

研究のトピックス

肝線維化病態の血清学的診断

鳥取大学医学部第二内科 (主任 川崎寛中教授)

村 脇 義 和

Serum markers for fibrosis in chronic liver disease

Yoshikazu MURAWAKI

*Second Department of Internal Medicine, Tottori University  
School of Medicine, Yonago 683, Japan*

**ABSTRACT**

Many assays for enzymes and metabolites of collagen metabolism have been investigated in serum to assess fibrogenesis, fibrolysis and fibrosis in chronic liver disease. We have examined the clinical usefulness of these serum markers in chronic liver disease. Serum levels of prolyl 4-hydroxylase were elevated in relation to increases in liver enzyme activity, suggesting that serum prolyl 4-hydroxylase reflects the actual change in hepatic collagen biosynthesis. We developed the assay for serum lysyl oxidase activity through the partial purification the enzyme by a DEAE procedure in the presence of 6M urea and the following dialysis against 3M KSCN. Serum lysyl oxidase activity was increased with the development of histological liver fibrosis, indicating that serum lysyl oxidase is a sensitive indicator of liver fibrosis. Serum collagenase activity in chronic liver disease was lower than in the normal control, and decreased as liver disease developed. In contrast, serum level of the metalloproteinase tissue inhibitor was inversely correlated with serum collagenase activity, indicating that serum collagenase does not reflect the amount of collagenase in human fibrotic liver. Since the early stage of liver fibrosis is characterized by a relative larger increase in type III collagen, strong interest has been raised for type III (PⅢNP) than for type I collagen propeptides (PICP). Serum PⅢNP level was increased in chronic active liver disease, and was correlated with histological features of necrosis and inflammation rather than fibrosis. Serum PⅢNP should be regarded as a marker of ongoing fibrogenesis in liver. Serum levels of the fragments of type IV collagen such as 7S domain, TH domain and NC1 domain were increased in chronic liver disease, these levels being correlated with the histological degree of liver fibrosis. Type IV collagen fragments are regarded as markers of basement membrane formation and sinusoids capillarization. The serial determination of these parameters and the combination of some parameters may help to evaluate the ongoing collagen metabolism in chronic liver disease.

**Key words** : liver disease, prolyl hydroxylase, lysyl oxidase, collagenase, TIMP, PⅢNP, PICP, type IV collagen

はじめに

各種線維化病変ではコラーゲンを中心とした細胞外マトリックスの沈着が認められる。この線維化の程度は通常病理組織学検査により評価されているが、線維化の動的解析すなわち線維増生 fibrogenesis, 線維融解 fibrolysis についてはこの方法では評価できない。このため細胞外マトリックス代謝関連酵素および代謝物の血中での測定が近年検討されている<sup>1, 23, 25</sup>。我々は、慢性肝疾患で細胞外マトリックスの主要成分であるコラーゲンの代謝酵素および代謝物の血中での測定と肝線維化病態との関連について検討してきたので、これら成績を中心に肝線維化の血清学的診断の現状を概説する。

1. コラーゲン代謝と肝構成コラーゲン

コラーゲン代謝は通常図1の如く行われる<sup>11, 15</sup>。まず、コラーゲン各型に特異的な mRNA により、粗面小胞体リボソームでプロ $\alpha$ -

鎖が生成される。そして、ペプチド内のプロリンおよびリジン残基がプロリン水酸化酵素およびリジン水酸化酵素により水酸化され、次いで、一部のヒドロキシリジン残基にガラクトース、グルコースが付着された後、3本のプロ $\alpha$ -鎖が三重螺旋を形成しプロコラーゲンとなる。プロコラーゲンはゴルジ装置を経て分泌され、細胞外でNおよびC末端のペプチドがプロテアーゼにより切断され、コラーゲン分子となる。

コラーゲン分子内のリジン、ヒドロキシリジン基は細胞外で lysyl oxidase により酸化的脱アミノ化を受けアルデヒド基となり、その後互いに非酵素的に結合し架橋を形成する。架橋を形成したコラーゲン分子は不溶性で安定なコラーゲン線維として組織に沈着する。一方、組織に沈着したコラーゲン線維も他の蛋白と同様に代謝回転しており、特異的分解酵素コラゲナーゼにより分解される。また病態によってはコラーゲン分解カテプシンによる分解も行われている。これらコラーゲン代謝は、正常組織中では代謝回転は一般に低いが、

