

原 著

RIA キットによる血清中2-5A 合成酵素活性測定の 基礎的および臨床的検討

東京女子医科大学 ラジオアッセイ検査科 (主任: 出村 博教授)

カキノハナ	ヒロコ	デムラ	レイコ	ジビキ	カズコ
垣花	啓子	・出村	黎子	・地曳	和子

オダギリ	エミ	デムラ	ヒロシ
小田桐恵美	・出村		博

西山堂病院

サノ	トモヒデ	キムラ	ヨウコ
佐野	智英	・木村	葉子

(受付 昭和63年11月22日)

Basic and Clinical Evaluation of a Measurement of 2',5' Oligoadenylate (2-5A) Synthetase Activity in Serum by RIA Kit

Hiroko KAKINOHANA, Reiko DEMURA, Kazuko JIBIKI,
Emi ODAGIRI and Hiroshi DEMURA

Radioassay Center (Director: Prof. Hiroshi DEMURA)

Tokyo Women's Medical College

Tomohide SANO and Yoko KIMURA

Nishiyamado Hospital

Basic and clinical evaluation of a measurement of 2',5' oligoadenylate (2-5A) synthetase activity in serum using radioimmunoassay (RIA) kit developed by Eiken ICL were reported. The method was simple, a sensitivity and a precision of the assay and dilution study were satisfactory. Inter- and intra-assay CV's were 9.4 and 9.3%, respectively. The values of 2-5A synthetase activity in serum were decreased by repeated freezing and thawing. 2-5A synthetase activity levels in normal subjects were 43.4 ± 24.8 pmol/dl ($M \pm SD$). In viral diseases such as common cold or viral hepatitis, 2-5A synthetase activity levels were increased in the beginning of infection and decreased with an improvement of clinical condition and laboratory findings. 2-5A synthetase activity levels were mostly normal in patients with bacterial infection or SLE with a few exception. The levels of the enzyme increased after a treatment with interferon- β in a patient with chronic hepatitis due to HB virus.

The data showed that a measurement of serum 2-5A synthetase activity by RIA is useful to differentiate viral diseases and bacterial infection and to observe anti-viral effects of interferon treatment.

はじめに

2'-5'オリゴアデニル酸 (2-5A) 合成酵素は、インターフェロン(IFN)に誘導される酵素の1つである。細胞内に誘導された酵素は、二重鎖RNAと結合した形でATPを基質として、ホスホジエス

テル結合でアデニル酸を重合させる。生じた2-5Aはリボヌクレアーゼを活性化してポリゾームを崩壊し、細胞やウイルスの蛋白合成を阻害すると考えられ、IFNの抗ウイルス作用発現にも密接に関連している¹⁾²⁾。

ウイルス感染によって組織、末梢リンパ球および血清中の2-5A合成酵素活性が上昇することから、血清中の本酵素活性の測定は細菌感染症との鑑別診断に有用であることが報告されている³⁾⁴⁾。また慢性B型肝炎のIFN療法における抗ウイルス効果の指標としても有用であることが報告されている⁵⁾⁶⁾。末梢血リンパ球の2-5A合成酵素活性の測定は、複雑な操作と長い時間を要し、検査室で実施するにはかなり困難であった。今回われわれは、ラジオイムノアッセイ法⁷⁾により血清中の2-5A合成酵素活性を測定する2-5A“栄研”RIAキットを使用する機会を得、基礎的および臨床的検討を行ったので報告する。

対象および方法

1. 対象

健常者83例(男性40例, 女性43例), ウイルス疾患として, かぜ症候群16例(白血球数 $6,000/\text{mm}^3$ 未滿, CRP陽性, 発熱・咳・鼻汁・頭痛・全身倦怠などの症状を呈する), インフルエンザ1例, ウイルス肺炎1例, 急性A型肝炎10例(未治療7例, 治療中3例), 急性B型肝炎6例(未治療1例, 治療中5例), 慢性B型肝炎(治療中8例), 細菌感染症6例(急性腎盂腎炎1例, 細菌性下痢1例, ブドウ球菌感染症4例), SLE 5例の計136例を対象とした。

