<短 報>

肝動脈塞栓療法後の肝癌患者血清中の肝細胞膜中性糖
脂質抗体とその病態生理的意義

柏木万寿男 池田 有成 戸田剛太郎
丸山 稔之 岡 博*

目的：我々は、肝癌患者血清中に、肝動脈塞栓療法（TAE）後に家兎肝細胞膜を標的とする抗体（膜抗体）が出現することを報告した¹⁾。今回、本抗体の対応抗原が、肝細胞膜表面に存在する中性糖脂質（neutral glycolipid, 以下 NGL）であることを明らかにし、その精製と同定を試みたので報告する。また、その病態生理的意義について若干の考察を加えた。

対象：健康人29例、肝癌（HCC）27例、肝硬変（LC）18例、慢性肝炎（CH）29例（内訳、慢性持続性肝炎 CPH 13例、慢性活動性肝炎 CAH 16例）自己免疫性肝炎（ACAH）8例。

方法：NGLの精製：戸田らの方法²⁾により得た家兎肝細胞膜をChloroform-Methanol-Water（20：20：1）の混合液中で加温処理し、全脂質分画を抽出した後³⁾、DEAE Sephadex A-25（酢酸型）カラムクロマトグラフィーにより、酸性、中性分画に分けた。更に中性分画は、ピリジンと無水酢酸を加えてアセチル化をおこなった後、Florisil カラムクロマトグラフィーにより、精製した⁴⁾。

膜抗体の検出：家兎肝細胞膜を用いたRadioimmunoassay 法によった²⁾。

NGL 抗体の測定：NGL 分画を用いた ELISA 法によった。すなわち、Ethanol に溶かした NGL 分画をマイクロプレート（Nunc-Immuno Plate 1）に乾燥固着させ（0.71 μ g/well）、125倍希釈被検血清とインキュベートした後、結合 IgG を goat peroxidase 標識抗ヒト IgG（Cappel 社）を用いて定量した。

抗原の同定：NGL 分画を用いた Thin Layer Chromatography (TLC) - immunostaining 法によった⁵⁾。すなわち、Silica Gel Plastic sheet (Polygram Sil G, Macherey-Nagel) を用い、NGL を Chloroform-Methanol-Water (65:35:8) にて展開し、

Ovalbumin にて Blocking 後、抗 NGL 抗体陽性血清とインキュベートし、その後、goat peroxidase 標識抗ヒト IgG を用い、結合 IgG を検出した。また、糖脂質分子種の同定は、Orcinol-staining により行った。

標的抗原としての NGL の分離と FAB-MS による質量測定：上記の方法と手順により、家兎肝臓全体より NGL 分画を抽出し、これを Iatrobeads カラムクロマトグラフィーにて分画した。更にこの各分画について ELISA 法にて抗 NGL 抗体陽性血清との反応性を検討することにより、標的抗原となる NGL を同定し採取した。¹⁾ この分離した NGL の質量を、FAB-MS (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry) により測定した (JMS-HX 110, JEOL Ltd.)。

Fig. 1 Change of serum level of anti-neutral glycolipid antibody before and after TAE.

* 東京大学第1内科

Fig. 2 TLC-immunostaining of neutral glycolipid.
The arrow indicates the immuno-stained band.

結果：抗 NGL 抗体は、HCC7/27 (26%), LC 2/18(11%), 正常人2/29(6.9%), CAH 0 %, CPH 0 %, ACAH 0 %が陽性であった。

次に、HCC のうち、TAE の前後で抗 NGL 抗体価を測定、比較した (Fig. 1)。TAE 前では1/20 (5%), TAE 後では6/10 (60%) に陽性であり、このうち経時的に観察し得た 1 例では、TAE 後 2 週目で、前値の 6.6 倍、3 カ月後でも 3.9 倍を示した。これは膜抗体価の、TAE 前後の変化と対応していた。

Fig. 2 の Orcinol-staining に示すように、家兎肝細

胞膜中に主として存在する中性糖脂質は、疎水性の強いものから順に、CMH (Glycosylceramide), CDH (Lactosylceramide), CTH (Trihexosylceramide) であるが、TLC-immunostaining 法では、HCC 患者に於てグロボシドに近い位置に反応するバンドが見られたが、これに対応するバンドは Orcinol-staining 上では認められず、微量の糖脂質が抗原性を持つことが明らかになった。

Iatrobeds カラムクロマトグラフィーにて分離した標的抗原としての NGL の分子量は、FAB-MS による質量測定にて、1,498 であることが明らかになった。

考察：我々は肝癌患者において、TAE 後、膜抗体が出現することを報告してきたが、本研究で、その対応抗原が、分子量1,498の中性糖脂質 (NGL) であることを明らかにした。肝癌以外では肝硬変にも本抗原に対する抗体出現がみられたが、低力価であり、また、肝癌、肝硬変を除く肝疾患では本抗体の出現はなく、肝癌、特に肝癌壊死に伴って出現する抗体であることが明らかとなった。本抗原の種特異性、糖鎖構造の解析、肝癌細胞特異性については今後の課題である。

御指導いただいた東京大学医学部第二生化学教室永井克孝教授、岩森正男助教授に感謝いたします。

索引用語：肝動脈塞栓療法、中性糖脂質抗体、肝癌

文 献：1) 池田有成, 他：肝臓 26：803, 1985 2) Toda G, et al: Clin Exp Immunol 54: 661, 1983 3) Iwamori M, et al: J Biochem 91: 1875-1887, 1982 4) Saito T, et al: J Lipid Res 12: 257-259, 1971 5) Shimomura M, et al: Medical Immunology 11: 497, 1986

Anti-neutral glycolipid antibody in sera of patients with hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial embolization (TAE)

Masuo KASHIWAGI, Yusei IKEDA, Gotaro TODA,
Toshiyuki MARUYAMA and Hiroshi OKA*

* First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo (Tokyo)