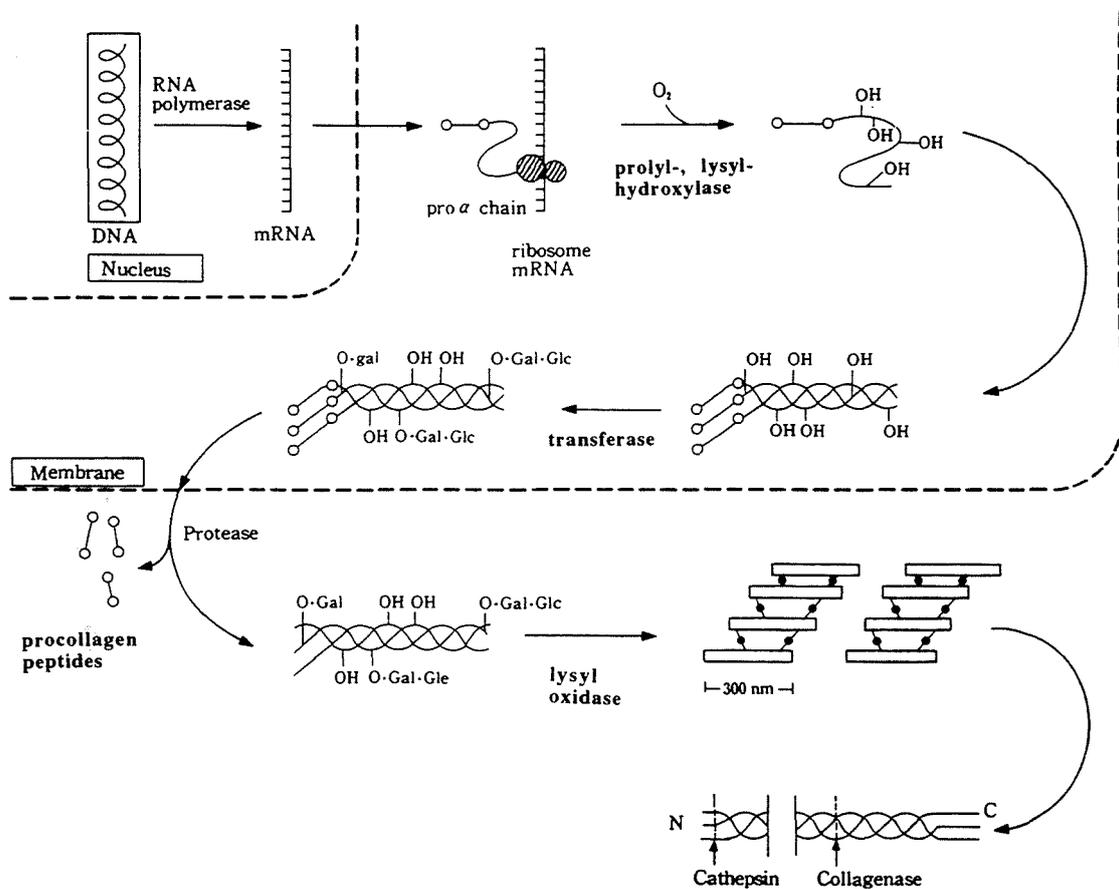


図1 コラーゲン代謝

実験的およびヒト線維肝では合成系および分解系とも著明に上昇している<sup>8, 9)</sup>。

生体内コラーゲンには、現在13種類が同定されているが、肝臓ではI, III, IV, V, VI型の5種類が認められている<sup>11)</sup>。I, III, V型コラーゲン分子は300nmと長く架橋形成により線維束を形成している。これらコラーゲンは間質コラーゲンと呼ばれ、正常肝では主として門脈域に存在するが、Disse腔にも認められる。IV型コラーゲンは基底膜コラーゲンとも呼ばれ、400nmの分子が互いに結合して格子状構造を形成している。正常肝では門脈域の脈管や神経の基底膜、Disse腔に存在している。VI型コラーゲンは細線維性コラーゲンと呼ばれ、100nmと短い分子である。この末端ドメインはコラーゲンに結合し、コラーゲン線維束の周囲に細線維網を形成している。肝でのコラーゲン各型の割合はおおよそI型35%、III型35%、IV型10%、V型10%、VI型10%である。肝小葉内におけるコラーゲン産生細胞は、伊東細胞、類洞内皮細胞であるが、線維肝ではこれら細胞とともに肝細胞も関与している。

慢性肝病変においてはコラーゲン量が増加しその代謝が亢進していること、更に、肝臓は血流に富む臓器であるので、肝組織中の変動が容易に血中に反映され、血中のコラーゲン代謝酵素および代謝物の測定は、肝線維化病態を把握する上で有用と考えられる。

## 2. Prolyl 4-hydroxylase (PH)

本酵素は粗面小胞体に局在し、プロ $\alpha$ -鎖中のプロリンを水酸化しヒドロキシプロリンにする酵素で、コラーゲン合成過程での律速酵素と考えられている<sup>23)</sup>。PHは2種類のサブユニット $\alpha$  (分子量64kDa)と $\beta$  (分子量60kDa)が2個ずつから成る4量体 ( $\alpha 2\beta 2$ ) である。酵素活性は4量体でのみ認められるが、組織中では4量体あるいは各サブユニットとして存在している。肝組織中のPH活性は、実験的およびヒト線維肝で著明に増加している。

血清中のPH活性はラットおよびヒトで検出されるが、血清中のPHの活性型酵素蛋白量は総PH蛋白量の10%以下であること、更に、血中にはPH酵素阻害因子が存在することより、検出される活性は一般に低くその正確性に疑問がある。実際、実験的肝障害で血清PH活性と肝PH活性とが

相関しないことが示されている<sup>6)</sup>。

このため免疫学的方法により血中PH酵素蛋白量を測定することが試みられている。PHに対するポリクローナル抗体を用いて検討した成績では、血清PH量は各種肝疾患で肝組織中のPH活性およびPH蛋白量と密接に関連して増加することが示されている<sup>4)</sup>。したがって、血清PH量は肝での線維増生を反映するものと考えられる。この場合の血清PH量の上昇機序としては、肝組織中で増加したPHがコラーゲンの分泌とともに細胞外に放出されるためと推測されている。

近年PHの $\beta$ サブユニットに対するモノクローナル抗体を用いた測定法も開発されている<sup>32)</sup>。この測定法を用いて検討した我々の成績では(表1)、血中PH $\beta$ サブユニットの正常値に対する増加率、異常率は、慢性持続性肝炎で1.2倍、32%、慢性活動性肝炎で1.3倍、44%、肝硬変で1.3倍、50%であり、その増加率および異常率は一般に低く、線維増生の指標としての有用性は少ないように思われる。この理由として、PH $\beta$ サブユニット自体が単独でdisulfide isomerase作用や細胞性甲状腺ホルモン結合蛋白機能など<sup>25)</sup>、コラーゲン合成以外の多くの作用を行っていることが挙げられる。

