



Title	Enzyme Immunoassay for Autoantibodies to Human Liver-Type Arginase and Its Clinical Application
Author(s)	木村, 雅浩
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42555">https://hdl.handle.net/11094/42555</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	木村雅浩
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第16088号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	Enzyme Immunoassay for Autoantibodies to Human Liver-Type Arginase and Its Clinical Application (ヒト肝臓型アルギナーゼに対する自己抗体のエンザイムイムノアッセイと臨床応用)
論文審査委員	(主査) 教授 網野 信行  (副査) 教授 林 紀夫 教授 内田 守人

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis; AIH) は自己免疫機序が関与し慢性肝障害を来す疾病である。一般的に女性に多く、高ガンマグロブリン血症を呈し、他の自己免疫疾患の合併が多いことを特徴とする。AIHは出現する自己抗体のパターンによって4つの型に分類されている。しかしながら、これら自己抗体のほとんどは、抗核抗体や抗平滑筋抗体等で、肝臓特異性がなく、疾患発症との関連性についても明らかでない。AIHはその病態改善に免疫抑制剤が極めて有効であり早期に治療を開始することが必要である。以上のことから我々は早期診断のために肝臓特異的の自己抗体の検出が重要と考え、肝臓に特異的に存在し、肝臓での尿素合成の最終段階を触媒する酵素であるアルギナーゼに対する抗体測定法を新しく開発した。さらに、立体構造を認識する抗体が存在することから検出が難しいとされる2型の自己免疫性肝炎に出現する抗CYP2D6抗体の高感度測定法を開発した。抗アルギナーゼ抗体と組合わせてその臨床応用を試みた。

#### 【対象と方法】

AIHはInternational Autoimmune Hepatitis Groupのスコアリングシステムにより、16点以上をDefinite AIH、10から15点をProbable AIHと診断した。

対象患者はDefinite AIH 11例、Probable AIH 31例、C型肝炎20例、B型肝炎23例、他の自己免疫疾患10例とし、健常人55例と比較した。各群ともに年齢に有意差はなかった。抗アルギナーゼ抗体ELISA:

- 1) プレートの作製: 固相液はリコンビナントヒトアルギナーゼを $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調整した。各ウェルに固相液を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 $4^\circ\text{C}$ で一晩、96穴マイクロタイタープレートを固相した。固相液を除いた後、 $200 \mu\text{l}$ の3%BSAを各ウェルに添加し、ブロッキング処理を $37^\circ\text{C}$ で2時間行った。洗浄後、室温で完全に乾燥させ、使用まで $4^\circ\text{C}$ で保存した。
- 2) 測定:  $100$ 倍希釈した $100 \mu\text{l}$ の血清を上記で作製したプレートに添加し、 $25^\circ\text{C}$ で1時間反応後、血清を除き5回洗浄を行った。続いて、ペルオキシダーゼ標識プロテインA液を各ウェルに加え、 $25^\circ\text{C}$ で1時間反応。ペルオキシダーゼ標識プロテインA液を除き5回洗浄。発色基質として3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidineを各ウェルに添加し、 $25^\circ\text{C}$ で30分間反応させた。反応停止液(1% HCl)を各ウェルに分注してOD450nmでの吸光度を測定した。

3) 吸収実験: Polyvinylidene difluoride 膜に50 $\mu$ gのリコンビナントヒトアルギナーゼを染み込ませたものを吸収用膜とした。この抗原吸収膜に100倍希釈した血清を加え、室温で2時間、反応させた。反応後、上記と同様にELISAを行った。

抗CYP2D6抗体ラジオリガンドアッセイ(高感度測定法):

In vitro transcription/translation 法により、アイソトープ標識リコンビナントCYP2D6を発現し、抗体に結合したアイソトープ標識リコンビナントCYP2D6をプロテインAで免疫沈降させ、その放射活性を測定した。抗体価はCYP2D6 index [(未知検体-健常人プール血清) / (既知陽性検体-健常人プール血清) ×100] として表わした。

#### 【結果】

抗アルギナーゼ抗体ELISAの基礎検討では、高値検体及び中等値検体で同時再現性のCV値はそれぞれ、2.3%、7.5%であり、日差再現性のCV値はそれぞれ、10.8%、9.8%であり、良好な結果が得られた。血清中の抗アルギナーゼ抗体をリコンビナントヒトアルギナーゼで吸収すると吸光度が減少し、特異的にアルギナーゼに対する抗体を検出しているものと考えられた。55人の健常人の吸光度を正規分布をとるよう平方根変換した値での95%上限値をcut off値とし、それより吸光度が高いときに抗体陽性と判定した。健常人群に比べてDefinite AIH、Probable AIH、C型肝炎で抗体価が有意に上昇していた。抗体陽性の割合は、Definite AIHで18.2% (2/11)、Probable AIHで32.3% (10/31)、C型肝炎で20.0% (4/20)、B型肝炎で13.0% (3/23) および、他の自己免疫疾患で10.0% (1/10)であった。また、抗アルギナーゼ抗体価と血清IgG濃度、抗核抗体価、抗CYP2D6抗体価の間には有意な相関が認められなかった。抗アルギナーゼ抗体と抗CYP2D6抗体を組合わせた場合、AIHにおける陽性率は57%であった。また、抗核抗体、抗平滑筋抗体が陰性の非典型的自己免疫性肝炎の50%に抗アルギナーゼ抗体または抗CYP2D6抗体が陽性であった。

#### 【総括】

肝臓特異的抗原であるアルギナーゼに対する自己抗体の測定系を新たに開発した。Definite AIHより、Probable AIHで陽性率が高く、1/3の症例で抗体陽性を認め、抗アルギナーゼ抗体はAIHのスクリーニングおよび診断に有用であると考えられた。さらに、抗CYP2D6抗体の高感度測定法との組合わせは、AIHの6割の患者の診断に有用と考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

肝臓特異的抗原であるアルギナーゼに対する自己抗体の測定系を新たに開発し、各種肝臓疾患、他の自己免疫疾患および健常人を対象として測定した。

健常人群に比べて自己免疫性肝炎 definite、自己免疫性肝炎 probable、C型肝炎で抗体価が有意に上昇していた。抗体陽性率は、自己免疫性肝炎 definite で18.2% (2/11)、自己免疫性肝炎 probable で32.3% (10/31)、C型肝炎で20.0% (4/20)、B型肝炎で13.0% (3/23) および、他の自己免疫疾患で10.0% (1/10)であった。また、抗アルギナーゼ抗体価と血清IgG濃度、抗核抗体価、ラジオリガンドアッセイ系を用いた抗CYP2D6抗体価の間には有意な相関は認められなかった。抗アルギナーゼ抗体と抗CYP2D6抗体を組合わせると、自己免疫性肝炎における陽性率は57%であった。また、抗核抗体、抗平滑筋抗体が陰性の非典型的自己免疫性肝炎の50%に抗アルギナーゼ抗体または抗CYP2D6抗体が陽性であった。

今回開発した抗アルギナーゼ抗体測定法は自己免疫性肝炎のスクリーニングおよび診断に有用であり、抗CYP2D6抗体高感度測定法との組合わせにより、自己免疫性肝炎患者の6割の診断に有用と考えられた。学位の授与に値するものと考えられる。