2. キットの組成

- 1) ^{125}I 標識2-5A (凍結乾燥品: 蒸留水5mlで溶解)
- 2) 2-5A抗血清 (凍結乾燥品: 蒸留水5mlで溶解)
- 3) ポリ(I) ポリ(C) アガロース
- 4) 緩衝液(使用前にメルカプトエタノールを添加)
- 5) ATP (凍結乾燥品: 緩衝液25mlで溶解)
- 6) メルカプトエタノール
- 7) 標準2-5A液(0, 10, 30, 90, 270, 810pmol/dl)
- 8) フリー血清

3. 操作法 (図1)

被検血清, またはフリー血清溶液(標準用) 50 μl にポリ(I) ポリ(C) アガロース50 μl を加え室温

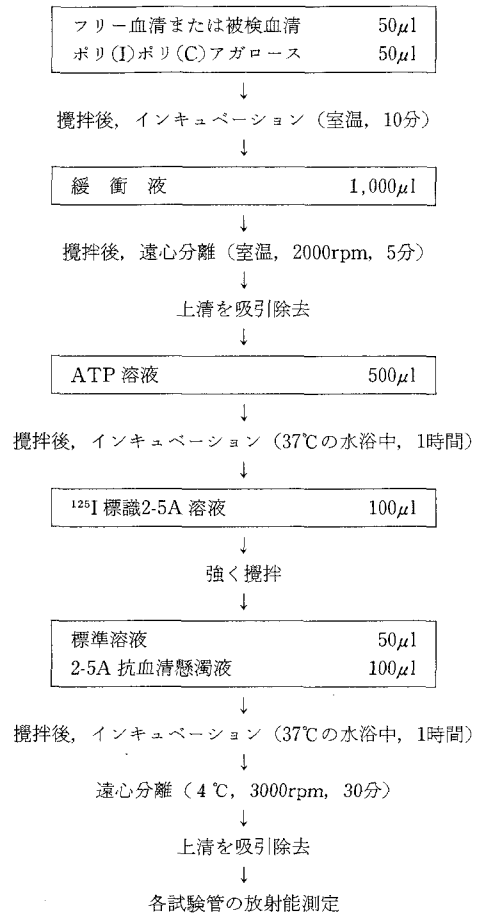


図1 操作法

で10分間放置することにより, 検体中の2-5A合成酵素を吸着させ, 活性化する. 次に, 緩衝液1mlで検体中の共存干渉物を洗浄除去し, 基質としてATP溶液500 μl を加えて37℃で1時間酵素反応させ, 2-5Aを産生させる. 産生した2-5Aに ^{125}I 標識2-5Aを100 μl , 標準溶液を50 μl , 2-5A抗血清・第2抗体混液を100 μl ずつ加え, 37℃で1時間インキュベーションし, 遠心分離して上清を吸引除去し, 各試験管の放射能を測定する。

結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線 (図2)

標準曲線は, 9回測定における各濃度の B/B_0 を $M \pm SD$ で示した. 各濃度におけるCVは1.4~5.7%で平均2.6%であり, 最小検出感度は

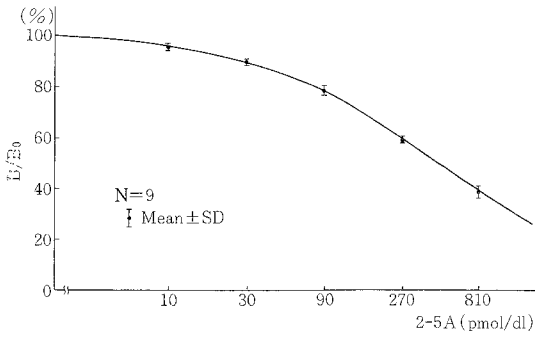


図2 標準曲線

表1 精度

サンプル No.	測定内再現性 (N=9)		測定間再現性 (N=9)	
	2-5A Mean±SD (pmol/dl)	CV (%)	2-5A Mean±SD (pmol/dl)	CV (%)
1	49.8±4.2	8.6	40.2±4.6	11.5
2	137.4±14.7	10.7	118.0±12.2	10.3
3	314.7±28.6	9.0	265.1±16.2	6.1

