

Analysis of New Serum Component(s)(Terasaki factor) and its Incidence in Various Liver Diseases

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7890

新しい血清成分 (Terasaki 因子) の解析と 肝疾患における出現頻度

金沢大学医学部第二病理学講座 (主任: 太田五六教授)

森 谷 修 三

(昭和61年8月12日受付)

本研究は、慢性肝疾患患者の血清中に新しく見いだされた血清成分 (Terasaki 因子) について検討するために行った。Terasaki 因子 (T 因子) は原著者によって見いだされ、仮に名付けられたものであるが、他のヒト血清由来の超低比重リポ蛋白 (VLDL) と 15°C以下でゲル内沈降反応を呈する。本沈降反応はオクタロニーの二重免疫拡散法を用いてはいるが、免疫学的な反応によるものではない沈降反応系であった。この T 因子は比重 1.215 以上のリポ蛋白を含まない分画に存在し、56°C30 分の熱処理に対しては安定で、40%飽和硫酸で沈殿した。またトリプシンなどの蛋白分解酵素の処理により破壊され、VLDL との沈降線形成能を失った。さらに、4%ポリエチレングリコールで沈殿し、protein A-Sepharose CL-4B のアフィニティーカラムに吸着されることなどから、T 因子は免疫複合体様物質と推測されたが、これと一致しない所見も認められた。種々肝疾患における T 因子の検出率の調査では、HBs 抗原陰性の慢性の肝疾患 (肝硬変+肝細胞癌、肝硬変、慢性肝炎) に高頻度 (84 名中 57 名, 67.9%) に認められ、HBs 抗原陽性群 (52 名中 2 名, 3.8%) とは明らかに有意な差が認められた ($P < 0.01$)。また、血中 HBs 抗原の有無にかかわらず、急性ウイルス性肝炎 (97 名中 6 名, 6.2%) より慢性の肝疾患 (136 名中 59 名, 43.4%) に有意に多く検出された ($P < 0.001$)。

Key words ゲル内沈降反応, 超低比重リポ蛋白 (VLDL), Terasaki 因子, 免疫複合体様物質, HBs 抗原陰性慢性肝疾患

寒天ゲル内沈降反応を用いた非 A 非 B (NA NB) 型肝炎ウイルスに関連ある抗原抗体系の検出が多くの人々によってなされてきた¹⁻⁵⁾。しかし、そのいずれもが特異性や再現性に乏しく、なかには真の抗原抗体反応によるものではないとの報告⁶⁾も行われており、現在ではすべて否定されたままに終わっている。

著者は、このようなゲル内沈降反応が、上記ウイルス関連抗原抗体系と関係なく生ずるものとすれば、その反応の実体が何であるのかを知る必要があると考え、種々の角度からその沈降反応を検索した。その結果、種々肝疾患患者血清を用いて沈降反応を検索中に、既知の抗原抗体反応によるものとは思われない沈降線形成系を見出すことが出来た。しかもこの系は通常の“抗原”と“抗体”の反応によるものではなく、血清

中のリポ蛋白の一つである超低比重リポ蛋白 (VLDL) が深く関与しており、それがあたかも“抗体”であるかの如く、肝機能異常を呈する患者血清中のある成分と沈降線を形成することが本実験で明らかとなった。

今回、この血清成分同志の化学的相互作用によると思われる沈降線形成系について種々検討を行い、さらに、VLDL と沈降反応を呈する肝機能異常者の血清中の成分が何であるかを検討し、同時にその肝疾患における出現率や臨床的意義の有無についても考察した。

対象および方法

I. 対 象

国立金沢病院, 福井県立病院, 福井県立精神病院, 金沢大学第1内科, 石川県立中央病院の入院および外

Abbreviations: AFP, α -fetoprotein; AVH, acute viral hepatitis; CAH, chronic active hepatitis; CCLF, cephalin-cholesterol-lecithin flocculation; CH, cholesterol; CPH, chronic persistent hepatitis; CRP, C-reactive protein; EDTA, ethylene-diamine-tetra-acetic acid; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; HBC,

Table 1. Patient sera used for detection of Terasaki factor

Disease group	Number of cases
Liver cirrhosis with hepatocellular carcinoma	28
Liver cirrhosis	78
Chronic active hepatitis	21
Chronic persistent hepatitis	9
Acute viral hepatitis	
type A	11
type B	40
non-A, non-B	46
Alcoholic liver injury	5
Drug induced hepatitis	4
Fatty liver	2
Other liver diseases	3
Collagen disease	
Systemic lupus erythematosus	12
Polymyositis	6
Scleroderma	5
Sjögren's syndrome	5
Rheumatoid arthritis	4
Polyarteritis nodosa	2
Mixed connective tissue disease	2
Miscellaneous diseases	26

来の患者 309 名を対象とした。その疾患別の内訳を表 1 に示した。なお、肝硬変 (LC) 患者 78 名中 3 例の血清については、剖検時に採取されたものを使用した。また、福井県立短期大学の看護学生 150 名と、福井県内の民間企業の従業員 80 名を対照とした。これら対照はいずれも血清トランスアミナーゼ値は正常範囲内 (GOT < 40 IU, GPT < 35 IU) であった。

II. 血清リポ蛋白分画の調製

福井県立病院の入院および外来の患者血清を主として使用した。約 14 時間絶食後の早朝空腹時に採血し、血清分離後、日立ローター RP55T を使用してリポ蛋白の分画を行った。リポ蛋白分画とリポ蛋白を含まない分画 (lipoprotein-deficient serum: LPDS) の調製は、血清 4 ml に直接 KBr の粉末 1.333 g を加えて溶解し、40,000 rpm で 40 時間遠心し、上層のリポ蛋白を採取し、残りを LPDS ($d > 1.215$) とした。リポ蛋白の細分画は Havel らの方法⁹⁾ に準じて行い、VLDL ($d < 1.006$)、中間比重リポ蛋白 (IDL) ($1.006 \leq d < 1.019$)、低比重リポ蛋白 (LDL) ($1.019 \leq d < 1.063$)、高比重

リポ蛋白 (HDL) ($d \geq 1.063$) の各分画を採取した。

III. Micro-Ouchterlony (MO) 法

トリス-EDTA 緩衝液 (0.01 M Tris, 0.02 M EDTA2Na, pH 7.4) にアガロース A45 (半井化学) を 0.8%, ポリエチレングリコール (PEG) 6000 (半井化学) を 2%, NaN_3 を 0.1% にそれぞれ溶解したものをゲルとして使用した。沸とう水浴上で加熱溶解したゲルの 6 ml を水平台上に置いた 7.5 × 5 cm のガラスプレート上のにせ、冷却凝固後 4°C に 2 時間以上放置した。その後ゲルに、MO 法用パンチャー (直径 3 mm 7 穴、パイプ間隔 2 mm) を用いて穴をあけ、各 well に試料を満たした。プレートはそのまま湿箱に入れて 4 ~ 6°C に放置し、沈降線の観察は 48 時間後と 96 時間後に行った。同一試料について 2 重に検査を行い、一方のみ陽性の場合には再検査して、どちらも陽性の場合のみを陽性と判定した。

