

氏 名（本籍）	えん 遠 どう 藤 いたる 到
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 第 2791 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 9 月 13 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
最 終 学 歴	昭 和 59 年 3 月 12 日 兵 庫 医 科 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業
学 位 論 文 題 目	アポ蛋白 A-IV測定系の確立とクローン病での動態

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教授 豊 田 隆 謙 教授 佐 藤 徳 太 郎

教授 松 野 正 紀

論文内容要旨

I 背景

アポ蛋白 A-IVは分子量 46,000 の糖蛋白で、ヒトでは小腸粘膜上皮細胞において特異的に合成される。脂肪の吸収に際して、A-IVはカイロミクロンの構成アポ蛋白としてリンパ管へ分泌され、脂肪の消化吸収との関連が示唆されている。しかし、測定法が一般化していないため、各疾患における A-IVの血中濃度の報告はきわめて少ない。一方、クローン病は、非特異的慢性炎症性腸疾患であり、脂肪の消化吸収障害を伴うことが多く、アポリポ蛋白代謝にも影響を及ぼすと考えられる。

II 目的

活動期クローン病および栄養療法が、血漿 A-IV濃度におよぼす影響を明らかにするために、迅速で簡易、かつ感度が高い方法である、competitive enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) による血漿 A-IV測定系を確立し、さらにこの測定系を用いてクローン病における血漿 A-IV濃度について検討した。

III ヒトアポ蛋白 A-IV測定系の確立

ヒト空腹時血清から Havel らの超遠心法により、リポ蛋白除去分画を得、これに静注用脂肪乳剤から得られた脂質エマルジョンを加え、アポ蛋白を吸着させた。これを洗浄した後、50 倍量の冷ジエチルエーテル：エタノール混液を加え脱脂、粗 A-IVを得た。この蛋白を SDS-PAGE (10-20%グラジエントゲルプレート) にて分離、A-IVバンドを切り出しゲル片を回収、エレクトロエリユーターを用い蛋白を溶出、精製 A-IVを得た。これを BALB/c マウス (8 週齢、雌) の腹腔内に免疫、心腔内より採血し、ヒト A-IVポリクローナル抗体を得た。ELISA は A-IV 6.4 pmol/ml を固相とし、未知の血漿検体またはスタンダードとして既知量の A-IVと、6,400 倍に希釈した A-IV抗体の抗原抗体複合物 100 μ l を反応させる競合法を用い、吸着した抗体はペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG F(ab')₂ で検出した。この系における血漿 A-IV測定感度は、8-40ng/well であり、健常者の血漿 A-IV濃度は、751.4 \pm 97.2ng/well (mean \pm SD) であった。

IV クローン病におけるアポ蛋白 A-IVの動態

対象と方法：栄養療法前の活動期クローン病患者 13 例 (全例男性、全例非切除例、小腸大腸型 12 例、大腸型 1 例、平均年齢 21.7 歳) を対象とした。さらに栄養療法による A-IVの推移を検討

するため栄養療法4週後にも採血した。栄養療法の内訳は、ED (elemental diet) 6例、HD (hydrolyzed diet) 3例、TPN (total parenteral nutrition) 4例である。EDおよびHD維持量における脂肪含有量は、それぞれ4.1g/日、66.7g/日であった。尚、治療効果が認められなかったHD群1例は、4週後の検討から除外した。

結果：活動期クローン病患者の血漿 A-IV濃度は、 346.8 ± 127.0 ng/well (mean \pm SD) であり、健常者に比し有意に低値を示した ($p < 0.001$)。次に栄養療法別に、活動期および栄養療法4週後の血漿 A-IV濃度を検討すると、ED群では、それぞれ 401.2 ± 62.3 ng/well (mean \pm SE), 361.0 ± 27.6 , TPN群も、 283.0 ± 26.6 , 274.3 ± 70.8 と有意の変動を示さなかったが、脂肪を多く含むHD群は、 339.0 ± 125.0 , 643.0 ± 7.0 と上昇傾向にあった。