## 3. Lysyl oxidase (LO)

本酵素はコラーゲンおよびエラスチンの架橋形成に関与する分泌酵素で、細胞外でこれら蛋白中の特定のリジン、ヒドロキシリジンの $\epsilon$ -アミノ基を酸化脱アミノ化し、それぞれに対応するアルデヒド (allysine, hydroxyallysine) にする<sup>7, 12)</sup>。生成されたアルデヒド基は、アルドール縮合あるいはSchiff塩基形成を経て非酵素的に架橋を形成する。この反応で可溶性のコラーゲン分子は不溶性で安定した成熟コラーゲン線維となり組織に沈着する。したがって、本酵素は組織へのコラーゲン沈着を支配する重要な因子のひとつと考えられる。本酵素の産生細胞については不明な点も多いが、内皮細胞や平滑筋細胞などの血管系細胞とともに、線維芽細胞などのコラーゲン産生細胞で生成されているものと考えられている。

肝組織中のLO活性は、実験的線維肝で組織学的に肝線維化が明らかとなるとその活性が著明に上昇することが示されている<sup>28)</sup>。本酵素は分泌酵素で細胞外で作動することより、肝での本酵素の

表1 慢性肝疾患における血清線維化マーカー

	No	Control	No	CPH	No	CAH	No	LC
PH (ng/ml)	30	56±9	22	66±19	25	71±18	1	973±13
LO (dpm/ml)	14	46±17	9	75±36	9	201±59	21	545±117
MMP-1 (U/l)	24	62±12	10	39±11	12	31±8	15	25±7
TIMP (ng/ml)	25	159±29	40	174±40	50	200±46	42	241±78
PIIINP (U/ml)	25	0.48±0.06	40	0.89±0.33	50	1.10±0.35	42	1.40±0.38
PICP (ng/ml)	20	125±38	22	108±35	24	107±33	25	136±55
7S-C (ng/ml)	25	4.4±0.7	40	6.0±1.2	50	8.2±2.1	42	12.4±4.6
IV-C (ng/ml)	25	82±18	30	95±29	41	144±49	30	247±146

Mean ±SD

CPH : chronic persistent hepatitis

CAH : chronic active hepatitis

LC : liver cirrhosis

PH : prolyl 4-hydroxylase

LO : lysyl oxidase

MMP-1 : collagenase

TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase

PIIINP : aminoterminal peptide of type III procollagen

PICP : carboxyterminal peptide of type IV collagen

7S-C : 7S fragment of type IV collagen

IV-C : central triple-helix of type IV collagen

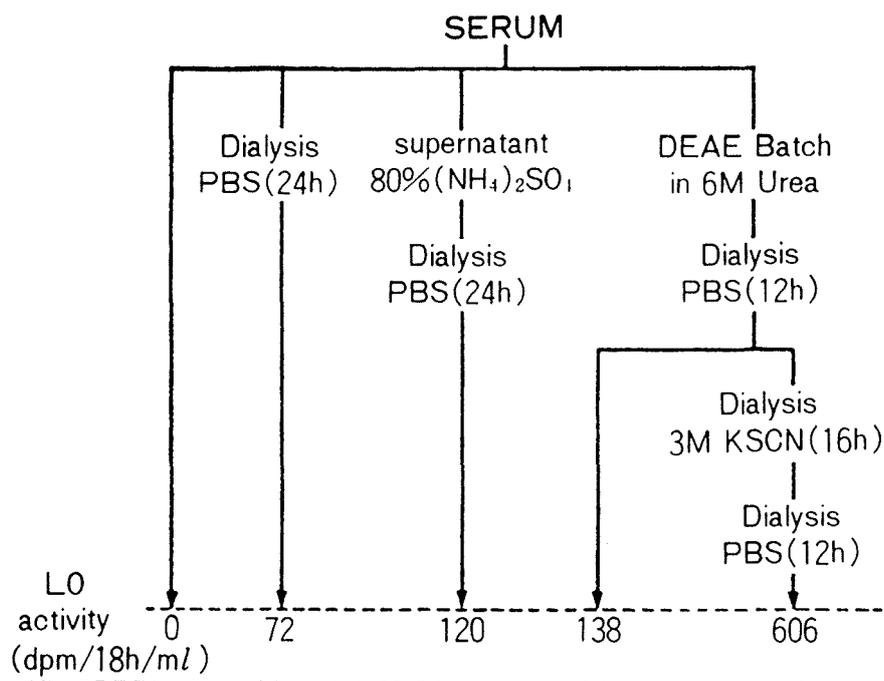


図2 血清処理とlysyl oxidase活性

変動は容易に血中に反映されるものと考えられる。事実、線維肝モデルで血中LO活性が肝LO活性と平行して変動することが示されている<sup>28)</sup>。したがって、血清LO活性の測定は障害肝での肝コラーゲン沈着量を反映する有用な指標となるものと思われる。

しかし、血清中には本酵素の阻害因子が存在するため、血清を直接酵素液として用いても活性はほとんど検出されない。我々は、血清中より6M尿素下でDEAEセルロースbatch法により酵素を分離抽出する操作と阻害因子を3M KSCNで変性不活化する操作を組み合せ、血清LO活性の測定感度および精度を高めることに成功した(図2)<sup>10)</sup>。この方法で測定された血清LO活性の正常値に対する増加率、異常率は(表1)、慢性非活動性肝炎で1.6倍、22%、慢性活動性肝炎で4.4倍、56%、肝硬変で12倍、81%であり、肝硬変で著明に上昇することから血清LO活性が肝コラーゲン沈着量を鋭敏に反映することが示された<sup>10)</sup>。

#### 4. Collagenase

本酵素はmatrix metalloproteinase(MMP)の代表的酵素であり、I、II、III型コラーゲン線維をN末端より3:1の部位で二つに切断する。本酵素には、間質コラーゲナーゼ(MMP-1)と好中球コラーゲナーゼ(MMP-8)がある。両者は分子量、基質に対する親和性、酵素阻害剤などの点で異なっている。間質コラーゲナーゼは線維芽細胞をはじめとする各種の結合組織細胞で生成分泌されるが、好中球コラーゲナーゼは細胞内の顆粒内にプロ酵素あるいは活性型酵素として貯蔵されている。ゲルクロマトでの検討では、血中のコラーゲナーゼは主としてMMP-1由来であることが示されている<sup>24)</sup>。

