

## 肝細胞膜抗原のモノクローナル抗体を用いた解析

— 特に慢性肝疾患患者血清中の抗体の対応抗原の検索 —

星 秀 樹 今 井 浩 三

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

### Analysis of Liver Cell Membrane Antigens by Use of Monoclonal Antibodies — Detection of Antigens Corresponding to Serum Antibodies in Patients with Chronic Hepatic Diseases —

Hideki HOSHI and Kohzoh IMAI

*Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College*

(Chief : Prof. A. Yachi)

**ABSTRACT** In order to analyze the liver cell membrane antigen, anti-liver specific membrane lipoprotein (LSP) antibodies and anti-liver membrane antibodies were measured. Several monoclonal antibodies (MoAbs) were prepared against liver cell membranes. They were utilized to see if inhibition occurs by the antibodies in the serum of patients with chronic liver diseases for MoAbs to bind liver cell membranes. By use of one monoclonal antibody, we characterized the corresponding antigens on the liver cell membranes. The results obtained in this study were as follows :

1) Anti-LSP antibodies and anti-liver membrane antibodies showed higher titers in the sera of patients with autoimmune hepatitis and chronic hepatitis than in the controls. Especially the sera of patients with non-A non-B type chronic hepatitis showed significantly ( $p < 0.01$ ) higher titers than patients with B type chronic hepatitis.

2) In order to analyze the antigenic determinants against antibodies in the sera of patients with autoimmune hepatitis and chronic hepatitis, we immunized human liver cancer cell line PLC/PRF/5 to BALB/c mouse and prepared three monoclonal antibodies (MoAbs H1, H2, and H3).

3) MoAb H1 was organ non-specific and species specific, while MoAb H2 and H3 were organ non-specific as well as species non-specific. The corresponding antigen of MoAb H2 was 75K dalton in LP2 fraction of the liver homogenate described by McFarlane *et al.* An indirect immunoperoxidase method revealed that the determinant was well stained in the normal liver tissue, but was lost in the cancerous liver tissue.

4) Two sera (HA and KO) from patients with autoimmune hepatitis inhibited the reactivity of MoAb H1 with Chang liver cell membrane in flow cytometry.

5) Immunoblotting by use of thin layer chromatography (TLC) showed that the antigen recognized by MoAb H1 was glycolipid.

6) The method is useful for analyzing liver membrane antigens and their antibodies in chronic liver diseases.

(Received April 8, 1988 and accepted May 23, 1988)

**Key words :** Monoclonal antibody, Anti-liver specific membrane lipoprotein antibody,  
Anti-liver membrane antibody

## 1 緒 言

1972年のMeyer zum Büschenfelde and Miescher<sup>1)</sup>の報告以来、慢性肝疾患における免疫学的な標的抗原として、肝細胞膜抗原の解析が行われてきた。このような肝細胞膜関連抗原には、liver specific membrane lipoprotein (LSP)<sup>2)</sup>, liver protein 2 (LP2)<sup>2)</sup>, liver membrane antigen (LMAg)<sup>3)</sup>などが報告されているが、いずれも crude な分画である。それゆえ、慢性肝疾患患者血清中の抗体についても多くの報告があるが、対応抗原の詳細な検索には到らなかった。この理由のひとつには抗原自体が不均一成分であることの他に、患者血清中の抗体がポリクローナルであり、かつ量が極めて少ないことが挙げられる。

そこで本研究においては、まず、肝細胞膜抗原に対するいくつかのモノクローナル抗体(MoAb)を作製し、対応抗原についての検索を行うとともに、このMoAbの認識するエピトープを競合的に認識する慢性肝疾患患者血清中の抗体を検出しようと試みた。さらに、このような方法で見い出された対応抗原に関しては、MoAbをプローブとして、その性状を明らかにしようとした。

## 2 研究方法

### 2.1 培養細胞および組織

本研究においては、以下のヒト培養細胞および組織を用いた。すなわち、肝細胞由来のChang肝細胞(名古屋大学各務伸一博士より供与)、肝癌細胞としてc-Hc-20(北海道大学佐々木文章博士より供与)およびPLC/PRF/5(岡山大学佐藤二郎教授より供与)ならびにTリンパ系細胞としてMolt4を用いた。また、組織として手術時採取した2種のヒト肝組織(非癌部および癌部)およびヒト腎組織、ラット肝および腎組織ならびに家兎肝組織を用いた。細胞融合用マウス骨髓腫細胞としては、X63-Ag8-653<sup>4)</sup>を用いた。

### 2.2 LSPおよびLP2分画の調整と解析

#### 2.2.1 LSPおよびLP2分画の作製

LSPおよびLP2分画は、McFarlane *et al.*<sup>2)</sup>の方法に従って得た。すなわち、2.1で得られたヒト肝組織をホモジネートとし、105,000 g, 1時間の超遠心を行い、上清を採取した。その上清をSephadex G 100(Pharmacia, Sweden)でゲル濾過し、第一峰を採取、それを濃縮し、さらにSephacrose 6B(Pharmacia, Sweden)でゲル濾過し、第一峰をLSP分画、第二峰をLP2分画として用いた。ラットおよび家兎肝組織に

ついても同様の操作を行い、LSPおよびLP2分画を得た。また、タンパクの定量は、Lowry法<sup>5)</sup>で行った。

#### 2.2.2 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel電気泳動(SDS-PAGE)

Imai *et al.*<sup>6)</sup>の報告に従って実施した。ゲルは7.5%と10%ゲルを用いた。抗原として2.2.1で作製したヒトLSP分画(Lot 1, Lot 2)、ラットLSP分画および家兎LSP分画を1レーンにつき100  $\mu$ g使用し泳動した。また、2-mercaptoethanol (2ME, BioRad, USA)処理は、1% (v/v)にて行った。泳動後は、Coomassie brilliant blue (BioRad, USA)を用いてゲルを染色した。

### 2.3 MoAbの作製

#### 2.3.1 免疫原、免疫方法および細胞融合

免疫原としてLSPを有する<sup>7)</sup>ヒト培養肝細胞癌株PLC/PRF/5を用いた。免疫方法は、 $5 \times 10^6$ 個の細胞を滅菌リン酸緩衝食塩液(PBS)に浮遊させたものをBALB/cマウス(雌5週齢、日本クレア)の腹腔内に1週間おきに4回免疫し、最終免疫より3日目に無菌的に脾摘を施行した。また、細胞融合は、Köhler and Milstein<sup>8)</sup>に準じた守谷・今井<sup>9)</sup>の方法によった。

#### 2.3.2 ハイブリドーマのスクリーニング

一次スクリーニングとして、免疫原となった培養肝癌細胞PLC/PRF/5の細胞膜との反応性を検討した。すなわち、細胞をPBSで3回洗浄後、96穴底板プレート(Costar, USA)に $1 \times 10^5$ 個/wellずつ加えた。次に一次抗体としてハイブリドーマ上清100  $\mu$ l/wellを4℃, 1時間反応させた。その後、プレートを800 rpm, 5分遠心し上清を捨て、以後、同様の方法でPBSで3回洗浄した。二次抗体としてPBSで1,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン(IgG, IgM, IgA)抗血清(DAKO, Denmark)100  $\mu$ l/wellを4℃, 30分間反応させた後、PBSで3回洗浄し、O-フェニレンジアミンにより発色させ、O. D. 492 nmにおいて測定した。二次スクリーニングとして、一次スクリーニングで選ばれたハイブリドーマ上清をヒト肝組織と反応させ、その染色性を検討した。すなわち、組織を10%ホルマリンまたは95%エチルアルコールにより固定し、パラフィン包埋後4~5  $\mu$ mに薄切したものを内因性ペルオキシダーゼをブロックする目的で、0.6%過酸化水素加メタノールに室温, 20分間反応させた後、PBSにより3回洗浄した。次に二次抗体の非特異的吸着を阻止するため、PBSにより40倍に希釈した正常家兎血清を室温, 20分間反応させた。さらに一次抗体としてハイブリドーマ上清を室温, 1時間反応

