

博士(医学) 大原行雄

学位論文題名

Quantitative and qualitative studies of red cell ferritin in refractory anemia of myelodysplastic syndrome

(骨髓異形成症候群の不応性貧血における
赤血球フェリチンの量的、質的検討)

学位論文内容の要旨

目的

骨髓異形成症候群(MDS)は1982年FABグループにより提唱され5つのサブタイプからなっている。これらの中で慢性骨髓単球性白血病(CMML)を除くといずれも不応性貧血(RA)が病態の基本をなしており、その異常は主に赤血球系にあるとされる。

一方、フェリチンは鉄貯蔵蛋白として知られ、生体の鉄代謝状態を鋭敏に反映するため臨床では血清フェリチンが体内の鉄貯蔵量を知る指標として頻用されている。しかし、炎症、感染症、肝障害などにより変動するのが問題である。その点、赤血球フェリチンはこれらに影響されることが少なく、より正確に体内の鉄動態を反映すると考えられる。

そこでMDSの5型の中からRAについて赤血球フェリチンを量的、質的に検索し、この疾患における病態を鉄代謝の面から検討した。

材料および方法

1) 赤血球溶血液：RA患者10名、健常成人53名（男24名、女29名）よりヘパリン採血20mlを得、microcrystalline celluloseと α -celluloseを重量比1:1に混合したカラムを通して白血球および血小板を除去し、得られた赤血球を生食浮遊液とし、その一部で赤血球数を測定、残りは蒸留水を加えて溶血させ、凍結融解の後、10,000g、20分間遠心し上清を検体とした。フェリチンは抗ヒト肝フェリチンポリクローナル抗体を用いたIRMA(Immunoradiometric Assay)法で測定し、先に測定しておいた赤血球数で除して赤血球1個当たりの量として表した。

2) 等電点電気泳動法(IEF)：1)で得られた赤血球溶血液を70°C15分間加熱し、氷冷の後10,000g、20分間遠心、上清を一昼夜透析した後、pH 3.5-10、pH 4-6のampholineを1:4に混合したカラムにて800V、15時間、4°Cにて泳動した。

3) 赤血球内鉄量：溶血液の鉄量を原子吸光計にて測定し、溶血液作製時に計測した赤血球数で除して一個当たりの鉄含有量とした。

4) レクチン親和性：Concanavalin-A(Con-A)、wheat germ agglutinin(WGA)、lentil lectin(LCA)、Ricinus communis(RCA)に対する親和性をそれぞれWorwood、Yamamoto、Kornfeld、Bhavanandanらの方法に準じて検討した。

結果

1) 赤血球フェリチン量：健常成人男子の値は $14.3 \pm 10.3 \text{ ag/cell}$ ($\text{ag}=10^{-18}\text{g}$)、健常成人女子の値は $7.5 \pm 3.6 \text{ ag/cell}$ でありStudent's t-testにて有意差を認めた($p<0.01$)。RA症例では10例中、9例が増加($36.9\text{-}3,920 \text{ ag/cell}$)を示した。

2) 赤血球フェリチンのIEF：健常成人5例（男3例、女2例）では、いずれもほぼpI 5.1-5.7にフェリチンが認められた。一方、RA症例ではかなりの不均一性がみられた。その値は、骨髄における赤芽球系の形態異常の程度と関連すると考えられ、赤芽球における形態異常の割合が多くなるほどフェリチンの等電点は酸性側に偏位する傾向がうかがわれた。

3) 赤血球内鉄量：健常成人の赤血球内鉄量は男子 $128 \pm 9 \text{ fg/cell}$ ($\text{fg}=10^{-15}\text{g}$)、女子 $130 \pm 9 \text{ fg/cell}$ であり、性差を認めなかった。RA症例の値は、赤血球フェリチン量の増加にもかかわらず健常成人の値に比較して差はほとんどみられなかった。

