The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	末梢リンパ球におけるステロール合成の制御およびそれを用いた家族性高コレステロール血症の診断
Author(s)	原, 斉
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33951
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【27】

氏名・（本籍）	原（はら）　斉（ひとし）
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　6407　号
学位授与の日付	昭和59年3月24日
学位授与の要件	医学研究科　内科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**末梢リンパ球におけるステロール合成の制御およびそれを用いた家族性高コレステロール血症の診断**
論文審査委員	（主査） 教　授　垂井清一郎 （副査） 教　授　阿部　裕　教　授　田中　武彦

論文内容の要旨

（目　的）

家族性高コレステロール血症（FH）は，細胞のlow density lipoprotein（LDL）に対するreceptor（LDL－receptor）の異常によりLDLの異化が障害されている疾患で，血清chol高値，腱黄色腫，角膜輪などを特徴とし，若年より動脈硬化をおこし，心筋梗塞による死亡率も高いので，早期よりの治療が必要である。FHは，臨床所見のみから診断するのが難かしい例も多く，現在，確定診断には，患者の培養皮膚fibroblastにつき，LDL－receptor活性を^{125}I－LDLを用いて測定する繁雑な方法が必要とされている。

そこで本研究では，皮膚よりも容易に得られ，長期間の培養を要しない末梢血リンパ球において，LDLによるステロール合成の抑制を測定することにより，FHの診断を検討した。また，fibroblastと異なり，末梢リンパ球にはT，B細胞が種々の割合で混ざっているため，T，B細胞の差異についても同時に検討した。

（方　法）

1）リポ蛋白分離；Havelらの方法により，日立工機製55P－7超遠心機を用いて，LDL（d＝1.019－1.063）およびlipoprotein deficient serum（LPDS，d＞1.21）を採取した。LDL，LPDSは蛋白量で表示した。

2）末梢リンパ球の分離・培養；FHおよび正常人のヘパリン加静脈血約30mℓよりBoyumの方法で単核球を分離し，RPMI 1640（LPDS 5mg／mℓ含）に懸濁し，5％CO_2 incubator中で培養した。

3）T，Bリンパ球の分離・培養；正常人のACD血，あるいはヘパリン加静脈血よりKAC－2（silica

suspension）を用いて monocyte を除去し，Boyumの方法でリンパ球を分離後，さらに neuraminidase 処理羊赤血球と incubation 後，density gradient centrifuge により T，B 分画に分離した。T細胞は autologous plasma を用いて羊赤血球を融解させることにより回収した。T，B細胞の検定は，E－rosette，OE－αIg－rosette 法により行なった。本実験のT細胞分画では，E－rosette 92.6±6.8％，OE－αIg－rosette 4.7±2.8％，B細胞分画ではおのおの 2.9±1.9％，59.2±19.7％ であった。各分画において，peroxidase あるいは esterase 染色により検出される monocyte は，0.5％以下であった。培養は RPMI 1640（5㎎／mℓ LPDS 含）で行なった。

4）ステロール合成活性の測定；リンパ球を培養後（2－5×10^6個／2.5mℓ medium），〔^{14}C〕－acetate を1μCi／mℓになるように添加し，3時間37℃で incubate し，遠心分離（4℃，1700rpm，5分）により細胞を回収し，冷生食水で洗浄後，20％ KOH，50％ethanol 液中75℃，2時間加水分解し，氷冷後 petroleum ether でステロールを抽出し，乾固後，digitonin および carrier として cholesterol を加え沈澱させ，ワットマン CTF／c glass filter を用いて沈澱を回収し，液体シンチレーションカウンターで，その radioactivity を測定した。

5）^{125}I－LDL による LDL－receptor mediated degradation の測定；LDL の iodination は ICI法によった。リンパ球約10^6個をRPMI 1640（5㎎／mℓ LPDS 含）で48時間培養後，^{125}I－LDL 10μg／mℓ あるいは，^{125}I－LDL 10μg／mℓ＋cold LDL 100μg／mℓ を加え，5時間37℃で incubation した後 mediumを分離し（4℃，1700rpm，5分）10％trichloro acetate 溶液とし，沈澱を除去後 chloroform で free iodine を除去し，medium 中の acid soluble materials の radioactivity を測定し，cold LDL を入れないときの値から cold LDL を入れたときの値を差し引き，LDL－receptor mediated degradation とした。

（成　績）

正常人（3人）のT，B細胞を lipoprotein を含まない medium 中で57時間培養した後のステロール合成活性は，それぞれ 1.41±0.16（mean ±sd），1.52±0.20 cpm（〔^{14}C〕－sterol）／㎎（cell protein）・3 hrs と両者に差は認めなかった。

T，B細胞を48時間 lipoprotein を含まない medium 中で培養後 LDL を 0，5，10，20 μg／mℓになるように加え，さらに9時間培養し，LDL によるステロール合成の抑制をみたところ，両者で同等の抑制を呈した。

さらに，^{125}I－LDL を用いて，正常人（2人）より採取したT，B細胞による LDL－receptor mediated degradation をみた。48時間 lipoprotein を含まない medium で培養したときの活性は，T細胞で 30.0，61.3（平均45.6）ng（^{125}I－LDL）／mg（cell protein）・hour，B細胞で 142.3，60.6（101.5）と両細胞共に LDL－receptor が存在していた。

FH heterozygote（5人）と正常（6人）でリンパ球を採取し，48時間培養し，LDL 0，2，5，10，20 μg／mℓ になるように加え，さらに12時間培養したあと，ステロール合成活性を測定した。FH と正常人ではステロール合成の抑制に明らかな差が認められた。活性を50％抑制する LDL 濃度は，FH heterozygote で13.1±3.7 μg／mℓ，正常人で 6.5±2.3 μg／mℓ（P＜0.01）であった。

（総　　括）

① T，B両細胞共に，LDL－receptor を有し，LDL によるステロール合成活性の抑制は同等である。

② FHと正常人において，T，B両細胞を含むリンパ球のステロール合成に対するLDLによる抑制を測定することにより，FHの細胞学的診断が可能である。

論文の審査結果の要旨

本研究は末梢リンパ球を用いて，家族性高コレステロール血症（FH）を診断する方法を検討したものである。

まず，末梢TおよびB細胞を分離し，リポ蛋白除去培地で培養した後ではステロール合成能およびLDL（low donsity lipoprotein）によるその抑制に両細胞間で差が認められないことを明らかにした。次にT，B細胞が混在する末梢血リンパ球を用いLDLによるステロール合成の抑制を測定したところ，50％の抑制を実現するLDL濃度はFHのヘテロ接合体では13.1±3.7 μg／mℓ，正常対照では6.5±2.3 μg／mℓであり，本法によりFHの診断が可能であることが判明した。

採取が容易な末梢リンパ球でFHの診断を行ないうることを示した点，学位に値する業績と判断される。