

学位論文題名

白血球中亜鉛濃度測定法の確立と糖尿病患者への応用

学位論文内容の要旨

緒 言

亜鉛はホルモンの合成、核酸・タンパク合成、糖代謝、脂肪代謝、アミノ酸代謝、味覚・嗅覚、創傷治癒などに密接に関連していることが知られている。ヒトの亜鉛の総量は、体重60kgで約2.0gと推定され、鉄の3.5gに次ぎ、第3位のマンガンよりはるかに多い。血球成分中亜鉛濃度に関しては、赤血球中は血清中より10倍ほど高く、白血球中は赤血球中よりさらに10倍高く、体内亜鉛の動態をよりよく反映すると言われている。また、白血球中にはアルカリフォスファターゼやペプチターゼなどの酵素が存在し、亜鉛はこれらの酵素活性に必須である。さらに、亜鉛は白血球の生理活性、寿命、アポトーシスと密接に関連していることが示唆されており、白血球中の亜鉛の動態を明らかにすることは重要と考えられる。

しかし、健常者の白血球中亜鉛濃度については種々の報告があるが、一定した値が得られていない。その原因として、末梢血よりの白血球分離方法と亜鉛濃度の測定法に問題があると考えられる。そこで、本研究では、不連続密度勾配法、フローサイトメトリーと誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を組み合わせることにより、末梢血からリンパ球と顆粒球を選別回収し、その分画中の亜鉛濃度を高精度でしかも簡便に定量する方法を確立し、この方法を用いて未だ正確な値が得られていない健常者のリンパ球および顆粒球中亜鉛濃度を性、年齢別に明らかにし、さらに、その応用として、糖代謝異常のうちNIDDM患者のリンパ球および顆粒球中亜鉛濃度の変動を明らかにすることを目的とした。

対象および測定方法

対象は健常者、男子30名、女子24名、計54名と外来通院加療中のNIDDM患者で糖尿病以外に明らかな代謝性疾患や、腎臓疾患、肝臓疾患の合併を認めない、男子17名、女子15名、計32名である。

対象者から早朝空腹時に上腕肘静脈より21G針を用いヘパリン処理真空採血管を用いて全血10mlを採血し、処理まで室温で保存し、2時間以内に下記の処理を行った。

(1)モノ・ポリ分離溶液上にヒト全血3.5mlを静かに重層し、室温でスイング式遠心分離器で400Gで30分間遠心した。その結果、上層より血漿、単核白血球層(以下FR1と略す)、MPRM、多型核白血球層(以下FR2と略す)、MPRM、赤血球に分離された。FR1には、リンパ球と単球が、FR2には、主に顆粒球が含まれている。パスツールピペットで、静かに血漿を除去した後、FR1とFR2を別々の試験管に移し試料とした。

(2)細胞を洗浄するために得られた試料の約3倍量のphosphate-buffered saline(以下PBSと略す)を加え、室温で250Gで10分間遠心した。これを2回繰り返し、上清を除去し、PBSに浮遊させフローサイトメーター用の試料とした。

(3)フローサイトメーター(FACS Vantage)の光軸調整を約1,000倍に希釈した標準粒子($2.0\mu\text{m}$ 標準粒子)を用いて行った。光軸調整が終了したのちフローサイトメーター用の試料を注入し、リンパ球と顆粒球を選別回収した。得られた試料を250Gで5分間遠心し、上清を除去し、

PBSに浮遊させ試料とした。

(4)得られた試料0.5mlをテフロン製分解容器に移し、0.2N硝酸0.1mlを加え、約120℃で2時間、湿式灰化した後、1.0mlにメスアップし、亜鉛濃度測定用の検体とした。リンパ球および顆粒球中の亜鉛濃度はICP-MSを用いて測定した。検量線の作成には亜鉛標準液を用いた。