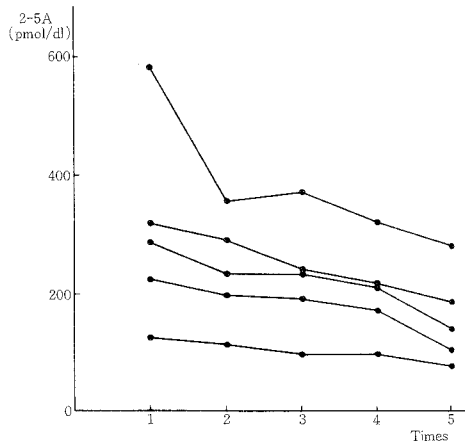


図3a 凍結融解を繰り返した場合の2-5A合成酵素活性の変化

10.0pmol/dlであった。

2) 精度 (表1)

3種類の濃度の異なるコントロール血清を用いて行った測定内再現性のCVは8.6~10.7%で平均9.4%, また測定間再現性は6.1~11.5%で平均9.3%であった。

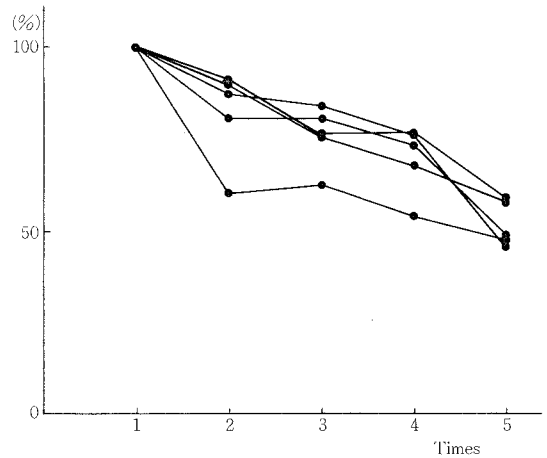


図3b 凍結融解を繰り返した場合の2-5A合成酵素活性の低下率

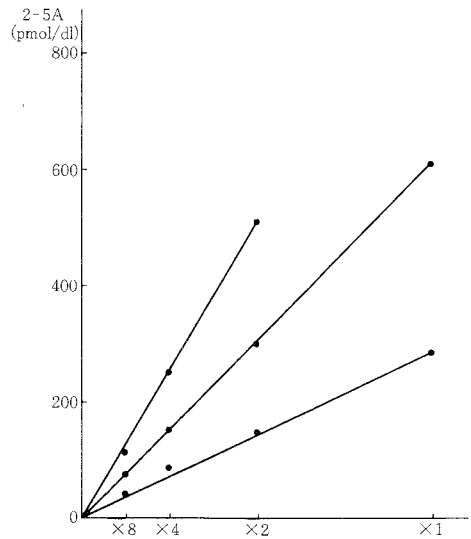


図4 希釈試験

3) 凍結融解の影響

5種類の血清について、凍結融解を繰り返した場合の測定値の変化を図3aに示した。全例で凍結融解の繰り返しにより明らかに2-5A合成酵素活性の低下を認めた。はじめの測定値を100%としたときの低下率を図3bに示した。2回目測定では60.4~91.0%で平均81.9%と低下を示し、さらに測定を繰り返すごとに徐々に低下する傾向を認めた。

