



Title	A New Method of Purification and Sensitive Bioassay of Platelet-Activating Factor (PAF) in Human whole Blood.
Author(s)	篠崎, 幸司
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38525">https://hdl.handle.net/11094/38525</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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">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	しの 篠 崎 幸 司
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 11168 号
学位 授 与 年 月 日	平成6年3月15日
学位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	<b>A New Method of Purification and Sensitive Bioassay of Platelet-Activating Factor (PAF) in Human whole Blood.</b>
	(新しく開発した精製法と高感度のバイオアッセイ法によるヒト全血中の血小板活性化因子(PAF)の定量法)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 森 武貞
	(副査) 教授 木谷 照夫 教授 網野 信行

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

血小板活性化因子(PAF)は、多彩な生理性を有するリン脂質であり、種々の病態に関与していると考えられている。その生理的意義を明らかにするためには、生体試料内における PAF の正確な測定法を確立することが必要である。PAF は合成されても細胞外に放出されずに細胞内にとどまり intracellular mediator として働くとの報告があることから、血漿中のみならず血球中をも含めた全血液中 PAF の定量が必要である。現在、血漿、唾液、胸水等の体液中の PAF の定量は比較的容易に行われているが、全血液中の PAF の定量は容易ではない。近年 radioimmunoassay (RIA), gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), bioassay 等の方法を用いて全血中の PAF の定量が行われており、敗血症、薬剤性アレルギー、虚血性心疾患等の患者血中で PAF が増加しているとの報告がある。しかし、それら報告の正常値には100倍以上のばらつきがあり、正確な定量がなされているとは言えないのが現状である。この理由として、存在量が非常に微量であることと1000–10000倍存在する phosphatidylcholine, sphingomyeline 等の PAF 以外のリン脂質の混入が定量に影響を与えると考えられる。本研究ではイオン交換カラムクロマトグラフィーと HPLC を用いた全血中からの PAF の精製法、及び高感度 bioassay 法について検討した。また、本法と RIA 法による感度あるいは精度について比較検討を行なった。

#### 【方法ならびに成績】

##### (1)高感度 bioassay 法

日本白色家兔の血液より調整した洗浄血小板 ( $320\mu\text{l}$ ) に fibrinogen ( $20\mu\text{l}$ ) と epinephrine ( $20\mu\text{l}$ ) を添加した後、 $10^{-8}$ – $10^{-11}\text{M}$  の PAF を添加し、血小板凝集を aggregometer にて測定した。Fibrinogen と epinephrine の添加により凝集活性は約 8 倍上昇した。

##### (2)血液からの抽出、精製、及び測定法の確立

血液 (2ml) に既知濃度 (10–400pg) の標準 PAF を添加し Bligh&Dyer の方法で脂質抽出を行なった。抽出した脂質を氷冷 ether に溶解し、遠心分離にて不溶画分を除去した後、ether 層をイオン交換カラム (Sep-pak QMA light) に添加した。有機溶媒 (chloroform, methanol) を用いて段階溶出を行ない PAF 分画を分散した。さらに HPLC (順層系シリカカラム) で精製した後 bioassay を行ない、検量線を用いて定量した。添加回収率は  $37.4 \pm 9.7\%$  ( $n=24$ ) で、測定限界は  $5\text{pg}/\text{ml}$  であった。さらに [ $^3\text{H}$ ] - PAF を用いて各抽出、精製の過程につき回収率を検討した結果

もほぼ同様であった。

### (3) RIA 法による全血中 PAF 測定との比較

血液 (2ml) に既知濃度の PAF (10-4000pg) を添加し, RIA kit (Dupont 社) の精製, 測定法に基づき, RIA 法にて測定した。RIA 法では測定不能で, これは阻害物質が完全に除去されていないためと考えられた。また, 今回確立した bioassay 法と比較して10倍以上感度が低かった。

### (4) 臨床検体および正常人検体の測定値

敗血症 (n=12), 肝硬変 (n=11), 正常人 (n=18) の血中 PAF を測定した。血中濃度は敗血症, 肝硬変及び正常人群でそれぞれ $17.4 \pm 28.6\text{pg/ml}$ ,  $13.5 \pm 24.3\text{pg/ml}$ ,  $9.0 \pm 8.7\text{pg/ml}$  であった。各群間に有意差は認めなかったが, 敗血症, 肝硬変のそれぞれ 1 例に有意な高値 ( $102.0\text{pg/ml}$ ,  $84.0\text{pg/ml}$ ) を認めた。

### 【総括】

- (1) 回収率, 測定感度ともに良好な全血中 PAF の測定法をイオン交換カラムクロマトグラフィー, HPLC 及び高感度 bioassay を用いて確立した。
- (2) 敗血症, 肝硬変症例では正常人に比較して血中 PAF 濃度が高値を示す症例が認められた。

## 論文審査の結果の要旨

血小板活性化因子 (PAF) は幅広い生理活性を有する脂質メディエーターであるが, その病理的意義はいまだ十分に解明されていない。その理由の一つは, 生体試料中の PAF の測定が困難なことである。本論文は, 全血から独自に開発した方法で PAF を効率よく精製し, 新しく開発した高感度のバイオアッセイ法によって微量の PAF を正確に測定できることを示したものである。さらに, 本法を臨床に応用し, 健常人の血中 PAF 濃度を明らかにするとともに, 敗血症や肝硬変症の一部に高濃度の PAF を認めた。本研究は, 血液検体中の PAF 濃度の測定を可能にし, PAF と疾患の関係の解明に大きく寄与したと考えられ, 学位に値するものと認める。