

| | |
|-----------|--|
| 氏 名(本 籍) | とみ やま じゅん じ 富 山 順 治 (東 京 都) |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 博 乙 第 719 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 3 年 10 月 31 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 | Enhanced complement-susceptibility and dysfunction of lymphocytes in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) (発作性夜間血色素尿症 (PNH) リンパ球の補体感受性の亢進と機能異常) |
| 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 柏 木 平 八 郎 |
| 副 査 | 筑波大学教授 医学博士 杉 田 良 樹 |
| 副 査 | 筑波大学教授 医学博士 中 井 利 昭 |
| 副 査 | 筑波大学教授 医学博士 林 英 生 |

論 文 の 要 旨

〈目 的〉

発作性夜間血色素尿症 (以下PNH) は、赤血球の同種補体に対する感受性の亢進を特徴とした後天性溶血性貧血である。PNH患者では、赤血球のみならず顆粒球、血小板にも補体感受性の亢進が証明されている。この補体感受性の亢進は細胞膜上の補体制御膜蛋白であるdecay-accerelating factor (以下DAF) の欠損と密接な関連性があることが明らかになってきた。しかし、PNHリンパ球の機能異常や膜の異常については十分に解明されていない。本研究では、PNH患者のリンパ球にも補体に対する感受性の亢進が認められるか、そしてその亢進が細胞膜上のDAF量に関係しているか、などについて検討した。さらに種々のレクチンに対する反応性を指標として、PNH患者のリンパ球の機能についても検討した。

〈対象と方法〉

PNH患者 5 人を対象とし、年齢相当の健常人 5 人を対照とした。T、B細胞分離は末梢血MNC (1×10^7) に $10 \mu\text{g/ml}$ の phycoerythrin (PE)-conjugated T101 (CD5) と、 $10 \mu\text{g/ml}$ の fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated B1 (CD20) を反応させ、FACSIVで 1×10^6 ケの T細胞と B細胞を得た。リンパ球補体溶解試験は、 $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した T または B細胞 $50 \mu\text{l}$ にそれぞれ T101 と B1 $50 \mu\text{l}$ を作用させ 0°C 、40分反応。また、T または B細胞に抗DAF抗体 (1 C6 : $50 \mu\text{g/ml}$) を作用させ、 0°C 、40分反応させた。その後 1 倍、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍に希釈した家兎補体 $200 \mu\text{l}$ を

加え5%CO₂下で37°C, 90分反応させ、溶解率をtrypan blueによるdye exclusion testにより算出した。T, B細胞上のDAF陽性率はFACSを用い、抗DAF抗体とT101, B1のモノクローナル抗体によるtwo-color分析で測定した。リンパ球DAF量は二宮が報告したELISA法 (Br. J. Haematol, 1988)で測定し、molecules/cellで表した。リンパ球のレクチン刺激に対する反応は、MNCを 2×10^6 /mlとし、2.5 μ g/mlのPHA-P, 10 μ g/mlのCon A, 10 μ g/mlのPWM, 100 μ g/mlのLPSを添加し、37°C 5%CO₂下で72時間培養、終了20時間前に³H-thymidine (185GBq/mmol) を添加、放射活性を測定した。Stimulation index (S. I.) は刺激リンパ球cpm/非刺激リンパ球cpmで表した。また、健常人MNC (2×10^6 /ml) に抗DAF抗体を作用させPHA, Con Aに対する反応を検討した。有意差検定にはStudent's unpaired t-testを用いた。

〈結 果〉

リンパ球補体溶解試験では、PNH患者のTおよびB細胞は健常人に比し有意に補体感受性が亢進していた。抗DAF抗体処理リンパ球ではPNHおよび健常人T, B細胞ともに、さらに補体感受性の亢進が認められた。ELISA法で測定したPNH患者MNCのDAF量は 6600 ± 2610 molecules/cellと、健常人MNC DAF量の 13800 ± 2880 molecules/cellに比し有意に低値を示した。MNCのtwo-color分析では、PNH患者T細胞のDAF陽性率は $81.2 \pm 10.2\%$ と、健常人T細胞の $90.4 \pm 4.1\%$ に比し有意に低く、PNH患者B細胞のDAF陽性率も $84.2 \pm 9.1\%$ と、健常人B細胞の $99.4 \pm 0.4\%$ に比し有意に低値を示した。PNH患者MNCのPHA, Con A刺激に対するS. I.は、 7.9 ± 3.1 , 10.1 ± 4.4 と、健常人MNCの 22.7 ± 4.5 , 20.2 ± 1.7 に比し有意に低値を示したが、PNH患者MNCのPWMとLPS刺激に対するS. I.は 3.4 ± 1.9 , 2.8 ± 1.0 で健常人MNCの 4.2 ± 1.3 , 3.4 ± 1.7 と有意差は認められなかった。また、健常人MNCを抗DAF抗体で処理すると、PHA, Con A刺激に対するS. I.はそれぞれ25.5が15.3に、23.9が11.8に低下した。

〈考察と結論〉

本研究ではPNHリンパ球はT, B細胞とも健常人リンパ球に比し有意に高い補体感受性を示したことや、健常人リンパ球とPNHリンパ球を抗DAF抗体で前処理することにより補体感受性がさらに亢進したことは、PNHリンパ球の補体感受性の亢進はDAF量の低下と関連性があるものと推察され、DAFはリンパ球の補体による細胞障害を軽減する働きをしていることが示唆された。PNH患者MNCのDAF量は健常人に比し有意に低下していたが、PNH患者のTおよびB細胞のDAF陽性率は若干低下していたにすぎない。この結果は、PNH患者MNCに約30%含まれている単球な著名なDAF欠損によるものと思われる。PNHリンパ球はPHAやCon Aに対する反応性が低下していたが、PWMやLPSに対する反応性は低下していなかったことより、PNH患者T細胞の機能障害の存在が示唆された。また、健常人リンパ球を抗DAF抗体で処理するとPHAやCon Aに対する反応性の低下が認められたことは、PNH T細胞のレクチン刺激に対する反応性の低下は、DAFの減少によるものと推察される。

審 査 の 要 旨

発作性夜間血色素尿症 (PNH) は、赤血球の自己補体に対する感受性の亢進を特徴とする溶血性疾患であり、これまで赤血球、血小板、顆粒球について補体感受性の亢進が証明されてきている。本研究は、リンパ球についても補体感受性の亢進がみられることを明らかにし、かつ、それが赤血球の場合と同様にdecay-accelerating factor (DAF) の欠損によることを明らかにしたもので、臨床的に価値ある研究といえよう。本研究ではさらに、PNH患者のTリンパ球に軽度ではあるが機能低下のみられること、そしてこの機能の低下がリンパ球表面上のDAF減少と関連していることを示唆する結果も得られている。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。