させPBSで3回洗浄した後、二次抗体としてPBSで40倍に希釈したペルオキシダーゼ標識家兎抗マウス免疫グロブリン(IgG, IgM, IgA)抗血清(DAKO, Denmark)を反応させた。次にPBSで3回洗浄後、3-3' diaminobenzidine(片山化学)により発色させた。核染色は、0.2%メチルグリーン(SIGMA, USA)により行った。

### 2・3・3 MoAbの免疫グロブリンクラスの決定および精製

免疫グロブリンクラスは、家兎抗マウスIgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgAおよびIgM抗血清(Miles, USA)を用いて、Ouchterlony法<sup>10)</sup>により決定した。また、MoAbの精製は、BALB/cマウス腹腔内にハイブリドーマを注射して得られる腹水より、IgGは33%硫酸塩析後、DE52(Whatman, USA)を用いて、またIgMは50%硫酸塩析後、Sephacryl S 300(Pharmacia, Sweden)を用いてゲル濾過し、それぞれ部分精製した。

## 2・4 MoAbの対応抗原ならびにエピトープの検索

### 2・4・1 組織分布の検索

組織は、2・1で得られたヒト肝組織(非癌部および癌部)および腎組織、ラット肝および腎組織ならびに家兎肝組織のそれぞれ10%ホルマリン固定および95%エタノール固定切片を用いた。染色方法は、2・3・2で述べた間接免疫ペルオキシダーゼ法に従った。

### 2・4・2 赤血球との反応性

ヒト赤血球A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, O(Ortho Diagnostic, USA)の2%浮遊液を調整し、MoAbとの反応性を生食法、アルブミン法および間接クームス法を用いて凝集反応により検討した。陽性対照として抗H(type 2) MoAb SI<sup>11)</sup>を用いた。

### 2・4・3 Flow cytometryによる検索

MoAbと各培養細胞との反応性を検討するために、以下の方法で行った。すなわち、2・1で得られたPLC/PRF/5細胞、Chang肝細胞、c-Hc-20細胞およびMolt 4をPBSで3回洗浄後、試験管にそれぞれ5×10<sup>5</sup>個ずつ分注した。次に一次抗体として、ハイブリドーマ上清100 μlを用い、それぞれに4℃、30分間反応させた後、PBSで3回洗浄した。さらに二次抗体として、PBSで40倍に希釈したFluorescein isothiocyanate(FITC)標識ヤギ抗マウスIgGまたはIgM抗血清(TAGO, USA)100 μlをそれぞれに4℃、30分間反応させ、PBSを用いて3回洗浄後、flow cytometry(EPICS-C, Coulter, USA)により測定し、結果を陽性率(%positive)あるいは平均蛍光強度(mean channel)として表現した。

### 2・4・4 サンドイッチ酵素抗体法

MoAbとLSPおよびLP2との反応性を検討するために、2・3・3で部分精製したMoAbをN-hydroxy-succinimido-biotin(SIGMA, USA)によりbiotin化し<sup>12)</sup>、同一抗体によるサンドイッチ酵素抗体法を行った。すなわち、一次MoAb 20 μg/mlを96穴平底プレート(Falcon, USA)に100 μlずつ入れ、4℃、一夜放置してスティック(Falcon FAST System, USA)に固相化した後、3%牛血清アルブミン(BSA)により37℃、2時間ブロッキングした。次に抗原として2・2・1で調整したLSPおよびLP2の10 μg, 20 μg, 40 μg, および80 μgを37℃、2時間反応させた後、PBSで3回洗浄した。さらに二次抗体としてbiotin化した同一MoAb 10 μg/mlを96穴平底プレートに100 μlずつ入れ、37℃、1時間反応させた後、PBSで3回洗浄した。次にペルオキシダーゼ標識 avidin D(VECTOR, USA)を37℃、30分間反応させ、PBSで3回洗浄後、O-フェニレンジアミンにより発色させO. D. 492 nmにおいて測定した。

### 2・4・5 SDS-PAGEおよびWestern blotting

MoAbの対応抗原の分子量を決定するためにImai *et al.*<sup>6)</sup>の報告に従って実施した。ゲルは5%, 7.5%および10%のゲルを用いた。抗原として、Chang肝細胞の1%Nonidet P40(NP40, 半井化学)抽出液と2・2・1で作製したLSPおよびLP2を1%2ME処理後、SDS-PAGEにより展開し、渡辺ら<sup>13)</sup>の方法に従ってゲルよりニトロセルロース膜(pore size 0.45 μm, Schleicher & Schuell, Germany)へ転写し、酵素抗体法を用いて抗原を検出した。

### 2・4・6 脂質抗原の検索

#### 2・4・6・1 脂質の抽出およびthin layer chromatography(TLC)

2・2・1で調整したLSPを材料として、Folchの方法<sup>14)</sup>により脂質画分を得た。この脂質画分を蒸発乾固した後、メタノール性0.5 N水酸化ナトリウム液を加え37℃、30分間処理し、これをさらにFolchの方法を用いて残った脂質を分離した。得られた脂質画分を二次元TLCのサンプルとした。展開溶媒は、Hirabayashi *et al.*<sup>15)</sup>の方法に従い、CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O(50:40:10)〔一次〕およびCHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/2.5 N NH<sub>3</sub>(50:40:10)〔二次〕を用いた。

#### 2・4・6・2 TLC blot法および酵素抗体法

Towbin *et al.*<sup>16)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、TLC上にイソプロピルアルコールを散布し、脂質部分を浮き上がらせ、その上に2・4・5で用いたニトロセル

ロース膜を置き、約2分間の機械的圧迫により転写した。転写後は、酵素抗体法を用いて抗原を検出し、その移動率(Rf値)を求めた。

## 2.5 患者血清中の抗LSP抗体の検出

### 2.5.1 対象

測定対象は正常対照群10例、急性肝炎5例、慢性肝炎30例(B型肝炎15例、非A非B型肝炎15例)、自己免疫性肝炎9例、肝硬変30例、肝細胞癌5例、他の自己免疫性疾患5例(RA2例、PSS2例、SLE1例)の計94例である。自己免疫性肝炎の診断は、Mackay *et al.*<sup>17)</sup>に従った。

### 2.5.2 酵素抗体法

2.2.1で調整したLSP 200 $\mu$ g/mlを2.4.4に示した方法で固相化し、ブロッキングした。次に56 $^{\circ}$ C、30分間にて非働化した血清を8倍希釈し、その100 $\mu$ lを37 $^{\circ}$ C、2時間反応させた後、PBSで3回洗浄した。さらにPBSで1,000倍希釈したペルオキシダーゼ標識家兎抗ヒト免疫グロブリン(IgG, IgM, IgA)抗血清(DAKO, Denmark)を37 $^{\circ}$ C、1時間反応させ、2.4.4と同様の操作で測定した。

