

Title	ヒト腓ホスホリパーゼA2の精製とラジオイムノアッセイ法の確立
Author(s)	西嶋, 準一
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34756
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【29】

氏名・（本籍）	にし 西	じま 巖	じゆん 準	いち 一
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6545	号	
学位授与の日付	昭和59年5月29日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	ヒト膵ホスホリパーゼA ₂ の精製とラジオイムノアッセイ法の確立			
論文審査委員	(主査)			
	教授	森	武貞	
	(副査)			
	教授	山野	俊雄	教授 宮井 潔

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

膵ホスホリパーゼA₂ (PLA₂) は生体膜を構成するリン脂質を基質とし、細胞毒性を有するリゾリン脂質と脂肪酸を遊離する。急性膵炎では血清中の酵素活性が上昇し、血清中には生理的阻害物質も無いことから膵炎の発生、増悪、合併症の併発に本酵素は重要な役割を果たしていると考えられている。

そこで膵PLA₂の性質を明らかにするためにヒト膵液より精製を行なった。また従来の酵素化学的方法による血清中の活性測定法は手技が煩雑で、長時間を要し、急性腹症である急性膵炎の診断、予後の判定などには不適當であった。そこで簡便かつ迅速に血中濃度を測定しうるラジオイムノアッセイ法(RIA)を確立した。

(方法ならびに成績)

I ヒト膵PLA₂の精製

膵頭十二指腸切除術を受けた十二指腸膨大部癌患者の外膵液瘻より集めた膵液(350 ml)を5 mM酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0)に透析後、凍結乾燥を行なった。さらに60℃で5分間の熱処理を加えた。上清画分を2 M NaCl存在下に、50 mM酢酸ナトリウム(pH 5.0)で平衡化したOctyl-Sepharose columnに吸着させ、イオン強度を下げ、酵素を溶出させた。つぎに10 mMのMESバッファー(pH 6.0)で平衡化したCM-Sepharose columnに活性画分を吸着させ、0～500 mM NaClの直線濃度勾配をかけ、酵素を溶出させた。

得られた活性画分はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動上、単一のバンドを示し、分子量は14,000と推定された。比活性は100 μmol/min/mgであり、1.8 mgの酵素が得られた。精製は150倍で、20%

の収率であった。

本酵素は厳密な位置特異性を示し、リン脂質の2位のエステル結合のみを分解した。

至適pHは8.5～9.0であり、酵素活性の発現には Ca^{2+} が必須であった。界面活性剤により酵素活性の上昇があり、3.6 mM Na-deoxycholateと2 mM CaCl_2 の存在下で最大活性を示した。

精製蛋白をFreund's complete adjuvantとともに家兎に反復皮下注射し、抗血清を得た。Ouchterlony's double immunodiffusion test及びImmunoelectrophoresisにより、ヒト膵 PLA_2 とブタ膵 PLA_2 は部分的な免疫交叉性を有することが明らかになった。

II RIAによるヒト膵 PLA_2 の測定

Hunter & Greenwoodのchloramine-T法によって、 ^{125}I を精製酵素に標識し、Sephadex G-25 columnにより標識蛋白を精製した。

RIAの緩衝液には0.2% BSA, 5 mM EDTAと0.1% NaN_3 を含む10 mM phosphate buffered salineを用いた。 10^4 倍に希釈された抗ヒト膵 PLA_2 血清に、試料血清と標識酵素を同時に加え、室温で2時間、第一反応を行なった。つぎに、山羊抗家兎ガンマグロブリン血清(40倍希釈)と15% polyethylene glycolを加え、室温にて10分間、第二反応を行なった。3,000 RPM, 30分間の遠沈によりB-F分離後、沈渣の放射活性をガンマカウンターで測定した。

ヒト膵 PLA_2 のRIAの標準曲線は、急性膵炎患者血清及び健康成人血清の希釈曲線とよく平行し、測定範囲は0.5～1,000 ng/mlであった。

本RIA系に使用した抗血清は、他のヒト膵酵素及び他種の哺乳動物血清に対して全く交叉性を示さず、本RIA系はヒト膵 PLA_2 に対し特異性を有していた。

本RIA系のアッセイ間変動は2.4%、アッセイ内変動は9.1%であり、回収率は90%であった。

健康成人15名の血清 PLA_2 値は2.0～7.9 ng/mlの間に存在し、平均値は5.1 ng/ml (S.D.: 1.7)であった。種々の疾患々者147名の血清を測定した結果、急性膵炎では20例中19例が $\text{mean} + 2\text{S.D.}$ を越え、特に死亡例では異常高値を示した。慢性膵炎では増悪期に高値となった。膵癌や胆道疾患でも若干の高値を示し、膵炎の合併を疑わせた。膵全摘例で感度以下となり、臨床上膵疾患を合併していない慢性腎不全患者で高値を示すことから、本酵素は膵より血中へ逸脱し、尿へ排泄されることが推測された。

(総括)

ヒト膵液より膵 PLA_2 を精製し、血清中の酵素量測定のためのRIA法を確立した。

1) 本酵素は分子量約14,000で、活性発現には Ca^{2+} が必須であり、至適pHは8.5～9.0であった。酸性下では強い耐熱性を有した。また界面活性剤は酵素活性を上昇させた。

2) 本RIA系は高感度で再現性に富み、かつ特異性があり、短時間で操作された。

3) 健康成人の血清中の膵 PLA_2 値は2.0～7.9 ng/mlに存在し、平均5.1 ng/mlで、急性膵炎において有意の上昇を示すことがわかった。

論文の審査結果の要旨

本論文は、ヒト膵液より新しい方法で膵phospholipase A₂を精製し、血清中の本酵素量を測定するためのラジオイムノアッセイ系を初めて確立したものである。これを用いて正常血清中にもimmunoreactive膵phospholipase A₂が存在すること、急性膵炎患者でそれが著明に上昇することを明らかにしている。

本測定法は急性膵炎の診断、治療方針の決定、予後の判定などに直ちに應用しうるものであり、医学博士の学位を授与する価値のある論文と認める。