4) レクチン親和性：検討した4種のレクチン、Con-A、WGA、LCA、RCAのいずれもがRA症例および健常人の赤血球フェリチンとは親和性を示さなかった。

考案

健常成人における赤血球フェリチン値は、男女で有意な性差を認めた。これは女子では月経等により鉄の出納が負に傾きやすく、鉄欠乏をきたしやすい状態にあるためと考えられた。一方、RA症例の赤血球フェリチン値は10例中9例で高値を示した。これらの症例では鉄剤投与、輸血などを受けておらず、フェリチンの高値が血清鉄、総鉄結合能、血清フェリチン、赤血球内鉄量のいずれとも相関を認めなかつたことから、鉄以外の因子に影響を受けていることが示唆され、原疾患に関係すると考えられた。

赤血球フェリチンのIEFの結果では、健常成人においては男女ともほぼpI 5.1-5.7にフェリチンが認められ、フェリチン量としては性差が認められるものの、IEFよりみた蛋白質の泳動性に性差は認められなかつた。これに対してRA症例の赤血球フェリチンIEFパターンは種々の分布を示し、健常成人の結果と比較しても酸性側や塩基性側に偏位して一定の結果は得られなかつた。しかし、骨髄における赤芽球系細胞の形態との関連では、形態異常が強ければ強いほどフェリチンの等電点が酸性側に偏位する傾向がうかがわれた。すなわち、骨髄の全赤芽球に占める形態異常(dysplasia)を有する赤芽球の割合が多いほど、IEFにおいて赤血球フェ

リチンが酸性側に偏位し、酸性フェリチンの増加することが示唆された。このことは2年間にわたって輸血をせずに経過観察することができた症例で、血清鉄や血清フェリチンなど体内の鉄代謝状態を示すパラメータにほとんど変化を認めなかつたにもかかわらず、骨髄の赤芽球系細胞の形態異常が増悪するのと並行して、IEFにおけるフェリチンの等電点が著しく酸性側に偏位した事実からも支持されるものと考えられた。一方、レクチン親和性の結果より、RAにおけるフェリチンの酸性化に糖鎖は関与していないことが示唆された。骨髄における赤芽球系細胞の形態異常と、赤血球フェリチンのIEFにおける酸性化との間の関係は未だ不明であるが、同じく無効造血を示し、赤芽球系細胞の形態異常を示す巨赤芽球性貧血にはこのような所見の認められないことから、白血病化し易いという特徴をもつ本疾患の本態に関連した知見であることが示唆された。

結語

骨髄異形成症候群の不応性貧血では、赤血球フェリチン量の増加がみられるが、体内鉄動態とは直接に関係しないことが示唆された。さらに、等電点電気泳動法における酸性側への偏位という形で示されたフェリチンの質的変化は、骨髄における赤芽球系細胞の形態異常の多寡と密接に関係することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査教授 宮崎 保

副査教授 西 信三

副査教授 石橋 輝雄

学位論文題名

Quantitative and qualitative studies of red cell ferritin in refractory anemia of myelodysplastic syndrome

(骨髄異形成症候群の不応性貧血における赤血球フェリチンの量的、質的検討)

目的

骨髄異形成症候群(MDS)は5つのサブタイプからなり、その中では不応性貧血(RA)が病態の基本であり、その異常は主に赤血球系にあるとされる。

一方、フェリチンは鉄貯蔵蛋白として知られ、赤血球フェリチンは炎症、感染症、肝障害などにより変動する血清フェリチンに対して、それらに影響されることが少なく、より正確に体内の鉄動態を反映するとして注目されている。

そこでMDSのRAにおける赤血球フェリチンを量的、質的に検索し、この疾患における病態を鉄代謝の面から検討した。

材料および方法

1) 赤血球溶血液：RA患者10名、健常成人53名（男24名、女29名）より得たヘパリン採血20mlをmicrocrystalline celluloseと α -celluloseを1:1に混合したカラムを通して白血球および血小板を除去し、蒸留水を加えて溶血させ、遠心後の上清を検体とした。フェリチンは抗ヒト肝フェリチンポリクローナル抗体を用いたIRMA(Immunoradiometric Assay)法で測定し、別に測定しておいた赤血球数で除して赤血球1個当たりの量として求めた。