## 2.6 患者血清中の抗肝細胞膜抗体の検出

### 2.6.1 対象

測定対象は正常対照群18例、急性肝炎5例、慢性肝炎48例(B型肝炎28例、非A非B型肝炎20例)、自己免疫性肝炎9例、肝硬変11例、肝細胞癌5例、他の自己免疫性疾患3例(PSS2例、SLE1例)の計99例である。

### 2.6.2 Flow cytometryによる検索

Chang肝細胞を2.4.3に示した方法で調整し、次に56 $^{\circ}$ C、30分間で非働化した血清を50倍希釈し、その100 $\mu$ lを4 $^{\circ}$ C、30分間反応させた後、PBSで3回洗浄した。さらにPBSで40倍に希釈したFITC標識ヤギ抗ヒト免疫グロブリン(IgG, IgM, IgA)抗血清(Cappel, USA)を4 $^{\circ}$ C、30分間反応させ、PBSで3回洗浄後、flow cytometryで測定した。

## 2.7 患者血清中の抗肝細胞膜抗体とMoAbとの対応抗原の異同の検討

### 2.7.1 対象

対象血清として2.6.2に示したflow cytometryによる検索において、陽性率(%positive)が高かった自己免疫性肝炎4例、慢性肝炎1例ならびに正常対照者1例を用いた。また、MoAbとして2.3のように作製され、スクリーニングされたH1, H2およびH3を用いた。

### 2.7.2 Flow cytometryによる抑制試験

Chang肝細胞を2.4.3に示した方法で調整し、次に2.7.1の非働化血清を50倍に希釈し、その100 $\mu$ lを4 $^{\circ}$ C、30分間反応させた後、PBSにより3回洗浄した。さらにMoAb 100 $\mu$ lを4 $^{\circ}$ C、30分間反応させ、PBSにより3回洗浄した。次にPBSで40倍に希釈したFITC標識ヤギ抗マウスIgGまたはIgM抗血清(TAGO, USA)100 $\mu$ lを4 $^{\circ}$ C、30分間反応させ、PBSで3回洗浄後、flow cytometryで測定した。

なお、抑制率(A)は以下の式により算出した。

$$A(\%) = \frac{B-C}{B} \times 100$$

B: Chang肝細胞にMoAbのみを反応させた%positive

C: Chang肝細胞に血清を反応させた後、さらにMoAbを反応させた%positive

## 3 研究成績

### 3.1 SDS-PAGEにおけるLSPの性状

2.2.1により得られたヒトLSP(Lot 1)をSDS-PAGEにより検討した。Fig. 1(a)に示すように、2ME非処理では、矢印で示すようにゲルトップに濃く染色されるbandを認めるが、他のbandはほとんど認められなかった。また、2ME処理では、約22 Kダルトンから約300 Kダルトンの間に濃く染色されるbands (major bands)が数本、薄く染色されるbands (minor bands)が10数本、計約20本のbandsが認められた。次にヒトLSPのLot間における差異および動物種間の差異を検討した。その結果、Fig. 1(b)に示すように、ヒトLSPのLot 1とLot 2の間に差はほとんど見られず、ヒトLSP、

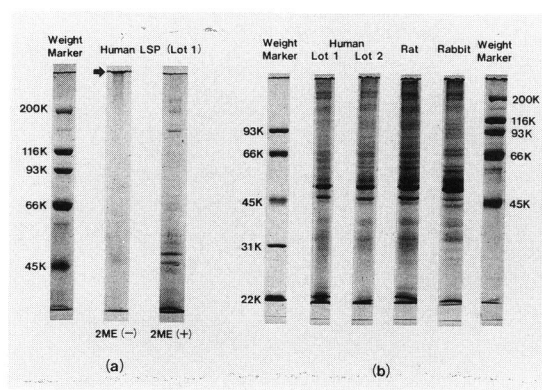


Fig. 1 SDS-PAGE pattern of LSP (Coomassie brilliant blue staining)

(a) Human LSP (7.5% gel)

(b) LSP obtained from human, rat and rabbit liver tissues under reducing condition (10% gel)

**Table 1** *Histological distribution of antigenic determinants detected by MoAbs in the liver and renal tissues assessed by the indirect immunoperoxidase method.*

MoAb	Liver tissue				Renal tissue		
	Human		Rat (n=2)	Rabbit (n=2)	Human (n=1)	Rat (n=1)	Rabbit (n=1)
	Non cancerous parts (n=4)	Cancerous parts (n=3)					
H1 (IgG1)	+	+	—	—	+	—	—
H2 (IgG1)	+	—	+	+	+	+	+
H3 (IgM)	+	+	+	+	+	+	+

+, positive staining; —, negative staining

ラット LSP および家兎 LSP の間には, minor bands に濃淡の差は認められたが, major bands にはほとんど差を認めなかった。

### 3・2 MoAb の反応性の検索

細胞融合より得られたハイブリドーマ 200 株中, 免疫原となった培養肝癌細胞 PLC/PRF/5 を抗原とした間接免疫酵素抗体法により一次スクリーニングを施行し, 45 株を選択した。次に二次スクリーニングとして, ヒト肝組織を用いた間接免疫ペルオキシダーゼ法により肝組織と強く反応する 3 株を選別し, これらのハイブリドーマより得られた MoAb H1 (IgG1), H2 (IgG1) および H3 (IgM) を以下の研究に供した。

#### 3・2・1 組織分布の検索

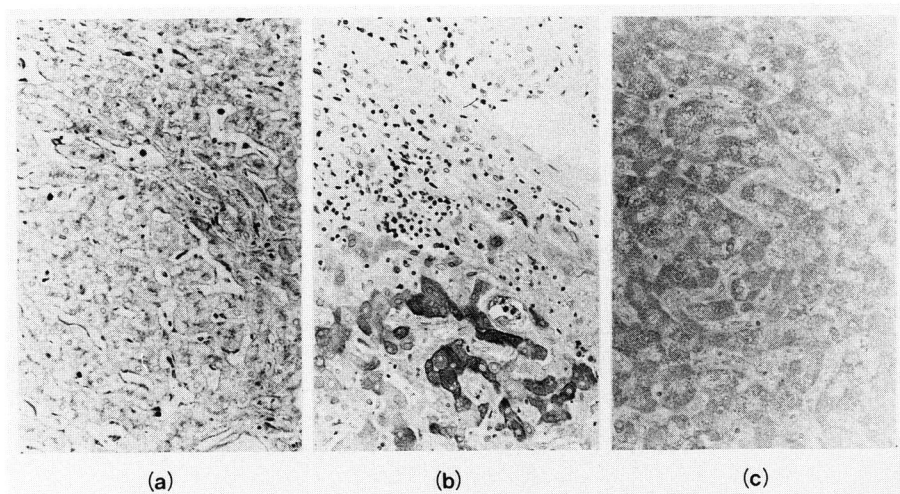
3 種の MoAb についてヒト, ラットおよび家兎の肝および腎組織との反応性を間接免疫ペルオキシダーゼ

法により検索し, その結果を Table 1 に示した。

MoAb H1 は, ヒト肝組織の非癌部および癌部の細胞膜を主体に細胞質にもびまん性に陽性 (Fig. 2(a)) を示し, 腎では尿管が陽性であったが, ラット肝, 腎組織および家兎肝ならびに腎組織には陰性であった。MoAb H2 は, ヒト肝組織の非癌部の主に細胞質にびまん性に陽性を示した (Fig. 2(b)) が, 癌部では検索し得た 3 例に陰性であった。また, ヒト尿管細管, ラット肝細胞・尿管細管および家兎肝細胞では主として細胞質に陽性であった。MoAb H3 は, ヒト肝組織の非癌部および癌部で主に細胞質に細顆粒状に陽性を示し (Fig. 2(c)), ヒト尿管細管, ラット肝細胞・尿管細管および家兎肝細胞でも陽性であった。