IV. VLDL 分画の脱脂処理

VLDL 分画の脱脂処理は Warnick らの方法⁹⁾ に準じて行った。

V. 酵素処理

DNase I (2029 u/mg) (Worthington Biochemical, U.S.A.) (最終濃度: 150 $\mu\text{g/ml}$), RNase A (Bovine pancreas) (Boehringer Mannheim, West Germany) (100 $\mu\text{g/ml}$), ノイラミニダーゼ (*Clostridium perfringens* Type V) (Sigma, U.S.A.) (25 $\mu\text{g/ml}$), ヒアルロニダーゼ (Testis) (天野製薬) (25 TRU/ml), コラゲナーゼ (*Clostridium histolyticum* Type I) (Sigma) (280 units/ml), プロナーゼ (1000 チロジン単位/mg) (科研化学) (25 mg/ml), トリプシン (1:250) (Difco, U.S.A.) (25 mg/ml), パパイン (1:350) (Merck, West Germany) (25 mg/ml) をいずれも各最終濃度になるように血清または VLDL 分画に加え、25°C または 37°C で 2 時間反応させた。各反応液はそのまま MO 法に使用した。

VI. 免疫複合体 (IC) の分離および調製

IC の分離には Harkiss らの方法¹⁰⁾ による PEG 沈殿法を用いた。沈殿物は原血清の半量の生食水に溶解して使用した。In vitro における IC の調製には、HBs 抗原陽性血清と HBs 抗体陽性血清を種々の割合に混合したもの、あるいは、抗ヒトアルブミン、抗ヒト IgG、抗ヒト IgA (いずれも Rabbit γ -グロブリン) (DAKO, Denmark) のそれぞれと正常人血清を種々の割合に混

hepatitis B core; HBs, hepatitis B surface; HCC, hepatocellular carcinoma; HDL, high density lipoprotein; HGG, human γ -globulin; IC, immune complexes; IDL, intermediate density lipoprotein; LC, liver cirrhosis; LDL, low density lipoprotein; LPDS, lipoprotein-deficient serum; MO, micro-Ouchterlony; NANB, non-A, non-B; O.D., optical density;

合したものを一夜4°Cに放置し、それらをICを含むものとして使用した。

VII. 熱変性ヒト γ -グロブリン (Heat-aggregated HGG) の作製

ヒト γ -グロブリン Fraction II (Miles Scientific, U.S.A.) を6 mg/mlの濃度に生食水に溶解し、63°Cで20分間加熱したものを生食水にて2倍段階希釈し、3~0.19 mg/mlの濃度のものを使用した。

VIII. 血清学的検査

HBs抗原, HBc抗体の検索はR-PHA, PHA法により行い, HBc抗体にはRIA法またはコアセル(ミドリ十字)によるPHA法を使用した。RA因子の検出にはラテックス凝集法(北研)を, CRPの検出には一元免疫拡散法(北研)を, CCLF試験には市販の反応試薬(北研)をそれぞれ使用した。その他, MO法での免疫グロブリンの検出には抗ヒトIgG, 抗ヒトIgM, 抗ヒトIgA(いずれもRabbit血清)(Miles Yeda, Israel)を使用した。

IX. 肝ホモジネートの作製

ヒト剖検肝を使用した。その内訳は, LC+肝細胞癌(HCC)の非癌部8例(HBs抗原陽性2例, 陰性6例), 肝管癌の非癌部2例(HBs抗原陰性), LC4例(HBs抗原陰性), 劇症肝炎2例(HBs抗原陽性), 多発性骨髄腫他6例の計22例であった。肝重量の3~4倍量の生食水を加えてハサミで細切し, ワーリングブレンダー(池本理化工業)で約1分間処理した後, ガーゼにて濾過し, 1,500×gで10分間遠心した上清を使用した。

X. プロテインAによるアフィニティークロマトグラフィー

Protein A-Sepharose CL-4B(Pharmacia, Sweden)を, 0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)にて充分洗滌した後, カラムに充填した(1.0×8.0 cm)。血清1~3 mlをカラムに注ぎ, 約10分間吸着させた後, リン酸緩衝液を流して非吸着物を流出させた。流出液にO.D. 280 nmの吸収がなくなった後, 0.1 Mグリシン-塩酸緩衝液(pH 3.0)を加えて吸着物を溶出させた。

XI. ポリアクリルアミドゲルDISC電気泳動

荻田らの方法¹³⁾により行い, 染色はコマジープリリアントブルー-R-250を使用した。

XII. 統計学的検定法

データの統計学的検定法は, χ^2 検定もしくは, Fisherの直接確率計算法により行った。

成 績

I. ゲル内沈降反応についての基礎的検討

1. ゲル内沈降反応に関する肝疾患患者の血清因子およびそれと反応する血清リポ蛋白について

肝疾患患者の血清と肝機能が正常な他の疾患患者の血清のゲル内沈降反応によって, 既知の抗原抗体反応によるものとは思われない沈降線形成系を見出すことが出来た。この沈降線はボンソー3Rやトルイジンブルーでは薄く染るのに対し, ズタンブラックBによって強く染色された。この著しい脂質含有の所見から, 両者の血清をそれぞれ超遠心によりリポ蛋白とリポ蛋白を含まない分画(LPDS; $d > 1.215$)に分けてゲル内沈降反応を行った結果, 肝機能正常者の血清成分で, 当初“抗体”側と考えていた血清の反応物質がリポ蛋白分画に存在することが判った。これに対し, “抗原”側と考えていた肝機能異常を有する患者血清の反応物質がLPDSに存在した。そこで, 血清リポ蛋白と沈降線を形成する血清因子を, 本因子が最初に検出された肝疾患患者(K. Terasaki, 62才, 男性)の名前に因み, Terasaki因子(T因子)と名付けた。また, 本患者血清をT因子の標準血清とし, リポ蛋白側の分析を行った。

T因子含有標準血清(Terasaki血清)と反応するリポ蛋白を含む12の血清について, リポ蛋白をさらに段階的な超遠心浮上法によって, VLDL, IDL, LDL, HDLに分離してTerasaki血清と反応させたところ, すべての血清においてVLDL分画と反応が認められ, かつ4例では反応が強かった。その他の分画ではIDL分画に対し5例が反応陽性であったがその程度は弱かった(表2)。これらVLDL分画中には, MO法ではIgG, IgM, IgAがほとんど検出されなかった。なお, T因子陽性血清とVLDLの沈降反応の1例を図1に示した。この反応系による沈降線は通常の抗原抗体反応によるものよりも幾分broadである印象を受けた。

T因子陽性血清と特に強い沈降反応を示したVLDL分画は, 高脂質血症を伴う患者, 例えば糖尿病, ネフローゼ症候群, 高トリグリセライド血症, 家族性II₆型高脂血症などの患者血清から採取されたVLDL分画に多く認められた。しかし, 多血症, 甲戦腺機能亢進症などの患者血清から採取されたVLDL分画も強い沈降反応を示した。

つぎに, Terasaki血清および他の1例のT因子陽

PEG, polyethylene glycol; PHA, passive hemagglutination; PL, phospholipids; RA, rheumatoid arthritis; RIA, radioimmunoassay; R-PHA, reversed passive hemagglutination; TG, triglyceride; VLDL, very low density lipoprotein.