組織中のコラーゲナーゼ活性は、生理的には成長過程の組織、分娩後の退縮子宮などで、疾患では慢性炎症性疾患での組織修復および線維化過程、悪性腫瘍での浸潤発育時などで増加する。線維肝ではコラーゲン合成亢進とともに、肝コラーゲナーゼ活性が増加している<sup>9)</sup>。したがって、これら病態では組織中に増加したコラーゲナーゼが血中に流出し血中での活性が上昇することが推測される。しかし、血液中には $\alpha 2$ マクログロブリン、TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinases)などのコラーゲナーゼ阻害因子が存在するため、通常

血清を直接酵素液として測定しても活性は検出されない。

近年、測定感度を高めた測定法の開発とともに、血清を3M KSCNで透析し阻害因子を変性不活化し、且つアミノフェニル水銀酢酸で活性化する処置を加えた血清を酵素液とすることにより血清コラーゲナーゼ活性の測定が可能となった。Rajabiら<sup>24)</sup>は分娩後の子宮退縮時には子宮コラーゲナーゼ活性の増加を反映して、血清コラーゲナーゼ活性が分娩前の2倍以上に上昇することを示している。一方、慢性肝疾患で検討した我々の成績では(表1)<sup>13, 17)</sup>、血清コラーゲナーゼ活性は肝病変の進行とともに低下し、従来より報告されている肝組織中でのコラーゲナーゼ活性の増加とは逆の成績であった。この低下は血清TIMP量の増加と有意な負の相関関係を示したことより(図3)<sup>13, 17)</sup>、TIMPによる阻害は今回の前処置では活性化できないことを示している。すなわち、血清TIMPが増加する病態では組織中のコラーゲナーゼ活性の変動が正確に血中に反映されない。ただ、四塩化炭素肝障害では血清コラーゲナーゼ活性は肝での活性と密接に関連しており<sup>18)</sup>、薬物性肝障害では分娩後と同様にTIMPの生成が少なく、血清コラーゲナーゼ活性が肝組織中の活性を反映するものと思われる。

#### 5. TIMP

TIMPは、コラーゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメリシンなどのMMPと化学量論的に1:1で非共有結合し、その活性を特異的かつ不可逆に阻害する<sup>20)</sup>。

TIMPには、分子量28KDの糖蛋白であるTIMP-1と分子量23KDの糖鎖を持たない蛋白であるTIMP-2とが存在する。両者は構造的にも阻害様式でもよく似ており、産生細胞もほぼ同じであるが、一般にTIMP-1の方が量的に多い。TIMP-1とMMPとのKdは $10^{-9} \sim 10^{-11}$ と高い親和性が認められている。TIMPは線維芽細胞を含めた多くのMMP産生細胞で生成される。ヒト肝では伊東細胞も産生することが明らかにされている<sup>21)</sup>。このようにTIMPは、MMPと同じ細胞で生成されること、MMPと親和性が高いことより、組織中でのMMP活性の調節に重要な役割を演じているものと考えられている。

最近血清TIMP-1の免疫学的測定法が開発され

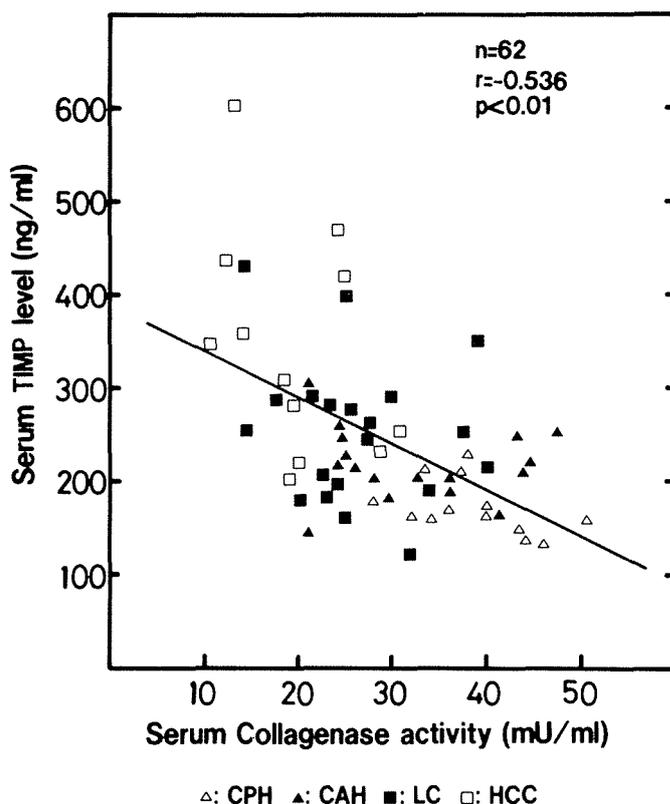


図3 血清コラゲナーゼ活性と血清TIMP量との関係

ており<sup>3)</sup>、コラゲナーゼを含めたMMPの組織中の変動を逆にTIMPの測定によりある程度推測することができる。慢性ウイルス性肝疾患での我々の成績では(表1)、血清TIMPの正常値に対する増加率、異常率は、慢性非活動性肝炎で1.1倍、18%、慢性活動性肝炎で1.3倍、34%、肝硬変で1.5倍、48%であり、肝病変の進行とともに増加し、組織学的肝線維化の程度と密接に関連していた<sup>14, 16)</sup>。したがって、血清TIMP-1の測定は、病変肝でのマトリックスの分解状況を示唆するとともに、肝線維量を反映しているものと考えられる。ただ、肝線維化の診断能は後で述べるIV型コラゲンに比べ劣っていた<sup>16)</sup>。