#### 3・2・2 赤血球との反応性

3 種の MoAb について赤血球との反応性を凝集反応



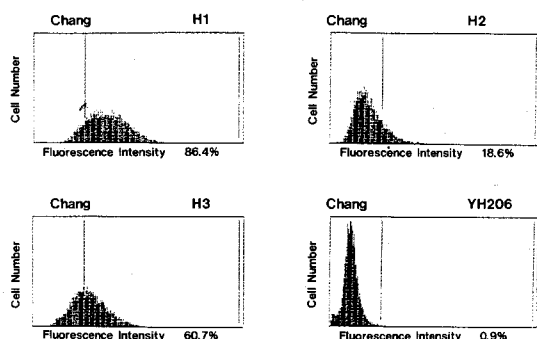
**Fig. 2** Staining patterns of MoAb H1(a), MoAb H2(b) and MoAb H3(c) in liver tissue containing cancerous and non-cancerous regions by the indirect immunoperoxidase method. (a, b, c :  $\times 150$ )

MoAbs H1 and H3 stained both cancerous and non-cancerous regions of the liver tissues, whereas MoAb H2 stained only non-cancerous region.

**Table 2** Reactivity of MoAbs with red blood cells assessed by hemagglutination test.

Red blood cells	MoAb			
	H1	H2	H3	S1*
A1	—	—	—	+
A2	—	—	—	+
B	—	—	—	+
O	—	—	—	+

\* anti-blood substance H (type 2) MoAb

**Fig. 3** Reactivity of MoAb H1, H2 and H3 with cultured Chang liver cells assessed by flow cytometry (EPICS)

MoAb YH206 (IgM) to high molecular weight adenocarcinoma-associated antigen was used for the negative control antibody.

により検討した。Table 2 に示すように、3種の抗体はいずれの赤血球とも凝集反応を示さず、A型、B型あるいはH型抗原との関連性は認められなかった。

### 3・2・3 各種培養細胞との反応性

3種のMoAbについて各種培養細胞との反応性をflow cytometryを用いて検討した。

Fig. 3 に示すようにMoAb H1, H2 および H3 は、Chang 肝細胞に対してnegative controlのMoAb YH206 (IgM) に比較し、%positiveおよびmean channelともに明らかな高値を示した。特にMoAb H1 および H3 は、高い%positiveおよびmean channelを示した。また、Table 3 に示すように、3種のMoAbはnegative controlのMolt 4 以外の3種の培養肝細胞すべてに高値を示した。特にMoAb H1 はChang 肝細胞に対して高い%positiveおよびmean channelを示した。

### 3・2・4 LSP および LP2 分画との反応性

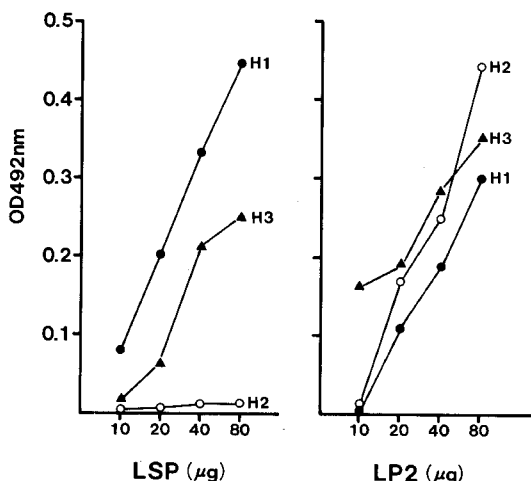
次にこれらの3種のMoAbについて、LSP および LP2 分画との反応性をサンドイッチ酵素抗体法により検討した。

Fig. 4 に示すように、MoAb H1 と MoAb H3 は、

**Table 3** Reactivity of monoclonal antibodies with cultured liver cells assessed by flow cytometry (EPICS-C).

MoAb	Target cells			
	PLC/PRF/5	Chang	cHc 20	Molt 4
H1	67.0%*	86.4%	38.1%	1.5%
H2	41.7	18.6	19.3	0.9
H3	56.7	60.7	52.7	1.2

\* % positive

**Fig. 4** Sandwich ELISA with monoclonal antibodies employing LSP and LP2 fractions as antigens

LSP および LP2 分画の両者に反応を示した。しかし、MoAb H2 は、LP2 分画のみと反応し、LSP 分画とは反応を示さなかった。

### 3・2・5 対応抗原の分子量の検索

以上の3種のMoAbについて対応抗原の分子量を検討するため、Chang 肝細胞のNP40抽出液、LSP および LP2 を抗原としてWestern blottingを行った。その結果、Fig. 5 に示すように、MoAb H1 は種々の条件(5%、7.5%ゲル、および10%ゲル、2ME処理あるいは非処理)においてもbandを認めなかった。一方、MoAb H2 はChang 肝細胞のNP40抽出液およびLP2に75 Kダルトンの位置にbandを認めたが、LSPには認めなかった。また、MoAb H3 はChang 肝細胞のNP40抽出液に149 Kダルトン、51 Kダルトン、40 Kダルトン、LSPに140 Kダルトン、LP2に135 Kダルトン、56 Kダルトンの他に数本のbandsを認めた。

### 3・3 血清中の抗LSP抗体の検出

各種疾患患者および正常対照血清中の抗LSP抗体を酵素抗体法にて測定した。正常対照群の吸光度の平

均+2SDをcut off値とすると、Table 4のように、陽性を示す例は正常対照群10例中には見られず、慢性肝炎では30例中8例(27%)、自己免疫性肝炎では9例中4例(44%)と陽性頻度が高かった。また、慢性肝炎中B型と非A非B型の陽性率には差を認めなかった。他の自己免疫性疾患では少数例の検討ではあるが、5例中2例(RAおよびSLE)に陽性を認めた。

### 3・4 血清中の抗肝細胞膜抗体の検出

各種疾患患者および正常対照血清中の抗肝細胞膜抗体をChang肝細胞を抗原として、flow cytometryにより測定した。正常対照群の%positiveの平均+3SDをcut off値とすると、Fig. 6に示すように、正常対照および急性肝炎では、それぞれ18例および5例全例が

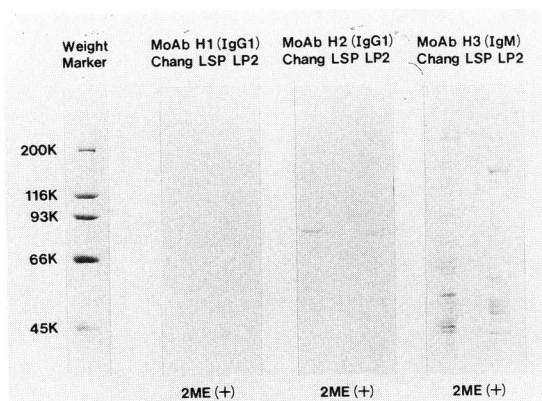


Fig. 5 Molecular weight determination of the antigens detected by monoclonal antibodies with SDS-PAGE and Western blotting (7.5% gel)

Table 4 Detection of antibodies to LSP in the serum of patients with liver diseases assessed by enzyme-linked immunosorbent assay.