Table 2. Precipitin reaction between serum lipoprotein fractions of different sera and Terasaki serum

Serum	Precipitin reaction of Terasaki serum with serum fraction of				Whole serum
	VLDL**	IDL	LDL	HDL	
1423	+*	-	-	-	++
1426	+	-	-	-	+
1428	++	+	-	-	++
1433	++	+	-	-	++
1434	+	+	-	-	+
1435	+	+	-	-	+
1436	+	-	-	-	+
1437	+	-	-	-	+
1438	++	+	-	-	++
1439	++	-	-	-	++
1441	+	-	-	-	+
1443	+	-	-	-	+

*-, negative; +, positive; ++, strongly positive. Refer to the legends of Fig. 1.

**VLDL, very low density lipoprotein; IDL, intermediate density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein.

性血清と、上記で得られた3例 (serum 番号 1428, 1433, 1438) のVLDL 分画を用いてゲル内沈降反応の至適条件を決めるため、温度の影響をみた。5~30°Cの範囲で5°Cずつの間隔をおいた6段階でゲル内沈降反応を比較した。その結果、沈降線は5°C、10°Cにおいて最も明瞭に認められ、15°Cでは弱く、20°Cでは微

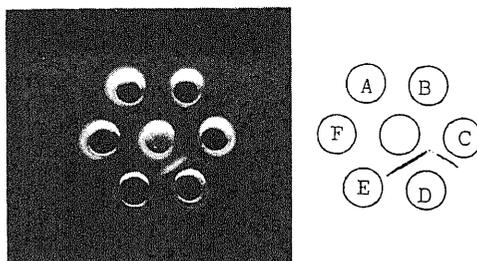


Fig. 1. Precipitin lines between VLDL fraction (center well) and serum D, and between sera C and D. Each of sera A to F was obtained from patients with liver diseases. Precipitin line similar to that between center well and D well; strongly positive (++)
Precipitin line similar to that between C well and D well; positive (+).

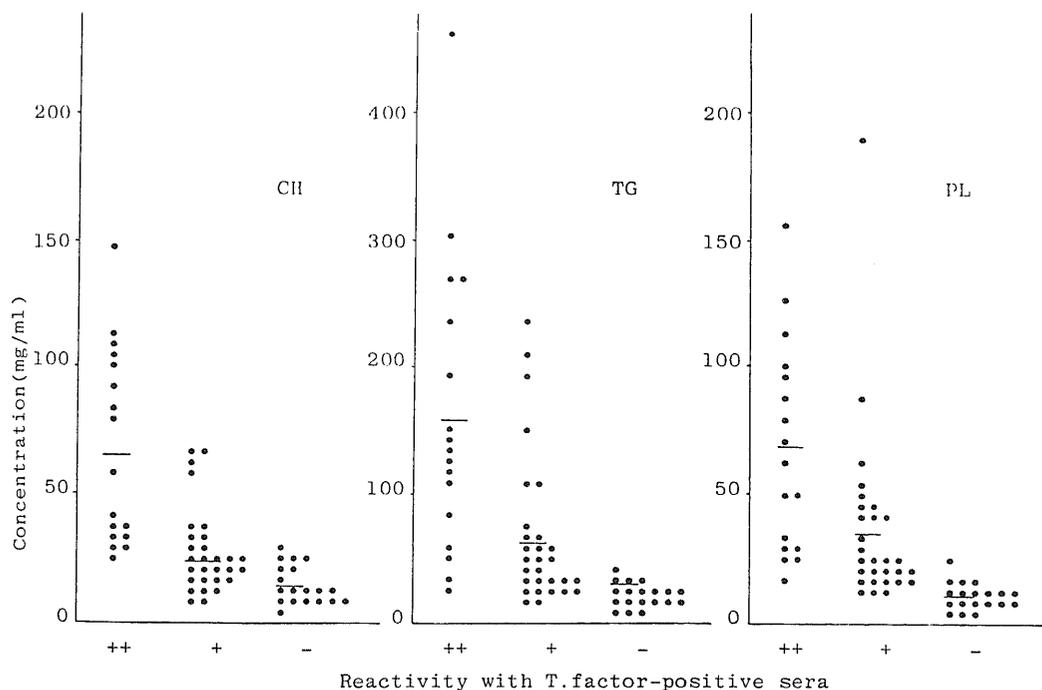


Fig. 2. Correlation between the precipitin reactivity with T. factor-positive sera and an amount of cholesterol (CH), triglyceride (TG), and phospholipids (PL) contained in VLDL used.

++, +, refer to the legends of Fig. 1; -, negative; —, mean value.

かに、25°C以上では全く観察されなかった。pHの影響については、pH 6.4, 7.4, 8.4の3段階で比較したが、沈降線の形成にはほとんど差は認められなかった。

2. T因子について

T因子の標準血清になった患者は精神分裂病で入院中、血清トランスアミナーゼの軽度上昇を持続し、HBs抗原抗体共に陰性で輸血歴なく、LC、糖尿病、胆石、胆のう炎と診断され、昭和60年3月に肝不全で死亡した。

T因子は、56°C30分の処理ではほぼ安定であり、40%飽和硫酸で沈殿する分画に含まれていた。

II. VLDLの生化学的検討

Terasaki血清と強い沈降反応を示した2例のVLDL分画について、脱脂処理を行ってからその沈降線形成能を検討したが、反応性は完全に消失していた。つぎに、種々の加水分解酵素、即ち、プロナーゼ、トリプシン、パパイン、ノイラミニダーゼ、ヒアルロニダーゼで処理した後、沈降線形成能を調べたが、その反応性は変らなかった。さらに、VLDL分画中のトリグリセライド(TG)、コレステロール(CH)、リン脂質(PL)の含有量とT因子陽性血清との沈降反応の強さとの関係について検討した(図2)。沈降線形成能はこれらVLDL分画中の3者の量とほぼ比例する傾向が認められた。