#### 6. III型プロコラーゲンN末端ペプチド(PⅢNP)、I型コラーゲンC末端ペプチド(PICP)

間質コラーゲンであるI型およびIII型コラーゲンは、まず細胞内でそれぞれのプロコラーゲンとして生成され、細胞外に分泌後、NおよびC末端ペプチドが酵素的に切断されコラーゲン分子となる。この際、切断された末端ペプチドは血中に遊出するので、これら末端ペプチドの測定は、コラー

ゲン合成の指標となる可能性がある。現在、PⅢNP、PICPが臨床応用されている。正常肝では、I型とIII型コラーゲンの割合は1:1であるが、完成された硬変肝ではI型が優位となる。ただ、進行性の線維肝ではIII型が優位となることより、肝線維化病態の把握にはPⅢNPがより有用である。

1979年Rohdeら<sup>26)</sup>により血中PⅢNPの測定法が開発されて以来、各種の肝疾患で肝線維化病態との関連が検討されてきている<sup>1, 23, 25)</sup>。血清PⅢNPは肝線維化の程度と関連しているとの報告もあるが、多くの報告は肝での壊死炎症の程度と密接に関連していることを示している。慢性肝疾患での壊死炎症は線維増生を反映すると考えられる。実際、血清PⅢNP濃度と肝PH活性が密接に相関していることが示されている<sup>31)</sup>。一方、PⅢNPは肝類洞内皮細胞で代謝されることより<sup>29)</sup>、内皮細胞の障害が強いアルコール性肝硬変などでは、そのクリアランスの低下も血清PⅢNP上昇に関与している可能性がある。

血清PⅢNPは当初牛皮膚PIIINPに対するポリクローナル抗体を用いたRIA法で行われていた

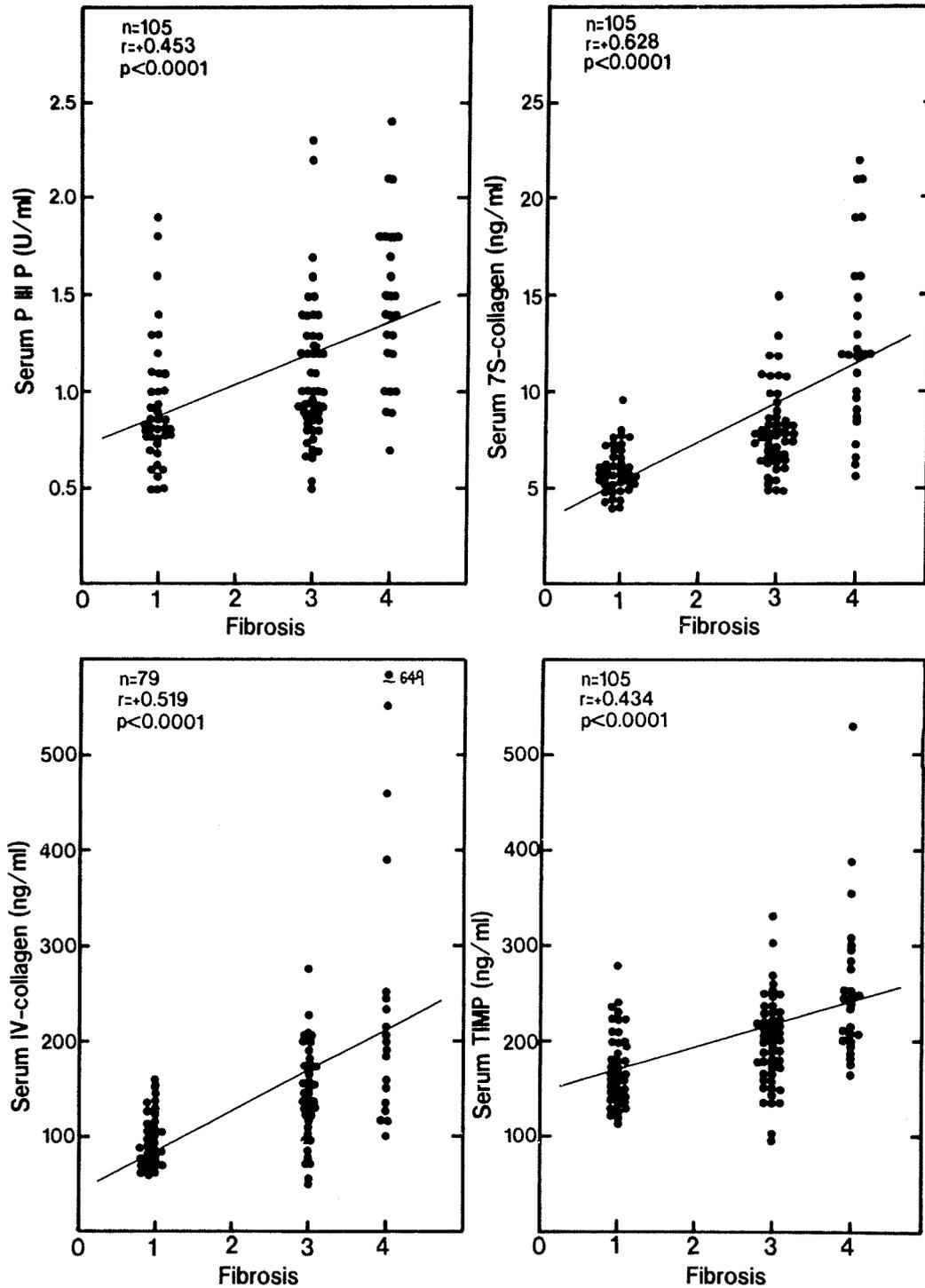


図4 組織学的肝線維化の程度と血清線維化マーカー

が、現在はモノクローナル抗体が利用され、主として非変性P III NPが検出される。この測定法を用いて慢性ウイルス性肝疾患で検討した我々の成績では(表1)<sup>16)</sup>、血清P III NPの正常値に対する増加率、異常率は、慢性持続性肝炎で1.9倍、80%、慢性活動性肝炎で2.3倍、98%、肝硬変で2.9