V 考 察

今回、A-IV測定系を確立するにあたり、A-IVの精製に1mm厚のグラジエントゲルを用いた。この方法は、蛋白収量が非常に少ないが、より純粋なA-IVを得ることが可能となった。今回確立したELISAによるA-IV測定系は、従来報告のあるelectroimmunoassay (EIA), radioimmunoassay (RIA)に比較し、迅速で、簡易かつ高感度な測定法であった。また本研究により、活動期クローン病およびED、TPN群では、A-IV濃度が低値であることが明らかになったが、これは、A-IV合成の場である小腸の炎症の関与、脂肪摂取量および吸収量の低下、カイロミクロン形成の低下を反映したものと考えられた。HD群では、炎症の消退によるA-IV合成能の回復に加えて、脂肪を含有することにより、脂肪の吸収、カイロミクロンの形成が生じ、A-IVの増加が認められたものと考えられた。

VI 結 論

1. 従来のEIA, RIAと比較して迅速で簡易、かつ高感度なELISAによるヒト血漿アポ蛋白A-IV測定系を確立した。
2. この測定系を用いて、クローン病における血漿A-IV濃度を検討した。
 - 1) 活動期クローン病では、低値を示した。
 - 2) 栄養療法施行後、ED, TPN群では、低値が持続したが、HD群では上昇傾向がみられた。
3. 以上より、クローン病における血漿A-IV濃度の低値は、A-IV合成の場である小腸の炎症の関与、脂肪摂取量・吸収量の低下およびカイロミクロン形成の低下が原因と考えられた。

審査結果の要旨

本論文は、ヒト血漿アポ蛋白 A-IV濃度の測定系の確立と、それをを用いてクローン病におけるアポ蛋白の A-IV動態を明らかにすることを目的としたものである。ヒト血漿アポ蛋白 A-IV濃度は、従来は EIA や RIA により測定されていたが、低感度や煩雑さのため広く用いられることもなく、クローン病をはじめとする腸疾患での成績は、ほとんど報告されていないのが現状である。

そこで本研究では、EIA や RIA と比較して、迅速で簡易、かつ感度が高い方法である competitive enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) によるヒト血漿アポ蛋白 A-IV濃度測定系を確立し、また小腸粘膜上皮細胞において特異的に合成されるアポ蛋白 A-IVの動態について、小腸に病変が好発するクローン病で測定し、その代謝・機能について検討した。

まず、ヒト空腹時血清から超遠心法によりリポ蛋白除去分画を得、これに脂質エマルジョンを加え、アポ蛋白を吸着させた。これを洗浄後脱脂し、粗 A-IVを得た。これを SDS-PAGE にて分離、A-IVバンドを切り出しゲル片を回収、エレクトロエリ्यूターを用い蛋白を溶出、精製 A-IVを得た。これを BALB/C マウスの腹腔内に免疫、心腔内より採血し、ヒト A-IV ポリクローナル抗体を得た。ELISA は A-IV 6.4 pmol/ml を固相とし、未知の血漿検体または既知量の A-IV と、6,400 倍に希釈した A-IV 抗体の抗原抗体複合物 100 μ l を反応させる競合法を用い、吸着した抗体はペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (ab')₂ で検出した。この系におけるアポ蛋白 A-IV 測定感度は 8~40ng/well であり、健常者の血漿 A-IV 濃度は、751.4 \pm 97.2ng/well (mean \pm SD) であった。未治療活動期クローン病では 346.8 \pm 127.0ng/well であり、有意に低値を示した。絶食のうえ栄養療法により緩解に至った(近付いた)4週後では、経腸的に脂肪が全く(ほとんど)はいらない中心静脈栄養では 274.3 \pm 70.8、成分経管栄養法では 361.0 \pm 27.6 とほとんど変動しなかったのに対し、脂肪を多く含む消化態栄養剤による経腸栄養では 643.0 \pm 7.0 と上昇傾向を認めた。また、これら治療前後の値は従来の脂質、炎症や栄養のパラメーターとは相関を示さなかった。

以上の成績より、クローン病における血漿 A-IV濃度の低下は、A-IV合成の場である小腸の炎症の関与、経腸的な脂肪摂取量および吸収量の低下、カイロミクロン形成の低下が反映したものと考察した。

本研究は、迅速で簡便、かつ高感度な ELISA によるヒト血漿アポ蛋白 A-IV測定系を確立するとともに、合成の場である小腸の疾患のひとつ、クローン病における栄養療法前後で血漿 A-IV濃度を測定することにより、A-IVの代謝と機能の一端を明らかにした。臨床研究の学位論文として、十分に価値がある。