

氏名(本籍)	にの みや はる ひこ 二 宮 治 彦 (愛媛県)				
学位の種類	医 学 博 士				
学位記番号	博 乙 第 471 号				
学位授与年月日	昭和63年9月30日				
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当				
審査研究科	医 学 研 究 科				
学位論文題目	Decay-accelerating factor (DAF) on the blood cell membranes in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) : measurement by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (発作性夜間血色素尿症における血球膜上の decay-accelerating factor (DAF) : 酵素免疫測定法による測定)				
主 査	筑波大学教授	医学博士	田 村	昇	
副 査	筑波大学教授	医学博士	岩 崎	寛 和	
副 査	筑波大学教授	医学博士	柏 木	平 八 郎	
副 査	筑波大学教授	医学博士	東	恵 彦	
副 査	筑波大学教授	医学博士	三 澤	章 吾	

論 文 の 要 旨

〈目 的〉

Decay-accelerating factor (DAF) は補体制御活性を有する膜蛋白で、補体の反応過程でできる C 3 / C 5 分解合体酵素を解離失活させる。

発作性夜間血色素尿症 (paroxysmal nocturnal haemoglobinuria : PNH) は、その赤血球が補体に対し強い感受性を有する後天性の溶血性貧血であり、赤血球膜における DAF の欠損がその原因であるとされている。

本研究では、DAF の測定法として新たに開発した簡便な酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) の詳細を記載し、健常人、PNH、他の貧血性疾患での測定結果を示し、PNH における DAF 測定の臨床的意義について考察した。

〈対象及び方法〉

対象：健常人30例、PNH 8例、その他の貧血13例を対象とした。

血球の分離：クエン酸ソーダ加血液25mlから血小板血漿を分離。続いて、赤血球を遠心分離により得、さらに好中球と単核球に分離した。好中球分画に混入した赤血球は低張性溶血によって除去した。

細胞抽出液作成：赤血球： 2×10^9 の赤血球を1% NP-40, 50 $\mu\text{g/ml}$ Suc (OMe) -Ala-Ala-Pro-Val-MCA (合成エステラーゼ阻害剤), 1mM PMSF を含む PBS 500 μl で抽出し高速遠心にて不溶物を除き -80°C に凍結保存した。好中球： $2 - 9 \times 10^7$ の好中球を1% NP-40, 50 $\mu\text{g/ml}$ エラスターゼ阻害剤, 1mM PMSF, 5 $\mu\text{g/ml}$ ソイビントリプシンインヒビター, 100 U/ml トラジロールを含む PBS 150 μl で抽出, 同様に凍結保存。血小板： $2 - 10^8$ の血小板を1% NP-40と蛋白分解酵素阻害剤を含む PBS 300 μl で抽出, 同様に凍結保存。

DAFの純化：DAFはプールのしたヒト赤血球膜より Nicholson-Weller らの方法を一部改変して純化した。

抗 DAF モノクローナル抗体の作成：3種の抗 DAF モノクローナル抗体 (IC 6, 4 F 11および5 B 2;マウス IgG1) を使用した。

抗 DAF抗体 (IC 6) のビオチン標識：Bayer らの方法に基づいてビオチン標識し 0°C に保存。

酵素免疫測定法 (ELISA)：96穴のプラスチックプレートに抗 DAF 抗体 (4 F 11 + 5 B 2：各10 $\mu\text{g/ml}$) 100 μl でコート, 4°C 終夜放置。洗浄用緩衝液 (10 mM EDTA, 0.05% Tween-20を含む PBS) でウェルを洗浄後, 1% 牛血清アルブミン溶液と 37°C で1時間反応させた。洗浄後, 1 : 6, 1 : 10, 1 : 15に希釈した細胞抽出液50 μl をウェルに加え, 37°C , 2時間の反応後, 洗浄し, ビオチン標識 IC 6 (500ng/ml) を100 μl 加え, 37°C で1時間反応させた。次に洗浄後, アビジン・ビオチン複合体100 μl を各ウェルに加え, 30°C で1時間反応, 洗浄後, 基質として ABTS を加え1時間反応後, 各ウェルの吸光度 (414 nm) を測定した。標準線は純化 DAF (180 $\mu\text{g/ml}$) を1 : 400 - 1 : 4000の数段階に希釈したものにより得た。各実験は duplicate で行なった。

DAF 値の計算：各ウェルに加えた細胞数と標準線から求めた DAF の絶対量から細胞一箇当りの DAF 分子数を計算した。DAF の分子量を70 kDa として計算した。

PNH- I の DAF 値：分離前の PNH 赤血球の DAF 値と補体感受性試験で得た PNH- I の比率から, PNH- III の DAF 値を0として計算した。また, 4例においては, 酸溶血後の赤血球の DAF 値を直接 ELISA 法にて測定した。対照として正常人赤血球についても酸溶血後の赤血球の DAF 値を測定した。

《結果と考察》

ELISA の信頼性測定範囲：DAF 2.25-11.25 ng の量の範囲で吸光度との間に直線関係が得られた。

DAF 値 (単位：分子数/細胞)：

健常人：赤血球 3110 ± 960 (mean \pm SD, $n = 30$), 好中球 28000 ± 13900 (mean \pm SD, $n = 15$), 血小板 3100 ± 1370 (mean \pm SD, $n = 15$)。

PNH：赤血球の DAF 値は 1390 ± 900 (mean \pm SD, $n = 8$)。健常人に比べ有意な低値を示した ($P < 0.01$)。好中球および血小板についても低値を示すものが多く認められた。

貧血症患者 (PNH を除く)：赤血球 DAF は 3090 ± 800 (mean \pm SD, $n = 13$) で健常人と有意な差を認めなかった ($P > 0.05$)。

DAF 値と補体感受性：Ham 試験及び蔗糖水試験における溶血率の高いもの, PNH- III 赤血球の比

率の高いものほど DAF 値の低い傾向が認められた。

PNH-I 赤血球の DAF 値：計算から求めた DAF 値は低値を示すものが多く（7 例中 5 例）、酸溶血後の赤血球 DAF 値も低値を示すものが認められた（4 例中 2 例）。

DAF の測定法としてはフローサイトメトリーや放射性同位元素を用いる方法などがあるが、それらに比べて ELISA による DAF の測定法は簡便である。DAF の測定は PNH の診断法としては必ずしも敏感ではないが、血球膜に欠損を有する血球の増加の評価に有用な方法であると考えられる。

審 査 の 要 旨

発作性夜間血色素尿症（PNH）患者の血球には種々の異常がみられる。補体反応の阻害因子として赤血球膜上に見出された DAF、分子量 7 万の糖蛋白の欠損もその一つである。本研究は、この DAF に対する単クローン性抗体を用いて DAF 定量のための簡便な測定法を開発し、PNH 患者などの赤血球、好中球、血小板についてその DAF 量を測定したものである。PNH 患者血球の DAF 量は予測通りに低下していたが、患者の赤血球のうち正常と考えられている I 型の赤血球についてもその DAF 量が低下していた。これらの結果は、この DAF 測定法の簡便さと相俟ち、臨床研究として十分に評価できるものである。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。