倍、97%であった。肝生検組織所見との検討では、肝線維化の程度よりも組織学的活動指標とより密接に関連していた<sup>16)</sup>。

PICPは血中半減期が非常に短くその測定は困難であったが、最近ウサギポリクローナル抗体を用いたRIA法が開発されている<sup>5)</sup>。前述したよう

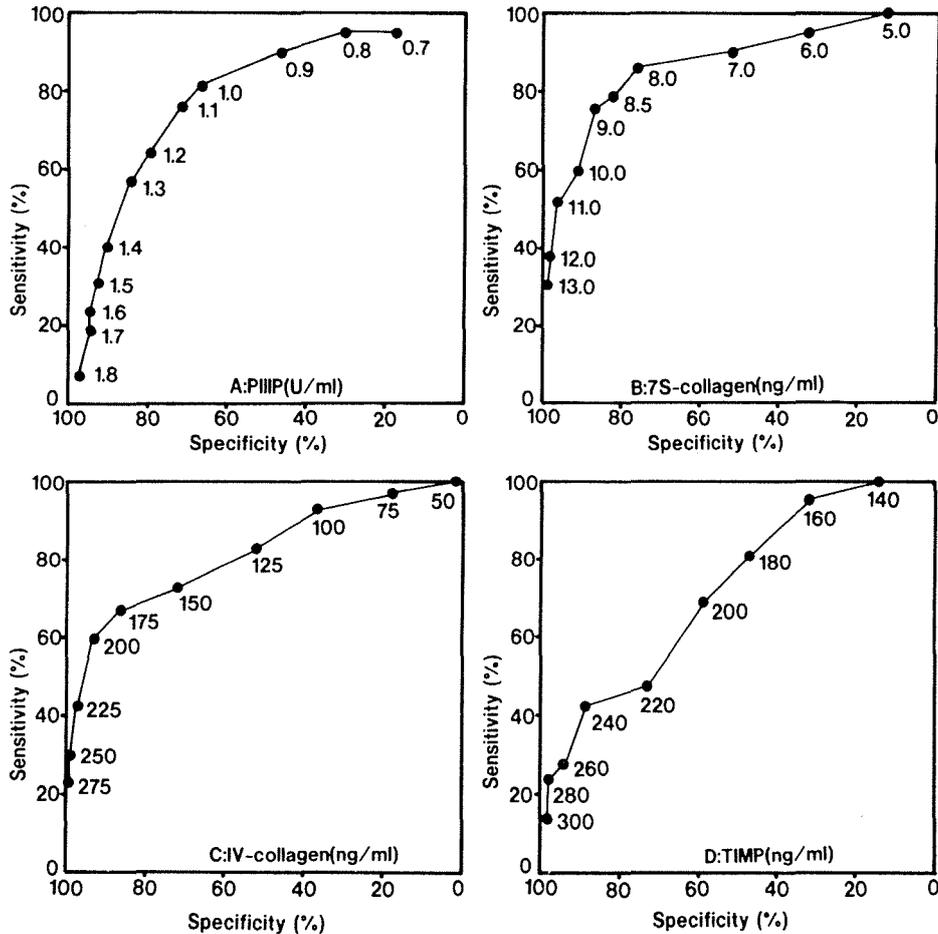


図5 血清線維化マーカーの肝硬変診断能

に、完成された肝硬変ではI型コラーゲンが優位となるが、この場合のコラーゲンの代謝回転は遅く肝線維化の評価には感度が悪いことが予想される。慢性ウイルス性肝疾患で検討した我々の成績でも(表1)、血清PICPは慢性肝炎で正常群と差がなく、肝硬変でもわずかに上昇するのみで、その異常率は16%であった。なお、I型コラーゲンは骨に多量に存在することより、血清PICPは骨代謝の指標として臨床応用されている<sup>25)</sup>。

#### 7. IV型コラーゲン

基底膜の主要成分であるIV型コラーゲン分子はN末端7S領域(7Sドメイン)、中心部三重螺旋領域(THドメイン)、C末端非コラーゲン領域(NC1ドメイン)から成っている<sup>30)</sup>。間質コラーゲンと異なり、IV型コラーゲンでは細胞外に分泌後もNおよびC末端ドメインは切断されることがなく、互いに結合して格子状構造を形成している。すなわち、4分子の7Sドメインが互いにSS結合

し、同時に2分子のNC1ドメインが結合している。正常肝の小葉内には基底膜は存在しないが、線維肝ではその進展とともに類洞周囲に基底膜が形成される。また、肝硬変では小葉を分割する線維性隔壁にもIV型コラーゲンが沈着する。

近年IV型コラーゲンの7Sドメイン<sup>21)</sup>、NC1ドメイン<sup>27)</sup>、THドメイン<sup>22)</sup>の血清中での測定法が開発されている。本邦では7Sドメイン4量体である7Sコラーゲンに対するポリクローナル抗体を用いたRIA法(7S-C)とペプシン可溶性IV型コラーゲンを用いて作製された2種類のモノクローナル抗体(7Sドメイン認識抗体とTHドメイン認識抗体)を使用したサンドイッチEIA(IV-C)が臨床応用されている。慢性肝疾患でこれらIV型コラーゲンの血中濃度は肝疾患の進行とともに増加し、組織学的活動性肝病変よりも肝線維化の程度と密接に関連していることが示されている<sup>1, 25)</sup>。