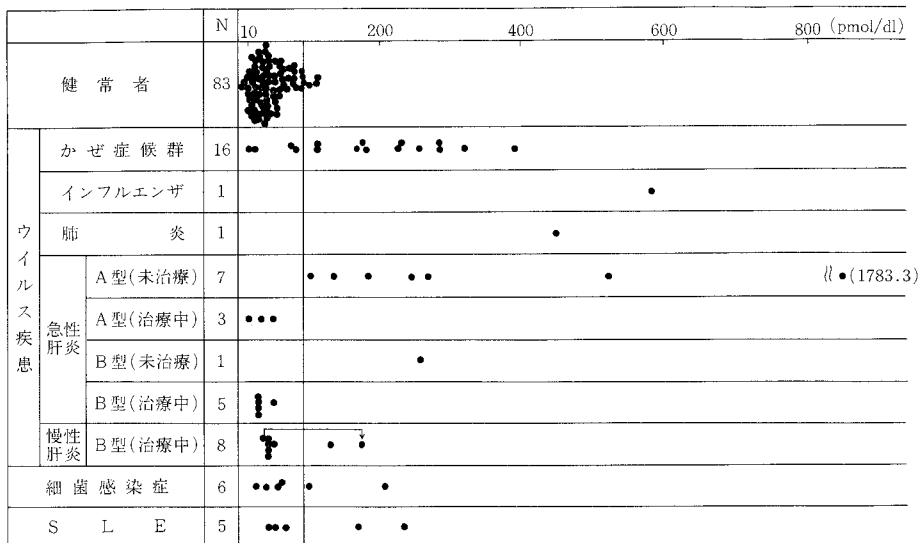


図5 健常者および各種疾患における2-5A合成酵素活性基礎値

4) 希釈試験

濃度の異なる高値3検体をフリー血清(2-5A合成酵素ゼロ血清)で2~8倍まで希釈した。図4に示すように原点を通る良好な直線が得られた。

2. 臨床的検討

1) 正常値 (図5)

健常者83例の2-5A合成酵素活性の測定値は、10.0以下~114.0pmol/dlに分布し、M±SDは43.4±24.8pmol/dlであった。正常値はM±2SDの93.0pmol/dl以下と設定した。

2) 各種疾患における2-5A合成酵素活性基礎値 (図5)

(1) ウイルス疾患

かぜ症候群16例では、12例が100pmol/dl以上の高値を示し、M±SDは183.7±109.4pmol/dlであった。インフルエンザ1例では583.5pmol/dl、ウイルス肺炎1例では450.6pmol/dlといずれも高値を示した。急性A型肝炎では未治療の7例は103.4~1783.3pmol/dlと高値を示し、治療中の3例は14.8~48.7pmol/dlと正常範囲内に分布し、治療の有無による2-5A合成酵素活性の差が認められた。急性B型肝炎では未治療の1例は255.4pmol/dlと高値を示し、治療中の5例は28.0~50.5pmol/dlと正常範囲内に分布した。慢