Serum	Number tested	Number of positive cases	Positive rate*
Normal subject	10	0	0%
Acute hepatitis	5	0	0%
Chronic hepatitis	30	8	27%
NANB type	15	4	27%
B type	15	4	27%
Autoimmune hepatitis	9	4	44%
Liver cirrhosis	30	4	13%
Hepatocellular carcinoma	5	2	40%
Autoimmune diseases**	5	2	40%

\* Values more than mean level +2SD of normal subjects were considered to be positive.

\*\* One case of SLE, 2 cases of PSS and 2 cases of RA

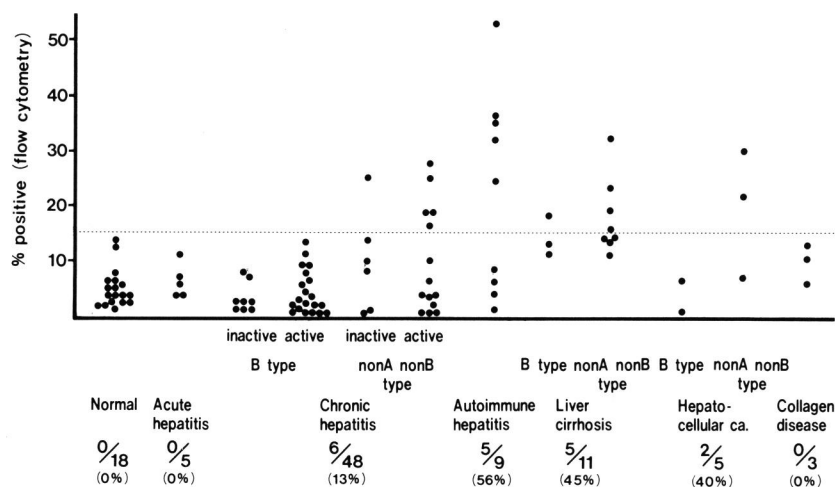


Fig. 6 Detection of antibodies to liver cell membrane antigens of Chang liver cells in the sera of patients with liver diseases assessed by flow cytometry (B type refers to HBs-Ag positive hepatitis. NonA nonB type refers to HBs-Ag negative hepatitis.)

陰性であるのに、慢性肝炎では48例中6例(13%)、自己免疫性肝炎では9例中5例(56%)、肝硬変では11例中5例(45%)に陽性を認めた。また、慢性肝炎ではB型肝炎28例は全例陰性で、これに比較して非A非B型肝炎では20例中6例と陽性率が高い傾向があり( $p < 0.05$ )、特に活動型において明らかに陽性率が高かった( $p < 0.01$ )。また、肝硬変においても、B型では3例中1例、非A非B型では8例中4例に陽性を示し、慢性肝炎と同様、非A非B型に高い傾向を示した。さらに自己免疫性肝炎では%positiveが最も高く、30%以上の高値を示す例を、陽性者5例中4例に認めた。

### 3.5 血清中の抗LSP抗体と抗肝細胞膜抗体の比較検討

3.3および3.4における測定対象中、抗LSP抗体およびChang肝細胞に対する抗肝細胞膜抗体を同時に測定し得た慢性肝炎15例および自己免疫性肝炎9例の計24例について、両抗体を比較検討した。その結果、Fig. 7に示すように、抗LSP抗体のみが陽性のものは24例中3例(12.5%)であり、抗肝細胞膜抗体のみが陽性のものは24例中6例(25.0%)に認めた。また、両者がともに陽性のものを24例中3例(12.5%)に認めたが、これらはすべて自己免疫性肝炎の例であった。

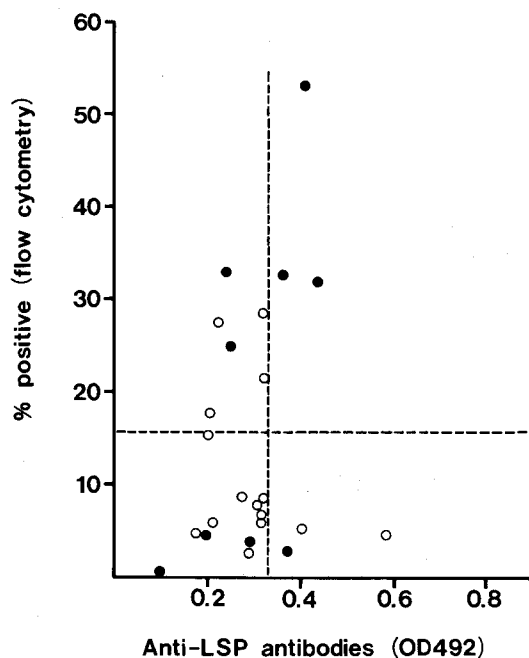


Fig. 7 Relationship between anti-liver membrane antigen antibodies and anti-LSP antibodies in the sera of patients with autoimmune hepatitis (AIH) and chronic hepatitis (CH). (●: AIH, ○: CH)

Table 5 Binding inhibition assay of monoclonal antibodies against Chang liver cells with sera from patients with autoimmune hepatitis (AIH) or chronic active hepatitis (CAH) by use of flow cytometry.

Initials	Age	Sex	Disease	% inhibition of binding of MoAb		
				H1	H2	H3
TA	28	F	Normal	—	—	—
HA	40	F	AIH	51.6	—	—
KI	18	F	AIH	—	—	27.5
KO	60	F	AIH	31.9	—	—
IT	28	F	AIH	—	—	—
SA	30	M	CAH	—	—	—

\* serum diluted at 1:50

### 3.6 MoAbと血清中の抗肝細胞膜抗体との対応抗原の異同の検討

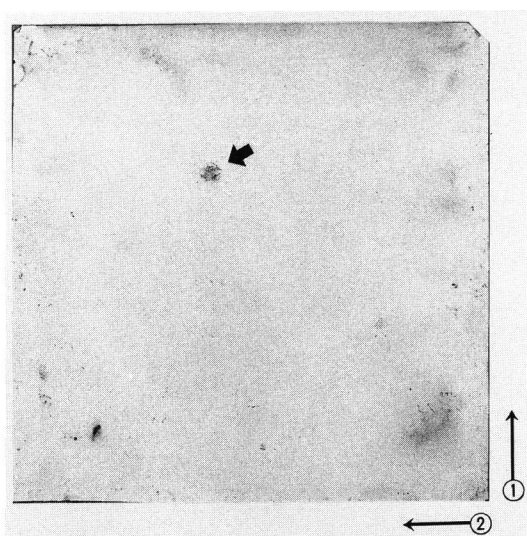
3種のMoAb H1, H2およびH3と、抗肝細胞膜抗体の高かった自己免疫性肝炎4例、慢性肝炎1例の計5例の血清中の抗肝細胞膜抗体との対応抗原の異同の検討をするため、flow cytometryを用いた抑制試験を行った。

その結果、Table 5に示すように、MoAb H1については、自己免疫性肝炎患者血清中、症例HA(抗核抗体+, LE細胞-)および症例KO(抗核抗体+, LE細胞+)でそれぞれ51.6%, 31.9%の抑制が認められた。また、MoAb H3については、自己免疫性肝炎患者血清中、症例KI(抗核抗体+, LE細胞-)で27.5%の抑制が認められた。以上の成績より、強い抑制の認められた症例HA血清について、さらに検索を進めた。