結 果

1. 健常者のリンパ球中亜鉛濃度は、男性では40.9～63.9に分布し、平均 49.8 ± 1.0 、女性では40.1～68.4に分布し、平均 50.0 ± 1.4 であり、男女差は認められないが、男女とも加齢により有意の低下を示すことが明らかになった($p < 0.0001$)。

NIDDM患者のリンパ球中亜鉛濃度は、男性では37.1～50.4に分布し、平均 43.3 ± 0.9 、女性では34.9～53.8に分布し、平均 43.1 ± 1.7 で、健常者と比較して男女とも有意な低下を示したが、年齢との間に有意な相関は認められなかった。

2. 健常者の顆粒球中亜鉛濃度は、男性では、39.1～55.9に分布し、平均 46.4 ± 1.0 、女性では、35.2～62.2に分布し、平均 49.3 ± 1.4 であり、男女差は認められないが、男女とも加齢により有意の低下を示すことが明らかになった($p < 0.0001$)。

NIDDM患者の顆粒球中亜鉛濃度は、男性では、34.0～53.5に分布し、平均 41.2 ± 1.4 、女性では、35.7～48.8に分布し、平均 43.8 ± 1.0 で、健常者と比較して男女とも有意な低下を示したが、年齢との間に有意な相関は認められなかった。

3. 不連続密度勾配法、フローサイトメトリーおよびICP-MS法を組み合わせることにより、末梢血からリンパ球と顆粒球を選別回収し、その分画中の亜鉛濃度を高精度でしかも簡便に定量する方法を確立した。

考 察

加齢により感染症の発生率の増加、抗体価の減少、免疫反応の低下や異常が観察され、これが、亜鉛濃度の低下と関連することが知られている。本研究により、健常者においてリンパ球および顆粒球中亜鉛濃度が、加齢に伴い有意に低下することが明らかになり、加齢による白リンパ球中及び顆粒球中亜鉛濃度の低下と、加齢による免疫能の低下が密接に関連していることが推測された。また、本研究で、NIDDM患者ではリンパ球および顆粒球中亜鉛濃度と年齢との相関は認められなかったが、30～50歳代にかけて健常者と比較してリンパ球中および顆粒球中亜鉛濃度の低下が著しいことが明らかにされ、NIDDMの発症および病態の進展に亜鉛濃度の低下が関与していることが推測された。

一方、マウスを用いた動物実験で、糖尿病に亜鉛欠乏が重なると免疫能が低下しやすいことや、さらに、NIDDM患者はでphytohemagglutininに対するT-リンパ球の反応性が低下していたとの報告がある。本研究では、NIDDM患者が健常者と比較してリンパ球中および顆粒球中亜鉛濃度が有意な低下を示すことが明らかにされ、NIDDM患者にみられる免疫能の低下の原因の一つとしてリンパ球中および顆粒球中亜鉛濃度の低下が関与していることが推測された。

結 論

白血球分画中亜鉛濃度を測定するために、末梢血より白血球分画を精度よく回収することが必要であり、その方法として不連続密度勾配法とフローサイトメトリーを併用し、簡便な操作で白血球よりリンパ球および顆粒球を分離し、ICP-MSを用いて白血球中亜鉛濃度を高精度でしかも簡便に定量する方法を確立できた。これにより、健常者の白血球分画中亜鉛濃度が加齢により低下することが明らかになった。また、NIDDM患者のリンパ球および顆粒球中の亜鉛濃度は健常者と比較して低値を示すことが明らかになり、NIDDM患者の疾病の発現および免疫能の低下の原因の一つとして、白血球中亜鉛濃度の低下が関与していることが推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齋 藤 和 雄

