



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/33951">https://hdl.handle.net/11094/33951</a>                                                             |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

|         |                                                   |           |
|---------|---------------------------------------------------|-----------|
| 氏名・(本籍) | はら<br>原                                           | ひとし<br>齊  |
| 学位の種類   | 医                                                 | 学 博 士     |
| 学位記番号   | 第                                                 | 6 4 0 7 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<br>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<br>家族性高コレステロール血症の診断 |           |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教 授 垂井清一郎<br>(副査)<br>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  $^{125}\text{I}$ -LDL を用いて測定する複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%  $\text{CO}_2$  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- $\alpha$ Ig-rosette 法により行なった。本実験のT細胞分画では、E-rosette  $92.6 \pm 6.8\%$ , OE- $\alpha$ Ig-rosette  $4.7 \pm 2.8\%$ , B細胞分画ではおのおの  $2.9 \pm 1.9\%$ ,  $59.2 \pm 19.7\%$  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 (5mg/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 ( $2-5 \times 10^6$ 個/2.5ml medium), [ $^{14}\text{C}$ ]-acetate を  $1 \mu\text{Ci/ml}$  になるように添加し、3時間  $37^\circ\text{C}$  で incubate し、遠心分離 ( $4^\circ\text{C}$ , 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  $75^\circ\text{C}$ , 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)  $^{125}\text{I}$ -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 (5mg/ml LPDS 含) で 48時間培養後、 $^{125}\text{I}$ -LDL  $10 \mu\text{g/ml}$  あるいは、 $^{125}\text{I}$ -LDL  $10 \mu\text{g/ml}$  + cold LDL  $100 \mu\text{g/ml}$  を加え、5時間  $37^\circ\text{C}$  で incubation した後 medium を分離し ( $4^\circ\text{C}$ , 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  $1.41 \pm 0.16$  (mean  $\pm$  sd),  $1.52 \pm 0.20$  cpm ( $^{14}\text{C}$ -sterol)/mg (cell protein)  $\cdot$  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,  $20 \mu\text{g/ml}$  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、 $^{125}\text{I}$ -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 ( $^{125}\text{I}$ -LDL)/mg (cell protein)  $\cdot$  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,  $20 \mu\text{g/ml}$  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  $13.1 \pm 3.7 \mu\text{g/ml}$ , 正常人で  $6.5 \pm 2.3 \mu\text{g/ml}$  ( $P < 0.01$ ) 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 density 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  $13.1 \pm 3.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 正常対照では  $6.5 \pm 2.3 \mu\text{g}/\text{ml}$  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。