### 3.7 MoAb H1およびAIH血清中抗体(HA例)対応抗原の検索

3.2.5にてSDS-PAGEおよびWestern blottingを用いて、種々の条件でMoAb H1の対応抗原を検索したが、bandは認められなかった。そこで対応抗原が糖脂質であることを推測し、LSPを材料としてFolchの方法<sup>14)</sup>により脂質を抽出し、Hirabayashi *et al.*<sup>15)</sup>およびTowbin *et al.*<sup>16)</sup>の方法に準じてTLC-blot法を用いて検索を行った。その結果Fig. 8の矢印に示すように、Rf値が一次元0.8、二次元0.7である部位にspotを認めた。すなわちMoAb H1の対応抗原は、脂質の分離条件から考えて、糖脂質である可能性が強く示唆された。





**Fig. 8** Analysis of the antigen determinant detected by MoAb H1 with TLC-blotting  
Solvent system: ① first step,  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (50:40:10)  
② second step,  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/2.5\text{N}$   $\text{NH}_3$  (50:40:10)  
Rf: ① 0.8 ② 0.7

#### 4 考 察

これまで報告されてきた主な肝細胞抗原には、F-antigen<sup>18)</sup>, Neville's antigen<sup>19)</sup>, Tamm-Horsfall glycoprotein (THGP)<sup>20)</sup>, LSP (LPI)<sup>2)</sup>, LP2(LP II)<sup>2)</sup>, liver membrane antigen (LMAg)<sup>3)</sup>, および liver specific antigen (LSA)<sup>21)</sup> などがある。この中で、主に肝細胞膜に含まれる抗原は、Neville's antigen, THGP, LSP および LMAg であり、慢性肝疾患の発症とその遷延化に対する自己の免疫応答の抗原は、一般に臓器特異性があり、主に細胞膜に存在するという考え方から、特にこれまで LSP および LMAg について多くの研究が行われてきた<sup>22-26)</sup>。そこで今回、我々はまず LSP の性状を検討するところから研究を開始した。

McFarlane *et al.*<sup>2)</sup> に従って調整した LSP 分画は、Fig. 1 に示すように、2ME 非処理では 7.5% ゲルの最上部に位置し、かなりの高分子であることがわかる。また、2ME 処理では、major bands と minor bands の計約 20 本の bands よりなり、今回の結果は、これまでの報告とほぼ一致する<sup>2)</sup>。このように LSP は、高分子の crude な分画であり、この中のいかなる分子が慢性肝疾患の場合に標的抗原として意味があるのか、従来の LSP を免疫して得たポリクローナル抗体では、解析が困難といわざるを得ない。

一方、LSP は一般に膜成分を大量に含むといわれていたが、戸田ら<sup>28)</sup> は、肝ホモジェネートと比較して膜の marker enzyme の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性などが低いことから、膜成分の含量が少ないと報告している。また、前述したように、LSP 以外の膜成分が標的抗原となっている可能性も高い。以上のような実験結果および報告を参考にして、本研究においては、LSP のみを免疫原とするのではなく、LSP をも含めた広義の肝細胞膜抗原を免疫原として、抗肝細胞膜モノクローナル抗体を作製しようとした。すなわち、LSP を細胞表面に有するとされる<sup>7)</sup> 培養肝癌細胞株 PLC/PRF/5 を免疫原として MoAb を作製し、対応抗原についての検索を行った。さらに、これらの MoAb の認識するエピトープを競合的に認識する慢性肝疾患患者血清中の抗体を検出しようとした。

作製された 3 種の MoAb の組織分布 (Table 1) を検討すると、限られた範囲の検索ではあるが、MoAb H1 は腎尿細管とわずかに反応し、臓器非特異的であるが、種特異的であり、MoAb H2 および H3 は、臓器非特異的かつ種非特異的であった。さらにこれらの MoAb と、LSP および LP2 分画との反応性 (Fig. 4) を検討すると、LSP 分画には、MoAb H1 が認識する臓器非特異性、種特異性の分子と MoAb H3 が認識する臓器非特異性、種非特異性の分子が含まれていることがわかる。本研究では、従来の LSP の性状 (臓器特異性、種非特異性)<sup>2)</sup> を満足させる MoAb は得られなかったが、最近の検索では、臓器特異性に関して疑問視する報告もあり<sup>29-31)</sup>、意見の一致をみていない。

3 種の MoAb の対応抗原の分子量の検索 (Fig. 5) において、MoAb H1 は Western blotting では検出不可能であった。そこで TLC-blot 法を用いて検索した結果、対応抗原は糖脂質と判明した。この点については後述したい。また、MoAb H2 および H3 の対応抗原は、分子量のうえで F-antigen, Neville's antigen, THGP および LSA とは異なっている。

一方、患者血清を用いて、LSP および Chang 肝細胞膜に対するそれぞれの抗体の存在を検討した。抗 LSP 抗体の測定に関しては、現在まで多数の報告がある。Jensen *et al.*<sup>32)</sup> や Kakumu *et al.*<sup>33)</sup> は、radioimmunoassay で抗 LSP 抗体を測定しており、その陽性率は、HBs 抗原陽性肝炎と陰性肝炎の間に差がないこと<sup>32)</sup>、むしろ活動性肝炎では持続性肝炎より高い傾向を示し<sup>32,33)</sup>、一部の急性ウイルス性肝炎を追跡すると、抗体はその急性期より生じ始め経過とともに抗体が上昇すると報告している<sup>33)</sup>。我々の成績 (Table 4) をそれ

らと比較すると、急性肝炎と他の自己免疫性疾患を除いて各疾患の陽性率に Kakumu *et al.* の成績<sup>33)</sup>と類似の傾向を認めた。特に自己免疫性肝炎においては、44%と高い陽性率を認めた。

次に、抗肝細胞膜抗体について考察する。本実験で我々が用いた抗肝細胞膜抗体の測定系の特徴は、Chang 肝細胞に自然に表出されている肝細胞膜抗原に対する抗体を検出できること、この肝細胞が膜抗原として少なくとも LSP を有している<sup>34)</sup>こと、さらに LSP 以外の LMAg やその他の抗肝細胞膜抗原を検出できる可能性があることなどが挙げられる。それによると (Fig. 6)、抗肝細胞膜抗体は、健常者、急性肝炎および他の自己免疫性疾患には陽性例はなく、慢性肝疾患と肝癌に特有なものであった。特に自己免疫性肝炎では、陽性率 56%と高く、%positive も高い例が多いことから、抗肝細胞膜抗体は、自己免疫性肝炎における細胞障害の発症とその遷延化に何らかの役割を演じている可能性が示唆される。事実、稲垣ら<sup>35)</sup>によれば慢性肝炎患者においてではあるが、抗体に ADCC 活性が認められるとしており興味深い。本研究において注目すべきことは、慢性肝炎中の B 型と非 A 非 B 型を比較すると、後者に陽性率が高く、その中でも活動性肝炎に陽性率が高い点であった。