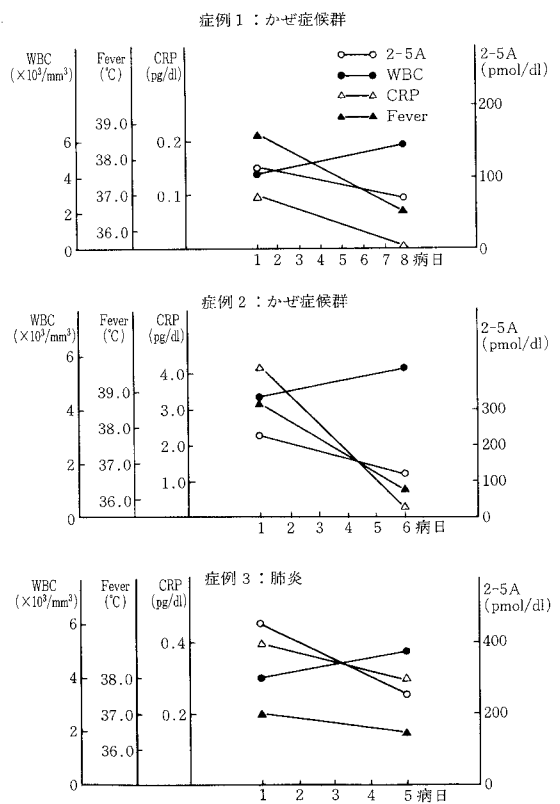


図6 ウイルス疾患における2-5A合成酵素活性および臨床症状の経過

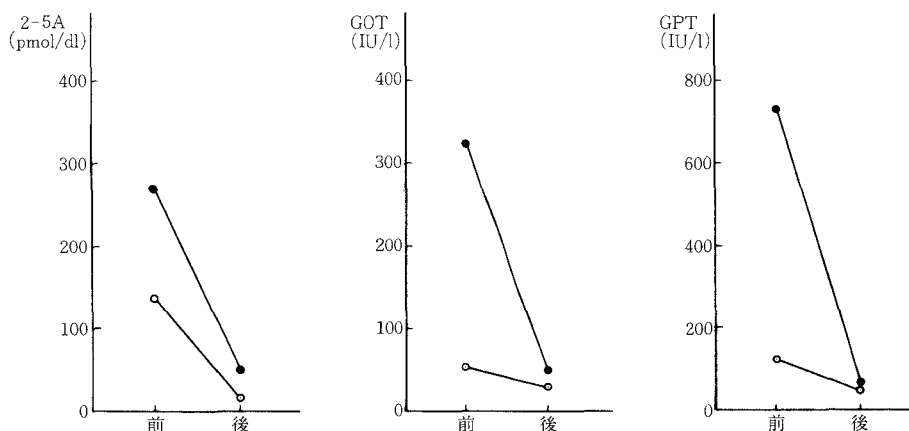


図7 A型急性肝炎における治療前後の2-5A合成酵素活性、GOT、GPTの変化

性B型肝炎では、強力ネオミノファーゲンC、アデラビン等の一般肝臓薬を投与している5例では35.2~50.7pmol/dl、抗ウイルス作用を有するAdenine arabinoside (Ara-A)を投与している1例では44.3pmol/dlといずれも正常範囲内に分布した。一般肝臓薬の治療を続けているにもかかわらず、急性増悪状態にある1例では132.2pmol/dlと高値を示した。またIFN- β 投与による治療開始9日目の1例では、治療前の35.2pmol/dlに比べ、176.1pmol/dlと酵素活性の上昇が認められた。

(2) 細菌感染症

細菌感染症6例では、25.0~209.6pmol/dlと2例を除いては正常範囲内に分布した。M \pm SDは81.8 \pm 67.5pmol/dlで、ウイルス疾患に比べ明らかに低値であった。

(3) SLE

SLE5例では47.5~236.4pmol/dlと正常値から高値まで幅広く分布し、M \pm SDは114.8 \pm 85.1pmol/dlであった。

3) ウイルス疾患における2-5A合成酵素活性および臨床症状の経過 (図6)

ウイルス疾患3例(かぜ症候群2例、肺炎1例)の経過を追跡した結果、全例において臨床症状が改善(体温の平熱化、白血球数増加、CRP値低下)するとともに2-5A合成酵素活性も低下し、1例では正常値となった。

4) 急性A型肝炎における治療前後の2-5A合

成酵素活性およびトランスアミナーゼの変化 (図7)

治療によりトランスアミナーゼ(GOT、GPT)が低下するとともに、2-5A合成酵素活性も高値から著しく低下し、正常値となった。

考 察

本キットによる基礎的検討の結果、標準曲線性、希釈試験はいずれも良好であった。本法はリンパ球ではなく血清を用いて2-5A合成酵素活性が測定でき、従来の方法に比べ簡便化されたが、酵素の吸着および活性化、2-5A産生、RIAと3つの過程を必要とするため、再現性に多少のばらつきが認められた。さらに凍結融解を繰り返した場合の影響を検討した結果、全例において測定値の低下を認めた。これは2-5A合成酵素が凍結融解による温度の変化により不活化されるため、2-5Aの産生が減少し測定値が低下したと考えられた。したがって凍結融解の繰り返しを避けるために、血清を小分けして凍結保存することが必要であると思われる。

臨床的検討の結果、健常者の血清中2-5A合成酵素活性の正常値は93.0pmol/dl以下であった。他の報告では、M \pm SDが36.8 \pm 36.5pmol/dl⁹⁾、40 \pm 42pmol/dl⁴⁾、75.6 \pm 41.0pmol/dl⁸⁾と様々であり各施設における正常範囲の相違が認められた。

ウイルス疾患において急性期の症例では有意に高値を示したが、治療中の症例では正常値を示し

た。小児に多く感染がみられる水痘，ムンプスでも，臨床症状の改善とともに本酵素活性が低値になるという報告¹⁰⁾がある。急性 A 型肝炎の症例では，治療前後において 2-5A 合成酵素活性が肝機能の改善 (GOT, GPT の低下) と平行して変化し，高値から正常値への低下を示した。また急性 B 型肝炎についても GOT, GPT, ビリルビンが高値を呈する病状初期には 2-5A 合成酵素活性が上昇し，臨床経過の改善とともに低下するという報告⁹⁾がある。これらのことから本酵素活性の変動が，ウイルス疾患のモニターとして治療の有効性ならびに経過を診断する上で有用であることが示唆された。一方，細菌性疾患では 1 例を除く他の症例がほぼ正常値を示し，ウイルス疾患との鑑別が可能であった。高値の 1 例についてはウイルスと細菌との混合感染が推測されるが，細菌の中には IFN を産生するものがあるとの報告¹¹⁾もなされている。