それぞれ由来の異なるVLDL分画との沈降反応に

よって判定されたT因子陽性血清が、他のVLDL分画とも同様に反応するという確証はない。そこで、このことを確認する目的で、Terasaki血清と反応したVLDL分画の10試料と、そのいくつかのVLDL分画との反応によって選ばれたT因子陽性血清の15試料を組み合わせ、沈降反応性を検討した(表3)。T因子活性の弱いと思われる血清(E143, T.S., E114)との反応では若干の反応性の相異も認められたが、特に著しい差異は認められなかった。この表中にあるmixedとは、特にT因子陽性血清と沈降線形成能の強い38名の血清を混合してそのVLDL分画を採取したものであり、これによって大量の安定したVLDL分画を確保することが出来た。そこで、以後のT因子の検出系には主としてこのmixed VLDL分画を使用し、ゲル内沈降反応を行った。

III. T因子の生化学的検討

Terasaki血清を含むT因子陽性血清3例について、種々の酵素処理を行ったところ、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、ノイラミニダーゼ、DNase I、RNase Aなどでは影響を受けなかったが、プロナーゼ、トリプシン、パパインなどの蛋白分解酵素でVLDL分画との沈降線形成能は失われた。

Sephadexを使用してT因子の分子量の推定と部分精製を試みた。Sephadex G-200によるゲル濾過では、被験6血清試料すべてについて、O.D. 280 nmで

Table 3. Precipitin reaction between VLDL fraction obtained from different individual sera and T. factor-positive sera from patients with liver diseases

T. factor*-positive serum	Precipitin reaction with VLDL fraction from sera of									
	1706	1710	1709	N.N.	1581	1733	1741	1731	1739	mixed
A337	+**	++	++	++	++	++	++	++	++	++
A216	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
K. T.	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
T. M.	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
E325	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
N. F.	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
E161	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+
D118	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+
E142	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+
E195	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
F206	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A164	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E143	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
T. S.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
E114	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-

* T. factor, Terasaki factor.

** Refer to the legends of Fig. 1.

みると3つのピークが認められ、このうちT因子活性は第2のピークの前半の部分を中心に強く認められたが、2血清試料については第1のピーク中にも認められ、T因子の多様性が観察された。ゲル濾過の1例(血清I.H.)を図3に示した。なお、第2のピークの成分の分子量は300,000前後と推定された。

つぎに、T因子がIC様物質か否かを11例のT因子陽性血清試料を用いて検討した。PEG沈殿法では、表4のように、T因子活性は2.5%PEGによってはほとんど沈殿しないが、4%PEGによって沈殿部分に強く見出された。しかし、被験11試料中8試料については、上清中にもT因子活性が認められた。さらに、protein A-Sepharose CL-4Bのアフィニティーカラムを用いてT因子の吸着を8例の血清について検討した(表5)。この際対照として3例のT因子陰性血清を用いた。T因子陽性血清のT因子活性は8例すべての血清についてプロテインAに吸着された分画に認められたが、8試料中4試料については非吸着分画にも認められた。プロテインAに吸着された分画4例について、さらにポリアクリルアミドゲルDISC電気泳動を行い、その泳動パターンをT因子陰性例の吸着分画と比較した(図4)。両者の分画の泳動パターンに違いは認められず、いずれの試料もγ-グロブリン領域に強いバンド、アルブミンに相当する部分に弱いバンドが認められた。

プロテインAによる吸着分画、非吸着分画ともにT因子が認められた血清試料(I.H.)について、吸着分画と非吸着分画のSephadex G-200によるゲル濾過を行い、T因子の存在する分画を比べた。吸着分画のゲル濾過では、第1ピークと第2ピークのどちらにもT因子活性が検出されたが(図5A)、後者の方がVLDL分画と強い沈降反応を示した。非吸着分画のゲル濾過で

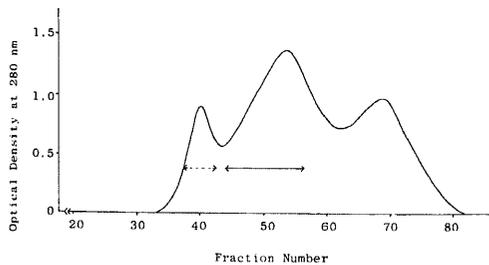


Fig. 3. Elution pattern of a T. factor-positive serum (I. H.) on Sephadex G-200 column (2.5 × 100cm).
 ←→, presence of T. factor in all of 6 sera tested;
 ←····→, presence of T. factor in 2 of 6 sera tested.

は、第1ピークにのみT因子活性が認められた(図5B)。

Aggregated IgGも同じようにPEGで沈殿し、プロテインAに吸着される性質を有する。そこで、heat-aggregated HGGを作製してVLDL分画との沈降反応を調べたが、VLDL分画とは沈降線を形成しなかつ

Table 4. The activity of T. factor in serum fractions obtained by polyethylene glycol (PEG) precipitation method

T. factor-positive serum	Activity of T. factor			
	2.5% PEG		4% PEG	
	sed.*	sup.	sed.	sup.
R. Y.	++	++	++	++
E. Y.	+	++	++	+
S. F.	+	++	++	+
M. O.	-	+	+	+
A. H.	-	++	++	++
I. H.	-	++	++	++
Y. H.	-	++	++	+
T. M.	-	+	++	+
H. H.	-	+	++	-
H. S.	-	+	+	-
T. T.	-	+	+	-

*sed., sedimentation; sup., supernatant.
 **Refer to the legends of Fig. 1.

Table 5. The activity of T. factor in serum fraction obtained by protein A-Sepharose CL-4B affinity column chromatography

Serum	Activity of T. factor		
	Whole serum	Adsorbed fraction	Non-adsorbed fraction
T. factor-positive			
I. H.	+++*	++	+
A. H.	++	++	+
H. S.	++	++	+
S. I.	++	+	+
K. A.	++	+	-
H. H.	+	+	-
T. M.	+	+	-
O. T.	+	+	-
T. factor-negative			
T. K.	-	-	-
K. K.	-	-	-
H. U.	-	-	-

*Refer to the legends of Fig. 1.