この点、Hopf *et al.*<sup>3)</sup>、Tage-Jensen *et al.*<sup>36)</sup>らは、単離したウサギ肝細胞を用いて間接蛍光抗体法により、抗肝細胞膜抗体を検出しているが、その出現頻度は HBs 抗原陰性慢性肝疾患に多いとしており、われわれの成績に類似している。しかし、その陽性例の多くはルポイド型ないし自己免疫性肝炎を想定した群であり、われわれの非 A 非 B 型肝炎は HBs 抗原・抗体陰性、抗核抗体陰性で、A 型肝炎も除外された症例で、その疾患内容には多少ずれがあるものと考えられる。それゆえ、本研究で非 A 非 B 型肝炎において、とくに活動型で抗肝細胞膜抗体が陽性を示す点は、この肝炎が慢性化し再燃しやすい病態と関連するのか、あるいはこの肝炎の中に自己免疫性肝炎に近いグループがあるのかなどと推測することもできよう。

また、抗 LSP 抗体と抗肝細胞膜抗体とを共に測定し得た 24 症例について検討を加えた (Fig. 7) が、両者ともに陽性を示すものは 3 例 (13%) のみで、これらはいずれも自己免疫性肝炎症例であった。また、いずれかの抗体が陽性を示す 9 症例中、抗 LSP 抗体のみ陽性の症例が 3 例に認められた。この点、慢性活動性肝炎血清中に、肝細胞膜抗体のみならず、肝細胞質中のサイトスケルトンのマイクロフィラメント、あるいは

中間フィラメントに対する抗体が存在することや、自己免疫性肝炎血清中に、マイクロフィラメントに対する抗体が高率に存在することなどが報告されており<sup>37,38)</sup>、今回抽出した LSP 分画中にも、サイトスケルトンが一部含まれているためかもしれない。これまで免疫応答の場として、主に肝細胞膜が中心に考えられてきたのに対し、肝細胞質 (あるいは核) にも注目する必要があることを考えさせる。

以上の患者血清中の抗体の検索から推測すると、血清中の抗体には、抗 LSP 抗体中に含まれる抗肝細胞膜抗体と抗肝細胞質 (あるいは抗核) 抗体と、抗 LSP 抗体以外の抗肝細胞膜 (LMAg を含む) 抗体の少なくとも 3 種の抗体が存在し得る。

このような患者血清抗体が対応する多種類の抗原の性状を明らかにすべく、前述した 3 種類の MoAb を用いて、これらの MoAb の認識するエピトープを競合的に認識する抗体を抑制試験を用いて検出した (Table 5)。その結果、MoAb H1 では 5 例中 2 例 (HA, KO) に MoAb H3 では 5 例中 1 例 (KI) に対応抗原の一部が一致する成績が得られた。MoAb H1 および H3 の対応抗原が前述のように異なることから考えると、肝炎患者血清中には、少なくとも 2 種類の抗原に対する抗体が存在しているものと推測される。それらの対応抗原は、前述した MoAb の性状の検索から明らかのように、一方は糖脂質であり、もう一方は、分子量約 149, 140, 135, 56, 51, および 40 K ダルトンのタンパクと考えられた。抑制試験において、部分的な抑制のみが得られた理由には、各患者血清中のポリクローナル抗体の力価が、マウスモノクローナル抗体に比較して著しく低いか、あるいは他の血清成分による何らかの干渉が推測される。事実、MoAb H1 の結合を 51.5%抑制した HA 症例 (自己免疫性肝炎) の血清を抗原と Western blotting あるいは TLC-blotting により反応させても有意な band は得られなかった (成績には示していない)。今後は、これらの血清を多量に採集して免疫グロブリン分画のみを抑制試験に使用する必要があらう。

次に、自己免疫性肝炎血清 (HA) により強い抑制を受けた MoAb H1 の対応抗原を検討すると、糖脂質であることが判明した。最近、Frazer *et al.*<sup>39)</sup>は、別の方法により、肝細胞膜上の標的抗原の一部は、糖脂質であると報告しており興味深い。

以上の成績より、肝疾患患者血清中の抗体に対する抗原は、多様であり、モノクローナル抗体を利用することにより、その一部はタンパク以外に糖脂質が存在することを明らかにし得た。これらの抗原が肝炎の免

疫病態にどのように関与するかは、現時点では不明であるが、このようなアプローチは標的抗原を明らかにする手段として有用で、その標的抗原と抗体との関係を、今後病態との関連で検討することにより、その意義が明らかにされるものと期待される。

## 5 結 論

1) LSP 分画を McFarlane *et al.* に従い調整し、それに対する抗体ならびに Chang 肝細胞膜と反応する抗体が、自己免疫性肝炎および慢性肝炎患者血清中に比較的高率に存在することを認めた。特に、非 A 非 B 型活動性慢性肝炎患者血清は、B 型慢性肝炎患者血清に比較して Chang 肝細胞膜に対する抗体の陽性率が高い傾向を示した。

2) 上記抗体の標的分子を明らかにする目的で、ヒト培養肝癌細胞 PLC/PRF/5 を免疫原として MoAb を作製し、LSP および LP2 分画の両者あるいは一方に反応する抗体 3 種を作製し得た。

3) MoAb H1 は臓器非特異性、種特異性を示し、MoAb H2 および H3 は、臓器非特異性、種非特異性を示した。また、MoAb H2 は LP2 分画中の 75 K ダルトンの分子と反応し、正常肝とは反応するが、肝癌ではその反応性が失われた。

4) 高い抗肝細胞膜抗体価を示した自己免疫性肝炎患者血清中に、MoAb H1 と Chang 肝細胞膜との反応性を阻止する例 (HA および KO) が認められた。

5) MoAb H1 を用いて Western blotting を行ったが、タンパク部分に抗原は検出されず、TLC-blot 法により対応抗原は糖脂質と推定された。

以上により、肝疾患患者血清中に存在する抗体の標的抗原は多様であり、その一部の抗原はタンパク以外に糖脂質が関与していることを明らかにした。従って、モノクローナル抗体を利用したこのようなアプローチは、これまで不明であった肝細胞関連抗原の性状を解析するのに意義があるものと考えられた。

## 謝 辞

御指導、御校閲頂いた本学内科学第一講座 谷内 昭教授、御協力頂いた名古屋大学第三内科 各務伸一講師、岡山大学癌研病理 佐藤二郎教授、北海道大学第一外科 内野純一教授、宇根良衛博士、札幌旭山病院 阿部正雄博士、札幌医科大学第一生化学 秋野豊明教授、札幌医科大学第二病理 森 道夫教授、小山田正人博士、道立北野病院内科 坂本真一博士、札幌慈恵会病院 川原田 信博士、本学内科学第一講座 菅

充生博士ならびに御世話になった多くの先生方に謝意を表します。

また、本研究は、文部省科学研究費補助金一般研究 B (谷内) および厚生省対癌 10 年戦略事業 (谷内) の補助によった。

## 文 献

1. Meyer zum Büschenfelde, K. H. and Miescher, P. A.: Liver specific antigens. Purification and characterization. *Clin. Exp. Immunol.* **10**, 89-102 (1972).
2. McFarlane, I. G., Wojcicka, B. M., Zucker, G. M., Eddleston, A. L. W. F. and Williams, R.: Purification and characterization of human liver-specific membrane lipoprotein (LSP). *Clin. Exp. Immunol.* **27**, 381-390 (1977).
3. Hopf, U., Meyer zum Büschenfelde, K. H. and Arnold, W.: Detection of a liver-membrane autoantibody in HBsAg-negative chronic active hepatitis. *N. Eng. J. Med.* **294**, 578-582 (1976).
4. Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B. and Rajewsky, K.: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* **123**, 1548-1550 (1979).
5. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
6. Imai, K., Galloway, D. R. and Ferrone, S.: Serological and immunochemical analysis of the specificity of the xenoantiserum 8986 elicited with hybrids between human melanoma and murine fibroblasts. *Cancer Res.* **41**, 1028-1033 (1981).
7. Lambert, K. J., Major, G. N., Welsh, C. J. R., Ryall, J. E., McFarlane, I. G. and Williams, R.: Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies to human liver-specific lipoprotein (LSP). *Liver* **4**, 122-127 (1984).
8. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
9. 守谷保夫, 今井浩三: モノクローナル抗体を用いた CEA の免疫学的研究. *札幌医誌* **53**, 455-467 (1984).
10. Ouchterlony, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In: Kallós, P., *Progress in Allergy*, VI/V, 1-78, Karger, Basel and New York (1958).
11. 笹浪哲雄: ヒト肝細胞癌に対するモノクローナル抗