2) 等電点電気泳動法(IEF)：1)で得られた赤血球溶血液を70℃で15分間加熱し、遠心後の上清を透析し、pH3.5-10、pH4-6のampholineを1:4に混合したカラムで800V、15時間、4℃にて泳動した。

3) 赤血球内鉄量：溶血液の鉄量を原子吸光計で測定し、先に測定しておいた赤血球数で除して一個当たりの鉄含有量とした。

4) レクチン親和性：Concanavalin-A(Con-A)、wheat germ agglutinin (WGA)、lentil lectin(LCA)、Ricinus communis(RCA)に対する親和性をそれぞれWorwood、Yamamoto、Kornfeld、Bhavanandanらの方法に準じて検討した。

結果

1) 赤血球内フェリチン量：健常成人男子の値は $14.3 \pm 10.3 \text{ ag}/\text{cell}$ ($\text{ag} = 10^{-18} \text{ g}$)、健常成人女子の値は $7.5 \pm 3.6 \text{ ag}/\text{cell}$ であり、Student's t-testにて有意差を認めた($p < 0.01$)。RA症例では10例中、9例が増加($36.9 - 3,920 \text{ ag}/\text{cell}$)を示した。

2) 赤血球フェリチンのIEF：健常成人5例（男3例、女2例）では、ほぼpI5.1-5.7にフェリチンが認められた。一方、RA症例ではpI4.5-6.9に散在性に分布して一定の傾向を認めなかった。しかし、そのpI値は骨髓中の形態異常を有する赤芽球細胞の割合が多くなるほど減少、つまり、酸性側に偏位する傾向がうかがわれた。

3) 赤血球内鉄量：健常成人の赤血球内鉄量は男子 128 ± 9 fg/cell(fg= 10^{-15} g)、女子 130 ± 9 fg/cellであり性差を認めなかった。RA症例の値は、健常成人の値に比較して差をほとんど認めなかった。

4) レクチン親和性：検討した4種のレクチン、Con-A、WGA、LCA、RCAのいずれもが赤血球フェリチンとの親和性を示さなかった。

考案

健常成人の赤血球フェリチン値は、男女で有意な性差を認めた。一方、RA症例の赤血球フェリチン値は10例中、9例で高値を示した。これらの症例では鉄剤投与、輸血などを受けておらず、血清鉄、総鉄結合能、血清フェリチン、赤血球内鉄量のいずれとも相関を認めなかつたことから、フェリチンの高値は鉄以外の因子に影響を受けていいることが示唆された。

赤血球フェリチンのIEFの結果では、健常成人においては男女ともpI5.1-5.7にフェリチンが認められ、IEFよりみた蛋白質の泳動性に性差は認めないと考えられた。これに對してRA症例の赤血球フェリチンIEF像は種々の分布を示し、酸性側や塩基性側に偏位して一定の傾向を認めなかつた。しかし、骨髓における赤芽球系細胞の形態との関連では、全赤芽球に対して形態異常(dysplasia)を有する赤芽球の割合が多いほど、IEFにおいて赤血球フェリチンが酸性側に偏位し、酸性フェリチンの増加する傾向が認められた。一方、レクチン親和性の結果より、フェリチンの酸性化に糖鎖は関与していないことが示唆された。

骨髓における赤芽球系細胞の形態異常と、赤血球フェリチンのIEFにおける酸性化との間の関係は不明であるが、同じく無効造血を示し、赤芽球系細胞の形態異常を示す巨赤芽球性貧血には認められない所見であることから、白血病になりやすいという特徴をもつ本疾患の本態に関連した知見であることが示唆された。

結語

骨髓異形成症候群の不応性貧血では赤血球フェリチン量の増加がみられるが、体内鉄動態とは直接に関係しないことが示唆された。さらに、等電点電気泳動法における酸性側へのシフトという形で示されたフェリチンの質的変化は、骨髓における赤芽球系細胞の形態異常の多寡と密接に関係することが示唆された。

以上より、本研究は博士(医学)の学位論文として妥当なものと判断される。