た。さらに、in vitro で IC を調製して VLDL 分画との反応性を検討した。HBs 抗原抗体による IC、ヒトアルブミンと抗ヒトアルブミン、ヒト IgG と抗ヒト IgG、ヒト IgA と抗ヒト IgA などによる in vitro IC で検討したが、いずれも VLDL 分画とは沈降反応を示さなかった。

IV. T 因子と CCLF 試験, RA 因子, クリオグロブリン等との関係

肝実質障害の指標として用いられている CCLF 試験は、CH, PL の関与する沈降反応である。VLDL 中にも CH, PL がかなり含まれているので、本沈降反応と CCLF 試験との異同が問題となる。そこで、患者血清中の T 因子の存在と CCLF 試験の成績を血清 9 試料について比較検討した (表 6)。しかし、2/3 のテスト血清ではいずれか一方のみが陽性であり、両者の関連性は認められなかった。さらに、VLDL と結合して沈降複合体を形成するという CRP についても比較検

討したが、本沈降反応と CRP 値とも関連性は認められず、また RA 因子や AFP とも比較検討したが、いずれも関連性は認められなかった。

T 因子陽性血清のなかには 4°C 保存中に沈殿物を

Table 6. Comparison of the activity of T. factor with results of CCLF test in the same sera

Serum	Activity of T. factor	CCLF test**
N. F.	+++*	+++
A. O.	++	+++
G. M.	++	+++
K. T.	++	-
E. F.	+	-
T. S.	+	-
K. Y.	-	+++
I. M.	-	++
A. M.	-	+

*Refer to the legends of Fig. 1.

**CCLF test, cephalin-cholesterol-lecithin flocculation test.

-, no flocculation; +, a mild degree of the flocculation without precipitates in the bottom; +++, a severe degree of the flocculation with a large amount of precipitates in the bottom; ++, a intermediate degree of the flocculation with precipitates.

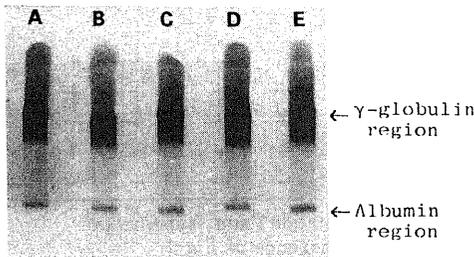


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of protein A-Sepharose CL-4B-adsorbed fractions. A, B, C and D, fractions of T. factor-positive sera; E, fraction of T. factor-negative serum.

Protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

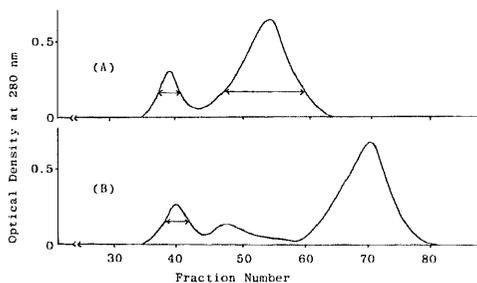


Fig. 5. Elution profiles of protein A-adsorbed (A) and non-adsorbed (B) fractions on Sephadex G-200 column (2.5×100 cm) in the same patient (I. H.).

←→, presence of T. factor.

Table 7. Relationship between the activity of T. factor and presence of cryoglobulin-like precipitates in the same sera

Serum	Activity of T. factor	Cryoglobulin-like precipitates
K. T.	+++*	++**
K. A.	++	++
S. N.	++	++
H. Y.	++	+
N. Y.	++	+
N. N.	++	+
S. T.	++	+
M. G.	+	++
K. M.	+	+
S. S.	+	+
S. T.	++	-
Y. N.	+	-
T. A.	-	++
S. M.	-	+

*Refer to the legends of Fig. 1.

**-, no precipitate; +, a small amount of precipitates; ++, a large amount of precipitates.

生ずるものが少なからず認められ、特に VLDL 分画と沈降線形成能の強いものほどその量が多い傾向にあった。この沈殿物は 37°C に加温するとほとんど消失することからクリオグロブリンと思われた。遠心分離してそのクリオグロブリン様物質を採取し、生食水に溶解して MO 法を行ったが、VLDL 分画とは沈降反応を示さず、T 因子活性は常にその上清中に認められた。なお、同一血清中の T 因子活性の存在とクリオグロブリン様沈殿物の発生とを対比した結果を表 7 に示した。クリオグロブリン様沈殿物の認められない血清にも T 因子が認められたケースが 14 例中 2 例あり、その逆のケースも 2 例認められた。

つぎに、種々肝疾患を含む 22 例の肝ホモジネート中に T 因子活性が検出されないかを検討したが、VLDL 分画と沈降反応を示したものはなかった。なお、これらの患者の血清中の T 因子活性については検索していない。

V. 各種疾患における T 因子の検出頻度

表 8 に、各疾患群別および血中 HBs 抗原の有無との関係で T 因子の検出率を示した。まず肝疾患においては、T 因子は HBs 抗原が血中に出現していない症例に検出される傾向が著しく、LC+HCC 群では HBs 抗原陰性者の 20 例中 17 例 (85.0%) と非常に高率で、

HBs 抗原陽性者 (8 例中 0 例) とは明らかに有意な差が認められた ($P < 0.01$)。同様に LC 群でも、HBs 抗原陰性者 40 例中 29 例 (72.5%) で、HBs 抗原陽性者 30 例中 2 例 (6.7%) とは有意な差であった ($P < 0.01$)。しかし、同じく HBs 抗原陰性のアルコール多飲者 (8 例中 3 例, 37.5%) とは有意な差ではなかった。慢性活動性肝炎 (CAH) 群でも、HBs 抗原陰性者 (9 例中 4 例, 44.4%) と HBs 抗原陽性者 (12 例中 0 例) とは有意な差が認められた ($P < 0.05$)。しかし、慢性持続性肝炎 (CPH) 群では HBs 抗原陰性者 (7 例中 4 例, 57.1%) と HBs 抗原陽性者 (2 例中 0 例) とは統計学的に有意な差ではなかった。上記 LC+HCC, LC, CAH, CPH 群を慢性肝疾患群としてまとめてみると、HBs 抗原陰性者は 84 名中 57 名 (67.9%) が T 因子陽性であり、HBs 抗原陽性者は 52 名中 2 名 (3.8%) が陽性となり明らかに有意な差であった ($P < 0.01$)。急性ウイルス性肝炎 (AVH) 群では、B 型 40 例のすべてに検出されず、A 型の 11 例中 1 例 (9.1%) と NANB 型の 46 例中 5 例 (10.9%) にのみ検出された。このうち、B 型と NANB 型の差は統計学的に有意であった ($P < 0.05$)。また、血中 HBs 抗原の有無にかかわらず、AVH 群 (97 例中 6 例, 6.2%) と慢性の肝疾患群 (136 名中 59 名, 43.4%) を比べても明らかに後者に

Table 8. Incidence of T. factor in sera of patients with various liver diseases and others

Disease group		Number of cases tested	Number(%) of T. factor positive cases	
LC+HCC	HBsAg(+)	8	0	—**
	HBsAg(-)	20	17(85.0)	
LC	HBsAg(+)	30	2(6.7)	—**
	HBsAg(-)	40	29(72.5)	
	alcoholic	8	3(37.5)	
CAH	HBsAg(+)	12	0	—*
	HBsAg(-)	9	4(44.4)	
CPH	HBsAg(+)	2	0	—NS
	HBsAg(-)	7	4(57.1)	
AVH	type A	11	1(9.1)	—*
	type B	40	0	
	NANB	46	5(10.9)	
Other liver diseases		14	1(7.1)	
Collagen disease		36	2(5.6)	
Miscellaneous diseases		26	1(3.8)	
Normal control		230	1(0.4)	

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; NS, not significant; LC, liver cirrhosis; HCC, hepatocellular carcinoma; CAH, chronic active hepatitis; CPH, chronic persistent hepatitis; AVH, acute viral hepatitis; NANB, non-A, non-B.

