 45-48, 1989
- 20) Cameron GR, Hasen M: Disturbance of structure and function in the liver as the result of biliary obstruction. *J Pathol Bacteriol* 66: 333-349, 1958
- 21) 津田 寛: 胆道閉塞解除後における胆汁酸補充投与の意義に関する実験的および臨床的研究. *日外会誌* 87: 759-773, 1986
- 22) Bloomern JR, Allen RM, Klatskin G: Serum bile acids in primary biliary cirrhosis. *Arch Int Med* 136: 57-61, 1976
- 23) 高田忠敬, 安田秀喜, 内山勝弘ほか: 治療閉塞性黄疸—術前減黄術としてのPTCD是非をめぐって—. *肝・胆・膵* 13: 925-929, 1986

An Experimental and Clinical Study of Influence of Obstructive Jaundice on Human Natural Killer Activity

Yoshiro Iga

First Department of Surgery, Niigata University School of Medicine

(Director: Prof. Terukazu Muto)

The present study was designed to evaluate the influence of obstructive jaundice on human natural killer (NK) cell activity and to elucidate the mechanism whereby this influence is exerted. In 7 clinical cases of jaundice the serum levels of 4 bile acids, i.e., glycocholic acid (GCA), taurocholic acid (TAC), glycochenodeoxycholic acid (GDCA) and taurochenodeoxycholic acid (TCDCA), were markedly elevated. NK activity in patients with obstructive jaundice ($12.2 \pm 2.8\%$) was lower than normal ($43.9 \pm 6.7\%$), but it returned to normal after biliary drainage. Seven-day incubation of lymphocytes from normal volunteers with sera from 6 patients with jaundice resulted invariably in strongly suppressed NK activity in vitro ($4.9 \pm 5.6\%$). In a similar experiment, NK activity was entirely unaffected by 7-day incubation with conjugated bilirubin, TCA, TCDCA and GCA, whereas it was significantly inhibited by over 5-day incubation with GCDCA (5-day; $5.6 \pm 2.6\%$, 7-day; $4.3 \pm 3.5\%$, $p < 0.01$). These data clearly indicate that sera from patients with obstructive jaundice suppress NK activity, suggesting that GCDCA is one of the important factors inhibiting NK activity.

Reprint requests: Yoshiro Iga First Department of Surgery, Niigata University School of Medicine
1-757 Asahimachi-dori, Niigata, 951 JAPAN