我々の慢性ウイルス性肝疾患で検討した成績でも(表1)、血清7S-Cの正常値に対する増加率、

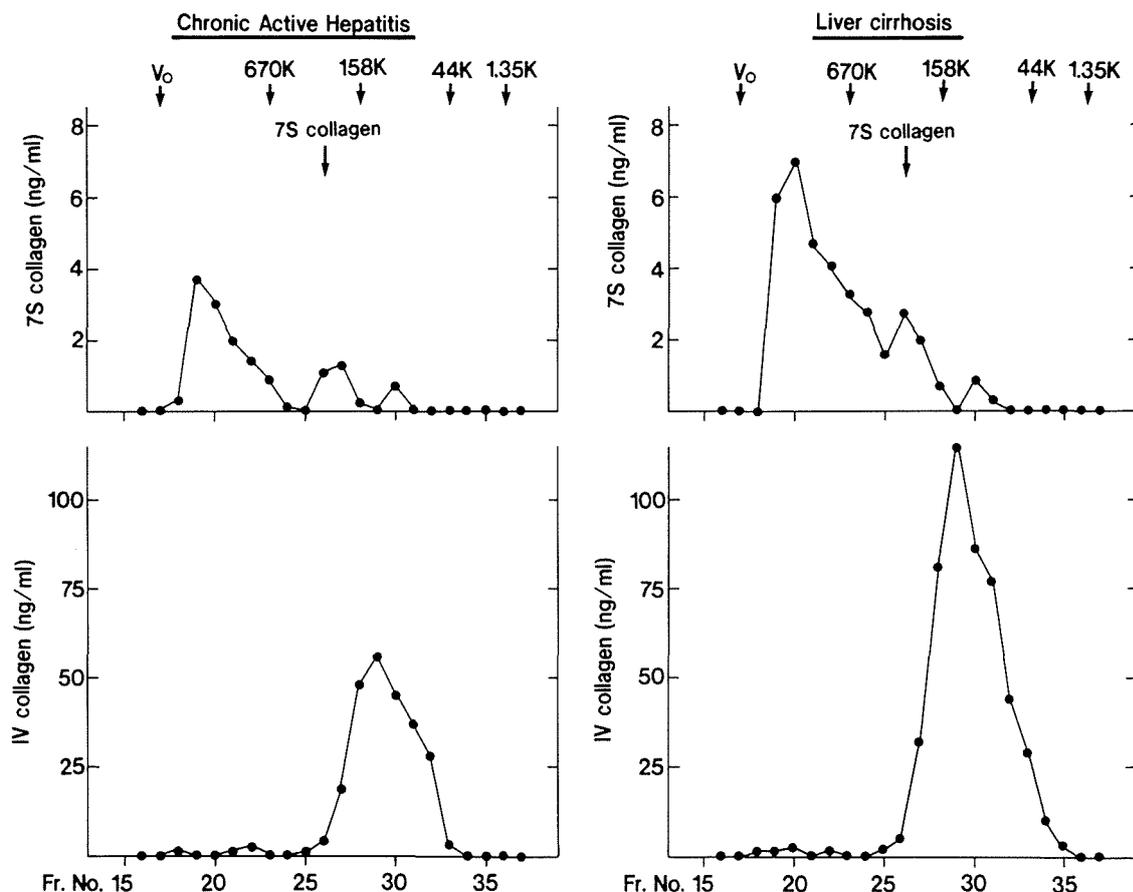


図6 IV型コラーゲン各測定法での血中認識物質

異常率は、慢性持続性肝炎で1.4倍、50%、慢性活動性肝炎で1.9倍、88%、肝硬変で2.8倍、95%であり、血清IV-Cのそれは、慢性持続性肝炎で1.2倍、20%、慢性活動性肝炎で1.8倍、73%、肝硬変で3.0倍、83%であった<sup>16)</sup>。両者とも組織学的肝線維化の程度と有意な相関関係を示したが、その相関係数は7S-Cでより高い値を示した(図4)。また、肝硬変の診断能を7S-C、IV-C、PIII NP、TIMPでROC曲線を用いて比較検討すると、7S-Cが最も有用であった(図5)<sup>16)</sup>。この場合の至適cutoff値は8.5ng/mlであり、感度79%、特異度82%であった。

これらIV型コラーゲン各断片の血中での上昇機序については不明な点も多いが、沈着した組織中IV型コラーゲンの分解の亢進あるいは合成亢進に伴う血中への遊出などが関与しているものと考えられる。セファクリルS400HRゲルクロマトで7S-CおよびIV-C測定法での血中認識物質を検討した我々の成績では、前者は三峰性パターンを、後

者は一峰性を示した(図6)<sup>19)</sup>。

IV-Cはその測定原理より7Sドメインを有するTHドメインを認識すること、更に血中認識物質は単一であることより、主としてIV型コラーゲンの合成を反映しているものと考えられる。一方、7Sドメインの4量体である7Sコラーゲンは理論的には沈着したIV型コラーゲンの分解に由来するものであるが、実際の測定系では7Sコラーゲン自体とともに高分子および低分子の断片を認識していること、更に肝硬変での増加は主として高分子領域のものであることなどより、血清7S-Cも主として合成を反映しているものと考えられる。なお、NC1ドメイン測定系では、NC1ドメイン自体のみを検出しており沈着したIV型コラーゲンの分解を反映すると考えられている<sup>27)</sup>。