T. factor was detected by precipitin reaction using micro-Ouchterlony method (see Methods).

Table 9. Incidence of T. factor in patients with HBsAg-negative chronic liver diseases (LC+HCC, LC, CAH, CPH) subdivided into groups of positive or negative anti-HBs and anti-HBc in combination

Anti-HBs and anti-HBc	Number of cases tested	Number (%) of T. factor -positive cases
Anti-HBs(+), anti-HBc(+)	17	10(58.8)
Anti-HBs(+), anti-HBc(-)	1	1
Anti-HBs(-), anti-HBc(+)	19	12(63.2)
Anti-HBs(-), anti-HBc(-)	17	14(82.4)

NS, not significant.

多く、統計学的にも有意な差であった ($P < 0.001$)。

その他の肝疾患のなかでは1名のみ(7.1%)が陽性を示したが、この患者は、HBs抗原陰性でアルコール性肝障害の他に、糖尿病、胆石の合併症があった。血中ICが高頻度に検出されるという膠原病の患者36名については、強皮症の5名中2名が陽性を示したが、膠原病全体としては5.6%の低い陽性率であった。その他の患者26名のなかでは、甲状腺機能低下症の1名が強陽性であったが、全体としては3.8%の低率陽性にとどまった。さらに、対照として行った健康な看護学生150名と民間企業従業員の80名については、後者の1名のみ(0.4%)に検出された。

表8のLC+HCC, LC(アルコール多飲者を除く)、CAH, CPHのHBs抗原陰性者76名のうちの54名について、HBs抗体, HBc抗体との関係におけるT因子の検出率を検討した(表9)。HBc抗体陽性者は、HBs抗体の有無にかかわらず58.8%~63.2%がT因子陽性を示し、両抗体とも陰性のものでは、82.4%にT因子が検出された。しかし、これらの間の差は統計学的に有意ではなかった。

考 察

本研究でのゲル内沈降反応系において、当初の血清同志の反応系から、究極的にその一方の物質としてVLDL分画を使用するに到った第一の理由は、沈降線がズダンブラックBに強染されたという点にあった。そこで、当初“抗体”と考えていた血清の成分が γ -グロブリンをほとんど含まないリポ蛋白分画中に認められ、しかもそのうちのVLDL分画が最も恒常的かつ鮮明な沈降線を形成することが分った。つぎに、T因子がVLDLに対する抗体そのものであるという可能性は、本沈降反応が20°C以上では認められないという点や、Sephadex G-200によるゲル濾過やPEG沈殿法の結果などから考え難いと思われた。

VLDL以外にIDLもTerasaki血清(T因子)と一部反応したが、これはIDL分画中へのVLDLの混

入のためと考えられる。しかし、周知のようにIDLはVLDLのremnantであり、両者の化学的組成がかなり共通しているので、同じように反応する可能性もある。VLDLはその大きさ、組成、起源においてもheterogenousであり、種々の物質とも結合し易いことが知られている。本沈降反応にVLDLの脂質部分が極めて大きな役割を果していることは、脱脂処理でその反応性が失われ、沈降線形成能がTG, CH, PLの含有量とほぼ比例する関係が認められたことなどから明白である。恐らく、脂質やアポ蛋白を含めた全体の構造が必要なものと思われる。また、蛋白分解酵素処理によって沈降線形成能がほとんど失われなかったことから、脂質構造がより重要なものと判断している。

T因子については、当初はRA因子、CCLF反応に関連ある物質、VLDLと結合する性質を有するCRP¹²⁾、VLDLやLDLと低イオン強度の条件下で結合するというムコ多糖¹³⁾、あるいは低温で沈殿するフィブロネクチン(cold insoluble globulin)等を考えて検討してきた。しかし、T因子はこれらのいずれとも一致する所見が得られなかった。

各種肝疾患に伴って患者血清中に出現する高分子の異常物質についてはいくつか報告されている。肝炎ウイルス関連物質以外のものとしては、リポ蛋白X¹⁴⁾、Arai抗原¹⁵⁾、Millan抗原¹⁶⁾、異常塩基性 γ -グロブリン¹⁷⁾、さらには肝線維化の指標として使用されているprocollagen peptide¹⁸⁾などがある。しかし、比重や分子量、肝疾患における出現状況などから、T因子はこれらのうちのどれとも一致しない。また、文献上、血清VLDLが他のヒト由来の血清因子とゲル内で沈降反応を示すという報告は見当たらない。ただ、ポリリボヌクレオチドが血清因子とゲル内沈降反応を示すという報告¹⁹⁾や、ポリリボヌクレオチドが強皮症患者血清中のLDLとcounterimmunoelectrophoresisで沈降線を作るという報告²⁰⁾があるが、いずれの反応もVLDLは関与していない。

注目すべき点は、この沈降線が15°C以下という低温

下で形成され、また、T因子陽性血清の多くに4°C保存中に、クリオグロブリン様沈殿物が認められたということであった。しかし、クリオグロブリンおよびクリオグロブリン様沈殿物そのものはVLDLと沈降反応を示さず、また、クリオグロブリン様沈殿物の認められない血清でも本沈降反応を示すものがあった。しかし、このことを説明するのに都合の良い考え方がないわけではない。即ち、T因子が自己血清中のVLDLと複合体を形成することによって安定なクリオグロブリン様物質が形成される、ということである。もしT因子が過剰に存在すれば、その上清中にはまだVLDLと反応し得るT因子が残っていることとなり、一方、VLDLが過剰に存在すればT因子は沈殿物として消費され尽してしまい上清中には残っていないことになる。試みに、試験管内に少量のVLDL分画とクリオグロブリン様物質除去後のT因子活性が残っている血清を混合して4°Cに放置してみたが、はっきりそれと認められるような沈殿物は観察されなかった。今日、クリオグロブリンについては依然として不明な点が多く、その本態は複雑である。クリオグロブリンは、HBs抗原抗体ICを含むという報告²¹⁾や、逆に、HBs抗原陰性のものにクリオグロブリンが多いという報告²²⁾もある。一般にクリオグロブリンとICは深いつながりがあり、クリオグロブリンはICの間接的証明法の一つとして考えられている。

