



Title	慢性関節リウマチ患者の血清Clq値と早期予後診断
Author(s)	李, 勝博
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39991
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

氏名	李かつ勝ひろ
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13066号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学位論文名	慢性関節リウマチ患者の血清Clq値と早期予後診断

論文審査委員	(主査) 教授 越智 隆弘
	(副査) 教授 綱野 信行 教授 木下タロウ

論文内容の要旨

【目的】

血中のClq蛋白量がRAの予後の指標となりうることが以前から報告されており、最近ではClqがRAの活動性の早期マーカーとして有用であるという報告もある。我々はまずスタンダード及び免疫原となるClqの精製に米増法を用い、その第一段階に統いてClqに比較的特異性の高いヒトIgGを固相化した樹脂(hIgG Sepharose)による処理を加えることで米増法に比べてより短時間により高純度Clqを得た。統いてこの方法で精製されたClqをもとに特異性の高い抗体を作製し、その抗体を用いた免疫比濁法によるより簡便な測定系を確立した。本研究の目的はこの方法による血中Clq蛋白定量の改善点及び予後診断マーカーとしての有用性を検討することにある。

【方法】

Clqの精製 健常人の血清を米増法に従い、最初の透析・沈殿・溶解の後、上清を20mM Phosphate Buffer(pH7.2) - 0.01M EDTA - 0.15M NaCl(PBS-E)に対して透析した後、得られた上清をPBS-Eで平衡化したhIgG Sepharose 4Bに添加した。その後PBS-Eで洗浄し、20mM Phosphate Buffer(pH7.2) - 0.01M EDTA - 1.5M NaClで溶出した画分を50mM Tris(pH7.2) - 0.5M NaClに対して透析し精製Clqを得た。この精製Clqの精度はWestern blot analysis及び免疫電気泳動を用いて評価した。またこの精製ヒトClqを抗原として日本白色家兎を免疫することによりウサギ抗ヒトClq抗体を得た。

血清Clqの測定 測定は免疫比濁法を用いた。血清サンプル10μlに反応緩衝液(50mM Phosphate buffer pH7.0, 0.5M NaCl, 0.01M EDTA, 3%PEG, 1%BT-9, 0.01%NaN₃)を300μl加え、混合の後5分間放置し抗体溶液(ウサギ抗ヒトClq・IgG 4.0mg/ml)を75μl加え、混合し5分後に340nmの光の強度の低下を測定した。

測定対象 対象はアメリカリウマチ学会の診断基準を満たすRA患者52例(男性7例、女性45例)であり、年齢は28歳から73歳で平均58.4歳であった。RA患者はすべて罹病10年以上で予後の判別が可能なものを対象とした。対照として健常者26例を用いた。健常者の年齢は23歳から38歳で平均26.5歳であった。

【成績】

米増法と本法による精製Clqの比較 Western blottingの結果をみると、抗ヒトClq抗体を用いた場合では、本法による精製Clqも米増法精製ClqもA鎖、B鎖、C鎖のバンドが適切な分子量の位置に認められる。しかし、金コロイド染色をみると米増法精製ClqではA、B、C鎖よりも高分子量側の36kD付近に不純物と思われるバンドが認め

られ Clq 以外の蛋白の存在が考えられる。一方、本法による精製 Clq では、その不純物と思われるバンドは除去されており、より純度の高い Clq を得ることができた。免疫電気泳動においても、本法による精製 Clq は米増法精製 Clq より純度が高く、ほぼ Clq のみであることが確認された。

RA 患者における血清 Clq 値 健常群 ($n = 26$) の血清 Clq 値は $96.1 \pm 12.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ であるのに対し RA 群 ($n = 52$) では $137.4 \pm 28.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ と明らかに高値を示した ($P < 0.0001$)。また末梢の小関節の破壊にとどまる軽症病型群 ($n = 23$) では $117.2 \pm 16.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、大関節破壊にいたる重症病型群 ($n = 29$) では $153.4 \pm 26.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、2 群間で高い有意差があった ($P < 0.0001$)。さらに、罹病 5 年以内の患者から採取し得た血清では軽症病型群 ($n = 17$) は $115.4 \pm 15.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、重症病型群 ($n = 8$) は $149.3 \pm 10.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ となり同様に高い有意差を認め ($P < 0.0001$)、また、軽症病型群は全例 $135 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、重症病型群は全例 $135 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であった。

【総括】

我々は米増法と hIgG sepharose affinity chromatography を組み合わせた方法を用い、より純度の高い Clq を得ることができた。また、それにより、より Clq に特異的な抗体を作成することが可能となった。今回 Clq 測定に用いた免疫比濁法は自動分析装置での測定が可能で、従来の免疫拡散法に比べ簡便で短時間での測定が可能である。また前述した緩衝液を用いることによって血清中の免疫複合体および乳びが測定系に及ぼす影響を回避することができ、これが測定精度が向上した要因の一つである。

RA と血清 Clq との関係については、今までにいくつか報告があり RA 患者血清は健常人に比して高い Clq 値をとることは一致しているところである。今回我々の Clq 測定システムの結果から、RA 患者血清では健常人に比べて Clq 値が高値になり、破壊関節数にもとづいて分けた軽症病型群と重症病型群での比較では、重症病型群で有意に高値を示した。ところが、血清 Clq 値は、罹患関節が “burned out” の状態になると相まって血清 Clq 値は低下してくるため罹病期間を考慮しない場合は、罹病期間の長い症例では重症病型でも軽症病型と変わらない Clq 値を示す症例が存在し cut off 値を決定できなかった。しかし、罹病早期例（5 年未満）でみると $135 \mu\text{g}/\text{ml}$ を境に 2 群に分けられ、Clq 値で病型を判断する場合発症から 5 年以内で評価することが重要であることがわかった。本研究により確立された簡便で精度の高い血清 Clq 測定システムは、今後 RA の治療に非常に有用であると考えている。

論文審査の結果の要旨

慢性関節リウマチは heterogeneous な疾患で、炎症が軽度に終始し末梢小関節の破壊にとどまる軽症患者がいる一方、大関節にも破壊が及び重度な機能障害に至る重症患者もいる。慢性関節リウマチの長期治療方針を考える上で、軽症に終始するか、重症に陥るかの予後を早期に知ることが非常に重要である。その予後診断の指標として越智らはポリクローナル抗体を用いた免疫拡散法で測定した血清 Clq 値が有用であると報告しているが、免疫拡散法は煩雑で測定に多くの時間を要し臨床応用が困難であった。そこで大量の検体を測定でき臨床的に実用化できる簡便な方法への改良を必要とした。本研究では、まず血清 Clq 値測定に必要とするスタンダード Clq および抗体作製時の免疫原 Clq の精製に米増法を用い、その第一段階に続いてヒト IgG を固相化した樹脂によるアフィニティクロマトグラフィーを加えることによってさらに純度の高い Clq を得ることができ、その高純度 Clq で免疫したウサギより得たポリクローナル抗体を用いて臨床的により汎用されうる免疫比濁法による測定系を確立した。この系では自動分析装置での測定が可能で免疫拡散法に比べて簡便で測定に要する時間も格段に短くなる。さらにこの方法で測定した血清 Clq 値は、スタンダード Clq および免疫原 Clq の純度が上がったために、従来の報告よりも低値になっているが、重症病型群と軽症病型群の間には明らかな有意差があり罹病 5 年未満の早期に予後診断が可能であることが示された。以上より、本研究において確立された簡便で精度の高い血清 Clq 値測定システムは慢性関節リウマチの治療計画を立てる上で重要であり、臨床的意義は非常に大きく学位に値すると考える。