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

白血球中亜鉛濃度測定法の確立と糖尿病患者への応用

本論文は、これまで確立されていなかったリンパ球および顆粒球中亜鉛濃度を高精度でしかも簡便に定量する方法を確立し、その方法を用いて健常者および糖尿病患者のリンパ球および顆粒球分画中亜鉛濃度の変動を明らかにすることを目的とした。対象は健常者、男子30名、女子24名、計54名と外来通院加療中のインスリン非依存型糖尿病(NIDDM)患者、男子17名、女子15名、計32名である。測定方法は、対象者から早朝空腹時に全血10mlを採血し、室温で保存し、2時間以内に以下の処理を行った。(1)モノ・ポリ分離溶液上にヒト全血3.5mlを静かに重層し、スイング式遠心分離器で400Gで30分間遠心した。単核白血球層(FR1)、多型核白血球層(FR2)を別々の試験管に移し試料とした。(2)細胞を洗浄するために得られた試料の約3倍量のphosphate-buffered saline(PBS)を加え、250Gで10分間遠心した。これを2回繰り返し、上清を除去し、PBSに浮遊させフローサイトメーター用の試料とした。(3)フローサイトメーター(FACS Vantage)の光軸調整は約1,000倍に希釈した標準粒子($2.0\mu\text{m}$ 標準粒子)を用いて行った。光軸調整が終了したのちフローサイトメーター用の試料を注入し、リンパ球と顆粒球を選別回収した。得られた試料を250Gで5分間遠心し、上清を除去し、PBSに浮遊させ試料とした。(4)この試料0.5mlをテフロン製分解容器に移し、0.2N硝酸0.1mlを加え、約120°Cで2時間、湿式灰化した後、1.0mlにメスアップし、亜鉛濃度測定用の検体とした。リンパ球および顆粒球中の亜鉛濃度は誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を用いて測定した。その結果、リンパ球と顆粒球の分離精度は97%以上であった。健常者のリンパ球中亜鉛濃度は、男性で 49.8 ± 1.0 (平均 $\pm$ 標準誤差 $\mu\text{g}/10^{10}\text{cells}$)、女性では 50.0 ± 1.4 であり、顆粒球中亜鉛濃度は、男性では、 46.4 ± 1.0 、女性では、 49.3 ± 1.4 で、いずれも男女間に有意差は認められないが、加齢による有意の低下が認められた。NIDDM患者のリンパ球中亜鉛濃度は、男性では 43.3 ± 0.9 、女性では、 43.1 ± 1.7 で、顆粒球中亜鉛濃度は、男性では、 41.2 ± 1.4 、女性では、 43.8 ± 1.0 で、健常者と比較して男女とも有意な低下を示すが、年齢との間に有意な相関は認められなかった。本論文では、1. 不連続密度勾配法、フローサイトメトリーとICP-MSを併用し、末梢血のリンパ球と顆粒球を選別回収し、その亜鉛濃度を高精度に定量する方法が確立された。2. 健常者ではリンパ球および顆粒球中亜鉛濃度に性差が認められないが、加齢に伴い有意の低下を示し、免疫能との関連性が推測された。3. NIDDM患者ではリンパ球および顆粒球中亜鉛濃度が健常者と比較して有意な低下を示し、NIDDM患者にみられる免疫能の低下の原因の一つとして白血球分画中亜鉛濃度の低下が関与していることが推測された。4. NIDDM

患者で白血球分画中亜鉛濃度と年齢との間に相関が認められなかったのは、若年期の亜鉛濃度の低下が特に著しいためと考えられた。

審査にあたって副査の石橋輝雄教授から、NIDDM患者の亜鉛濃度の低下は病態と結びつくのか、健常人では加齢により低下するが、NIDDM患者で年齢間に差がない理由、性別、年齢別の検討について、次いで副査の小池隆夫教授から、健常者の亜鉛が年齢とともに低下する理由、食事摂取との関係、糖尿病患者の亜鉛を測定した理由、糖尿病患者の白血球中亜鉛濃度以外で変動するマーカーについて質問があった。申請者は何れの質問に対しても概ね妥当な回答を行った。

本論文は、精度の高い白血球中亜鉛濃度の測定法を開発し、それを用いた測定から糖尿病の病態と亜鉛濃度との関係を明らかにしたものであり、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに値するものと判定した。