T因子が比重1.215以上の蛋白質性の物質で、40%飽和硫酸で沈殿し、Sephadex G-200ではIgGによるICの大きさに近い分画²³⁾に出現し、4%PEGで沈殿し、プロテインAに吸着され、その吸着物の電気泳動ではほとんどγグロブリン分画のみに強いバンドが認められたことなどから、その本体はICに似た物質であろうと言える。Aggregated IgGにも同じような性質があるが、heat-aggregated HGGではVLDL分画と沈降反応が認められなかったことから否定的である。Protein A-Sephaderose CL-4Bによる吸着処理で、非吸着分画にもT因子が認められたが、この非吸着分画のSephadex G-200によるゲル濾過の結果から、この部分にIgMによるICが含まれていた可能性が考えられる。プロテインAには、IgG₃以外のIgGのほか、一部のmonoclonalなIgMやIgA、さらにはIgEの吸着もあることが明らかにされている²⁴⁾が、吸着されないものも少なくないので、上記の非吸着分画にT因子が含まれていたものと判断している。

流血中のICがVLDLとゲル内沈降反応を示すという報告はない。また、人為的にin vitroで作製したICでもそのような性質は認められなかった。したがってこの沈降反応が、VLDLとIC様物質との反応である

という可能性が支持されたわけではないが、否定的だとも言えない。

これまでNANB型肝炎ウイルスに関連ある抗原抗体系については数多く報告¹¹⁻⁵⁾されてきたが、いずれも、広く認められているものはない。Suhら⁹⁾は、NANB系における“抗原”がICである可能性を述べており、また、“抗体”と考えられるものは生化学的に免疫グロブリンの性質をもっていないとも指摘している。Hoofnagle⁷⁾も同様なことを報告している。したがって、本沈降反応の系では免疫グロブリンと無関係なVLDL分画を用いている点や、ゲル組成、温度条件、pHなどについて、従来のNANB検出系と異なっているが、これまで報告¹¹⁻⁵⁾されているNANB系の沈降反応に一部類似しているように思われる。

しかし、各種肝疾患やその他の疾患を対象にしたT因子の出現頻度の調査では、T因子はHBs抗原陰性の、特に慢性の肝疾患に極めて高頻度に検出されるという事実が得られた。このことから、これら慢性肝疾患の病因としてNANBウイルスの可能性が浮び上ってくる。Dienstagら²⁵⁾はNANB型肝炎の血中ICの中の抗原がウイルス特異性の高いものと判断している。しかし、NANB型AVHでのT因子は低い検出率であり、本沈降反応とNANB型ウイルス感染との直接的な関連性は乏しいものと判断される。

T因子が肝細胞内で産生され、血中に流出したものではないかという観点から、種々疾患の肝ホモジネートを作製してT因子活性の検出を試みたが、それを証明する成績が得られなかった。今後に残された問題である。

近年、血中ICは慢性進行性疾患において、その病態に重要な役割を果していると考えられてきている。血中ICの量がdisease activityと密接な関係があり、この血中ICを持続的に有する患者の予後が悪いというAnh-Tuanらの報告²⁶⁾がある。T因子がHBs抗原陰性のLC+HCCおよびLCに最も高率に出現することから、その持続陽性が悪い予後を暗示しているようであるが、さらに多くの症例による検討が必要である。

結 論

1. 慢性肝疾患患者の血清の多くに、他のヒト血清由来のVLDL分画と15°C以下においてゲル内沈降反応を示す成分(Terasaki因子; T因子)が存在した。

2. T因子と沈降反応するVLDL分画は脱脂処理によりその反応性を失い、また、VLDL分画中のTG, CH, PLの含有量とその反応性はほぼ比例する関係が見られた。IDL分画とも一部反応する例があったが、LDLやHDL分画とは反応しなかった。

3. T因子は血清リポ蛋白を含まない分画 (d > 1.215) に存在し, 56°C 30 分の処理で安定であり, 40% 飽和硫酸で沈殿した。また, 蛋白分解酵素によって分解され, Sephadex G-200 のゲル濾過では多様性が認められた。さらに, 4% PEG で沈殿し, protein A-Sepharose CL-4B に吸着されたことなどから, T因子は IC 様物質に近いと考えられた。

4. しかし, heat-aggregated HGG や in vitro で作製した IC には VLDL 分画と沈降反応する性質は認められなかった。

5. T因子陽性血清は, クリオグロブリン様沈殿物を形成し易いが, 分離したクリオグロブリン様物質は VLDL 分画とは反応せず, クリオグロブリン様沈殿物除去後の血清中に T因子活性が認められた。

6. 各種疾患での T因子の検出頻度は, 血中 HBs 抗原陰性の慢性の肝疾患に多く検出され (84 名中 57 名, 67.9%), 血中 HBs 抗原陽性群 (52 名中 2 名, 3.8%) とは明らかに有意な差が認められた ($P < 0.01$)。なかでも血中 HBs 抗原陰性の LC+HCC では 85% (20 名中 17 名) と最も高率で, ついで同じく陰性の LC の 72.5% (40 名中 29 名), 同じく陰性の CPH, CAH でそれぞれ 57.1% (7 名中 4 名), 44.4% (9 名中 4 名) であった。

7. HBs 抗原陽性の AVH では, T因子はすべて陰性であり, 他の AVH でも A型で 9.1% (11 名中 1 名), NANB型で 10.9% (46 名中 5 名) で, いずれも慢性の肝疾患と比べて極めて低率であった。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導御校閲を賜りました太田五六教授に深甚なる謝意を表します。また, 多大なる御協力を頂きました国立金沢病院長杉岡五郎先生, 福井県立病院竹越忠美先生, 土井下建治先生, 泉彪之助先生, 金沢大学第 1 内科小林健一助教授, 浜松医大公衆衛生吉沢浩司助教授, 石川県立中央病院林守源先生, 国立金沢病院研究検査科小西圭子先生, 福井県立精神病院検査科藤田和子氏に深く感謝致します。さらに, 御指導御協力を頂きました福井医大生化学犬塚学助教授, 金沢大学がん研究所右田俊介教授, 金沢大学医学部第 2 病理学教室野々村昭孝助教授をはじめ諸先生方および教室の皆様方に深謝致します。

文 献

- 1) Shirachi, R., Shiraiishi, H., Tateda, A., Kikuchi, K. & Ishida, N.: Hepatitis "C" antigen in non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Lancet*, ii, 853-856 (1978).
- 2) Vitvitski, L., Trepo, C., Prince, A. M. & Brotman, B.: Detection of virus-associated antigen in serum and liver of patients with non-A,

non-B hepatitis. *Lancet* ii, 1263-1267 (1979).