- 体の作製とその応用—とくに H 型糖蛋白質と反応する抗体による研究. *札幌医誌* **53**, 223-241 (1984).
12. Guesdon, J., Ternynck, T. and Avrameas, S.: The use of avidinbiotin interaction in immuno-enzymatic technics. *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 1131-1139 (1979).
  13. 渡辺武, 大原純一, 江田康幸, 松崎幸子: ブロッティング法によるモノクローナル抗体の検出. 右田俊介編集: *免疫実験操作法* **11**, 3485-3489 (1982).
  14. Folch, J.: Chemistry of the lipids. *Annu. Rev. Biochem.* **17**, 147-168 (1948).
  15. Hirabayashi, Y., Koketsu, K., Higashi, H., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Sugimoto, M. and Ogawa, T.: Sensitive enzyme-immunostaining and densitometric determination of ganglio-series gangliosides on thin-layer plate: pmol detection of gangliosides in cerebrospinal fluid. *Biochim. Biophys. Acta* **876**, 178-182 (1986).
  16. Towbin, H., Schoenenberger, C., Ball, R., Braun, D.G. and Rosenfelder, G.: Glycosphingolipid-Blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J. Immunol. Methods* **72**, 471-479 (1984).
  17. Mackay, I. R., Weiden, S. and Hasker, J.: Autoimmune hepatitis. *Ann. NY. Acad. Sci.* **124**, 767-780 (1965).
  18. Fravi, G. and Lindenmann, J.: Induction by allogeneic extracts of liver-specific precipitating autoantibodies in the mouse. *Nature* **218**, 141-143 (1968).
  19. Neville, D. M.: Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 540-552 (1968).
  20. Tamm, I. and Horsfall, F. L.: Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **74**, 108-114 (1950).
  21. Espinosa, E.: Circulating tissue antigens. II. Studies on an organ-specific antigen of human liver. *Lab. Invest.* **29**, 556-561 (1973).
  22. Meyer zum Büschenfelde, K. H., Manns, M., Hütteroth, T. H., Hopf, U. and Arnold, W.: LM-Ag and LSP-two different target antigens involved in the immunopathogenesis of chronic active hepatitis?. *Clin. Exp. Immunol.* **37**, 205-212 (1979).
  23. Behrens, U. J., Vernace, S. and Paronetto, F.: Studies on "liver-specific" antigens. II. Detection of serum antibodies to liver and kidney cell membrane antigens in patients with chronic liver disease. *Gastroenterology* **77**, 1053-1061 (1979).
  24. Manns, M., Meyer zum Büschenfelde, K. H. and Hess, G.: Autoantibodies against liver-specific membrane lipoprotein in acute and chronic liver diseases: Studies on organ-, species-, and diseases-specificity. *Gut* **21**, 955-961 (1980).
  25. 辻 孝夫: 非 B 型慢性活動性肝炎における抗肝細胞特異抗体 (anti-LM) の特異性と細胞障害性. 長嶋秀夫, 浪久利彦, 山本祐夫編集: *肝と免疫*, 59-67, 医歯薬出版, 東京 (1984).
  26. Morichika, S., Arima, T. and Nagashima, H.: Purification and characterization of a liver cell membrane specific antigen. *Gastroenterol. Jap.* **21**, 471-478 (1986).
  27. 有馬暉勝, 松浦秀光, 下村宏之, 洲脇謹一郎, 安原高士, 成木 仁, 小出典男, 坂口孝作, 長島秀夫: 肝細胞膜特異リポ蛋白(LP-1)の性状. *消化器と免疫* **7**, 273-276 (1981).
  28. 戸田剛太郎, 柏木万寿男, 池田有成: 慢性肝疾患における肝細胞膜抗原抗体系—その多様性と臨床的意義—. *肝臓* **28**, 1675-1677 (1987).
  29. Behrens, U. J., and Paronetto, F.: Studies on "liver-specific" antigens. I. Evaluation of the liver specificity of "LSP" and "LP-2". *Gastroenterology* **77**, 1045-1052 (1979).
  30. Murakami, H., Kuriki, J., Kakumu, S., Fukui, K. and Sakamoto, N.: The specificity of human liver membrane lipoprotein. Studies with monoclonal antibodies. *Hepatology* **4**, 192-198 (1984).
  31. Kenna, J. G., Major, G. N., Lambert, K. J. and McFarlane, I. G. and Williams, R.: Murine monoclonal antibodies against "liver specific lipoprotein" (LSP) defining three antigenic sites which differ in tissue- and species-distribution and subcellular location. *Liver* **5**, 13-20 (1985).
  32. Jensen, D. M., McFarlane, I. G. Portmann, B. S., Eddleston, A. L. W. F. and Williams, R.: Detection of antibodies directed against a liver-specific membrane lipoprotein in patients with acute and chronic active hepatitis. *N. Engl. J. Med.* **299**, 1-7 (1978).
  33. Kakumu, S., Arakawa, Y., Goji, H., Kashio, T. and Yata, K.: Occurrence and significance of antibody to liver-specific membrane lipoprotein by double-antibody immunoprecipitation method in sera of patients with acute and chronic liver diseases. *Gastroenterology* **76**, 665-672 (1979).
  34. Hütteroth, T. H. and Meyer zum Büschenfelde, K. H.: Antigenic relationship between Chang liver cells and human hepatocytes. *Klin. Wschr.* **56**,

- 525-527 (1978).
35. 稲垣恭孝: 慢性肝疾患における  $^{125}\text{I}$ -protein A assay および antibody dependent cell-mediated cytotoxicity assay を用いた抗肝細胞抗体の検討. **慶応医学** **60**, 521-528 (1983).
36. Tage-Jensen, U., Arnold, W., Dietrichson, O., Hardt, F., Hopf, U., Meyer zum Büschenfelde, K. H. and Nielsen, J. O.: Liver-cell-membrane autoantibody specific for inflammatory liver diseases. **Br. Med. J.** **1**, 206-208 (1977).
37. Kurki, P., Linder, E., Virtanen, I. and Stenman, S.: Human smooth muscle autoantibodies reacting with intermediate (100 Å) filaments. **Nature** **268**, 240-241 (1977).
38. Senécal, J. L., Oliver, J. M. and Rothfield, N.: Anticytoskeletal autoantibodies in the connective tissue diseases. **Arthritis Rheum.** **28**, 889-898 (1985).
39. Frazer, I. H., Jordan, T. W., Collins, E. C., Andrews, P. and Mackay, I. R.: Antibody to liver membrane antigens in chronic active hepatitis. IV. Exclusion of specific reactivity to polypeptides and glycolipids by immunoblotting. **Hepatology** **7**, 4-10 (1987).

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 星 秀樹