#### おわりに

血中線維化マーカーと肝線維化病態との関連および診断能について述べた。現在、これら線維化

マーカーは診断的意義のみであるが、今後肝線維化に対する治療薬の開発にともない、肝線維化の治療効果判定のマーカーとして有用性が高まることが期待される。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました鳥取大学医学部第二内科教授川崎寛中先生に深く感謝申し上げます。また、血清PICPの測定にあたり御協力頂きましたSRL株式会社に御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Gabrielli, G.B., Corrocher, R. (1991). Hepatic fibrosis and its serum markers: A review. *Dig Dis* 9, 303-316.
- 2) Iredale, J.P., Murphy, G., Hembry, R.M., Friedman, S.L., Arthur, M.J.P. (1992). Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1: Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest* 90, 282-287.
- 3) Kodama, S., Iwata, K., Iwata, H., Yamashita, K., Hayakawa, T. (1990). Rapid one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Immunol Methods* 127, 103-108.
- 4) Kuutti-Savolainen, E.-R., Risteli, J., Miettinen, T.A., Kivirikko, K. I. (1979). Collagen biosynthesis enzymes in serum and hepatic tissue in liver disease. *Eur J Clin Invest* 9, 89-95.
- 5) Melkko, J., Niemi, S., Risteli, L., Risteli, J. (1990). Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem* 36, 1328-1332.
- 6) 村垣泰光. (1985). 肝線維化におけるコラーゲン代謝異常の実験病理学的研究. *和歌山医誌* 36, 195-208.
- 7) 村脇義和, 草壁由香, 平山千里. (1989). Lysyl oxidase. *肝胆膵* 18, 433-439.
- 8) Murawaki, Y., Yamada, S., Koda, M., Hirayama, C. (1990). Collagenase and collagenolytic cathepsin in normal and fibrotic rat liver. *J Biochem* 108, 241-244.
- 9) Murawaki, Y., Kato, S., Hirayama, C. (1991). Hepatic collagen synthesis in patients with alcoholic and nonalcoholic liver disease. *Gastroenterol Jpn* 26, 465-471.
- 10) Murawaki, Y., Kusakabe, Y., Hirayama, C. (1991). Serum lysyl oxidase activity in chronic liver disease in comparison with serum levels of prolyl hydroxylase and laminin. *Hepatology* 14, 1167-1173.
- 11) 村脇義和, 川崎寛中. (1993). 肝硬変-線維化. *肝胆膵* 26, 237-247.
- 12) 村脇義和, 川崎寛中. (1993). Lysyl oxidase と肝線維化. *肝臓病学の進歩* 19, 46-52.
- 13) Murawaki, Y., Koda, M., Yamada, S., Kawasaki, H., Shima, H., Burkhardt, H. (1993). Serum collagenase activity in patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 18, 328-334.
- 14) Murawaki, Y., Yamamoto, H., Kawasaki, H., Shima, H. (1993). Serum tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic liver disease and with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 218, 47-58.
- 15) 村脇義和, 孝田雅彦, 川崎寛中. (1994). 細胞外マトリックスの分解. *Mol Med* 31, 190-198.
- 16) Murawaki, Y., Ikuta, Y., Koda, M., Kawasaki, H. (1994). Serum type III procollagen peptide, type IV collagen 7S domain, central triple-helix of type IV collagen and tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic liver disease: Relationship to liver histology. *Hepatology* 20, 780-787.
- 17) Murawaki, Y., Kawasaki, H., Burkhardt, H. (1994). Serum collagenase activity in chronic liver disease. *Pathol Res Pract* 190, 929-933.
- 18) Murawaki, Y., Yamamoto, H., Koda, M., Kawasaki, H. (1994). Serum collagenase activity reflects the amount of liver collagenase in chronic carbon tetrachloride-treated rats. *Res Commun Pathol Pharmacol* 84, 63-72.

- 19) Murawaki, Y., Ikuta, Y., Koda, M., Yamada, S., Kawasaki, H. Comparison of serum 7S fragments of type IV collagen and serum control triple-helix of type IV collagen for assessment of liver fibrosis in patients with chronic viral liver disease. (in preparation)
- 20) Murphy, G., Docherty, A.J.P. (1992). The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 120-125.
- 21) Niemela, O., Risteli, L., Sotaniemi, E. A., Risteli, J. (1985). Type IV collagen and laminin-related antigens in human serum in alcoholic liver disease. *Eur J Clin Invest* 15, 132-137.
- 22) Obata, K., Iwata, K., Ichida, T., Inoue, K., Matsumoto, E., Muragaki, Y., Ooshima, A. (1989). One-step sandwich enzyme immunoassay for human type IV collagen using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* 181, 293-304.
- 23) Plebani, M., Rurlina, A. (1991). Biochemical markers of hepatic fibrosis. *Clin Biochem* 24, 219-239.
- 24) Rajabi, M., Dean, D.D., Woessner, J. F. (1987). High levels of serum collagenase in premature labor: A potential biochemical marker. *Obstet Gynecol* 69, 179-186.
- 25) Risteli, L., Risteli, J. (1990). Noninvasive methods for detection of organ fibrosis. *Connective Tissue in Health and Disease*, pp61-98, CRC Press, Boca Raton.
- 26) Rohde, H., Vargas, L., Hahn, E., Kalbfleisch, H., Bruguera, M., Timpl, R. (1979). Radioimmunoassays for type III procollagen peptide and its application to human liver disease. *Eur J Clin Invest* 9, 451-459.
- 27) Schuppan, D., Besser, M., Schwartig, R., Hahn, E.G. (1986). Radioimmunoassay for the carboxy-terminal cross-linking domain of type IV (basement membrane) procollagen in body fluids. *J Clin Invest* 78, 241-248.
- 28) Siegel, R.C., Chen, K.H., Greenspan, J.S., Aguiar, J.M. (1978). Biochemical and immunochemical study of lysyl oxidase in experimental hepatic fibrosis in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 2945-2949.
- 29) Smedstrod, B. (1988). Aminoterminal propeptide of type III procollagen in cleared from the circulation by receptor-mediated endocytosis in liver endothelial cells. *Collagen Rel Res* 8, 357-358.
- 30) Timpl, R. (1989). Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* 180, 487-502.
- 31) Torres-Salinas, M., Pares, A., Caballeria, J., Jimenex, W., Heredia, D., Bruguera, M., Rodes, J. (1986). Serum procollagen type III peptide as a marker of hepatic fibrogenesis in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 90, 1241-1246.
- 32) Yoshida, S., Bai, Y., Muragaki, Y., Ooshima, A., Inada, K., Nagai, Y., Obata, K. (1986). A sandwich immunoassay for human prolyl 4-hydroxylase using monoclonal antibody. *Clin Chim Acta* 160, 37-46.