- 3) Tabor, E., Mitchell, F. D., Goudeau, A. M. & Gerety, R. J.: Detection of antigen-antibody system in serum associated with human non-A, non-B hepatitis. *J. Med. Virol.*, 4, 161-169 (1979).
- 4) Spertini, O. & Frei, P. C.: Demonstration of a single antigen-antibody system in 26 patients with non-A, non-B viral hepatitis. *Lancet*, ii, 899-903 (1982).
- 5) Villarejos, V. M., Visoná, K. A. & Serra, J.: Evaluation of the specificity of an immunoprecipitin test for non-A, non-B hepatitis. *J. Infect. Dis.*, 147, 702-710 (1983).
- 6) Suh, D. J., White, Y., Eddleston, A. L. W., Amini, S., Tsiquye, K., Zuckerman, A. J. & Williams, R.: Specificity of an immunoprecipitin test for non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, i, 179-180 (1981).
- 7) Hoofnagle, J. H.: Precipitin system detected in sera from patients with non-A, non-B hepatitis. *J. Med. Virol.*, 7, 315-319 (1981).
- 8) Havel, R. J., Eder, H. A. & Bragdon, J. H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, 34, 1345-1353 (1955).
- 9) Warnick, G. R., Mayfield, C., Albers, J. J. & Hazzard, W. R.: Gel isoelectric focusing method for specific diagnosis of familial hyperlipoproteinemia type 3. *Clin. Chem.*, 25, 279-284 (1979).
- 10) Harkiss, G. D. & Brown, D. L.: Detection of immune complexes by a new assay, the polyethylene glycol precipitation-complement consumption test (PEG-CC). *Clin. Exp. Immunol.*, 36, 117-129 (1979).
- 11) 荻田善一・中村正二郎: 電気泳動実験法 (電気泳動学会編), 第 5 版, 198-202 頁, 文光堂, 東京, 1978.
- 12) Cabana, V. G., Gewurz, H. & Siegel, J. N.: Interaction of very low density lipoprotein (VLDL) with rabbit C-reactive protein. *J. Immunol.*, 128, 2342-2348 (1982).
- 13) Iverius, P-H: The interaction between human plasma lipoproteins and connective tissue glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.*, 247, 2607-2613 (1972).
- 14) Seidel, D., Alaupovic, P., Furman, R. H. & McConathy W. J.: A lipoprotein characterizing obstructive jaundice. II. Isolation and partial

characterization of the protein moiety of low density lipoproteins. *J. Clin. Invest.*, **49**, 2396-2404 (1970).

15) 小松敬直: 肝疾患に関連した新しい異常リポ蛋白 (Arai 抗原) の臨床的ならびに基礎的研究. *肝臓*, **26**, 1004-1013 (1985).

16) Taylor, P. E., Almeida, J. D., Zuckerman, A. J. & Leach, J. M.: Relationship of Millan antigen to abnormal serum lipoprotein. *Am. J. Dis. Child.*, **123**, 329-331 (1972).

17) 安部行弘・永田耕一・石井美岐代・有馬暉勝・長島秀夫: 肝疾患における異常塩基性 γ グロブリン. *肝臓*, **22**, 1701-1707 (1981).

18) 漆崎一郎・新津洋司郎・幸田久平・伊藤信行: 肝線維化の指標としての血中 procollagen peptide の測定. *医学のあゆみ*, **131**, 1-8 (1984).

19) Natali, P. G. & Tan, E. M.: Precipitin reactions between polyribonucleotides and heat labil serum factors. *J. Immunol.*, **108**, 318-324 (1972).

20) Garcia, I., Wolbers, R. & Tan, E. M.: Reaction between polyribonucleotides and low density lipoproteins in sera of patients with progressive systemic sclerosis. *J. Immunol.*, **126**, 706-708 (1981).

21) Levo, Y., Gorevic, P. D., Kassab, H. J.,

Zucker-Franklin, D. Franklin, E. C.: Association between hepatitis B virus and essential mixed cryoglobulinemia. *New Eng. J. Med.*, **296**, 1501-1504 (1977).

22) Popp, J. W. Jr., Dienstag, J. L., Wands, J. R. & Bloch, K. J.: Essential mixed cryoglobulinemia without evidence for hepatitis B virus infection. *Ann. Int. Med.*, **92**, 379-383 (1980).

23) 斉藤隆夫・粕川禮司: 免疫複合体. *肝胆膵*, **11**, 607-614 (1985).

24) Harboe, M. & Fölling, I.: Recognition of two distinct groups of human IgM and IgA based on different binding to Staphylococci. *Scand. J. Immunol.*, **3**, 471-482 (1974).

25) Dienstag, J. L., Bhan, A. K., Alter, H. J., Feinstone, S. M. & Purcel, R. H.: Circulating immune complexes in non-A, non-B hepatitis. Possible masking of viral antigen. *Lancet*, **i**, 1265-1267 (1979).

26) Anh-Tuan, N. & Novák, E.: Hepatitis B surface antigen circulating immune complexes (HBsAg-CICs) in patients with hepatitis B and asymptomatic HBsAg carriers. *Clin. Exp. Immunol.*, **43**, 246-253 (1981).

Analysis of New Serum Component (s) (Terasaki factor) and its Incidence in Various Liver Diseases Shuzo Moritani, The Second Department of Pathology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *Juzen Med. Soc.*, **95**, 670—682 (1986)

Key words: precipitin reaction, very low density lipoprotein (VLDL), Terasaki factor, immune complexes-like substance, HBsAg-negative chronic liver disease

Abstract

The purpose of this study is to evaluate new serum component (s) (Terasaki factor) in sera of patients with chronic liver diseases. Terasaki factor (T. factor), which was found and tentatively named by the author, precipitates at below 15°C with very low density lipoprotein (VLDL) obtained from other individuals. The precipitin reaction was performed by using Ouchterlony's double immunodiffusion method, but evidence was obtained that the reaction was not immunologic. T. factor was found in lipoprotein-deficient serum fraction ($d > 1.215$), and was stable against heating at 56°C for 30 min. It was precipitated at 40% saturated ammonium sulfate, and hydrolyzed by trypsin or other proteinases, resulting in a loss of the precipitating activity. T. factor was detected in the precipitates obtained by 4% polyethylene glycol, and adsorbed by protein A-Sepharose CL-4B affinity column. These results suggest that T. factor consisted largely of

immune complexes-like substance, though there were findings inconsistent with this concept. A survey of T. factor-positive sera of patients with various liver diseases showed that the prevalence of the positive sera was much higher in HBsAg-negative chronic liver diseases including liver cirrhosis with hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis and chronic hepatitis (57 out of 84, 67.9%), than in HBsAg-positive ones (2 out of 52, 3.8%) ($p < 0.01$), and also higher in chronic liver diseases (59 out of 136, 43.4%) than in acute viral hepatitis (6 out of 97, 6.2%) ($p < 0.001$) irrespective of the presence of HBsAg in their sera.