最近，慢性 B 型肝炎の治療法の 1 つとして IFN 療法が用いられている。2-5A 合成酵素が IFN により誘導されることから，血清中 2-5A 合成酵素活性の測定は慢性 B 型肝炎の患者体内における IFN の抗ウイルス作用効果を知る手がかりとして期待されている。実際，IFN 療法開始により血清中の 2-5A 合成酵素活性は高値を示すようになり，その増加率の上昇にともない抗ウイルス効果が増強する傾向にあるという報告⁶⁾がある。われわれの成績でも 1 例ではあるが，IFN 療法の開始前後の 2-5A 合成酵素活性を測定し同様の結果を得た。さらに肝細胞内での HB ウイルスの増殖を反映するマーカーである DNA ポリメラーゼ (DNA-P) 活性を同時に測定した結果，1,108cpm から 25cpm に低下し，IFN の抗ウイルス効果が示唆された。慢性 B 型肝炎の治療による HB ウイルス側の反応を知るマーカーとして，HBs 抗原抗体，HBe 抗原抗体，DNA-P などがある。これに加えて，2-5A 合成酵素活性が IFN 療法における抗ウイルス効果の指標となり得るので，治療効果，予後の判定上重要な情報になると思われる。

全身性の自己免疫疾患と考えられる SLE の患者血清中において，2-5A 合成酵素活性が正常値から

高値 (異常高値を含む) までの幅広い分布を示すとの報告⁸⁾⁹⁾¹²⁾があり，われわれの成績も同様であった。SLE の血清中には IFN (特に IFN- α) が検出される¹³⁾¹⁴⁾ことから，おそらく IFN を介して本酵素活性が高値を示すと考えられた。しかし個々の症例で，IFN の産生量および SLE の活動性の差などにより，本酵素活性が変化しない可能性も考えられた。また SLE に高い陽性率を示すといわれている抗 DNA 抗体と相関関係がみられない⁸⁾ため，SLE の診断や治療のモニターとしての有用性についてはさらに検討が必要と思われる。

まとめ

2-5A 合成酵素活性測定用 RIA キットについて基礎的ならびに臨床的検討を行った結果，本法は血清量が少なく，操作も簡便で，かつ短時間で測定でき，臨床的にはウイルス疾患と細菌感染症の鑑別診断および肝炎における IFN の治療効果を反映するモニターとして有用であると考えられた。

稿を終えるにあたり，本キットを提供して頂いた栄研 ICL に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Kerr IM, Brown RE: pppA2'p5'A2'p5'A: An inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferontreated cells. Proc Natl Acad Sci USA 75: 256-260, 1978
- 2) 宗川吉汪, 清水典明, 東雄二郎: インターフェロンと 2-5A システム. 蛋・核・酵 別冊 25 号: 209-219, 1981
- 3) 杉野禮俊, 出沢 亨, 篠原邦一ほか: ウイルス感染症と (2'-5') オリゴアデニル酸合成酵素活性. 医学のあゆみ 124: 967-970, 1983
- 4) 杉野禮俊, 三谷育子, 小池通夫ほか: ウイルス感染症の早期診断における血清 2-5A 合成酵素測定の有用性について, 2-5A RIA キットの使用経験. 小児科臨床 39: 999-1005, 1986
- 5) 菅原 俊, 松嶋 喬, 狩野吉康ほか: 血清 2'-5' オリゴアデニル酸合成酵素活性の臨床的意義. 肝臓 28: 310-318, 1987
- 6) 狩野吉康, 菅原 俊, 佐賀啓良ほか: 慢性 B 型肝炎のインターフェロン療法における血清 2'-5' オリゴアデニル酸合成酵素活性測定の意義. 医学と

- 薬学 17 : 423-428, 1987
- 7) **Sawai H, Ishibashi K, Itoh M et al:** 2',5'-Oligoadenylate and 2',5'-oligoadenylate phosphodiesterase in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 125 : 1061-1066, 1984
 - 8) 平木祥夫, 竹田芳弘, 中村哲也ほか: 全身性エリテマトーデスにおける血清 2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性測定の評価. *医学と薬学* 16 : 821-825, 1986
 - 9) 有井達郎, 芦刈靖彦, 上村純太ほか: SLE 患者における 2-5A 合成酵素. *医学と薬学* 16 : 1119-1122, 1986
 - 10) 八森 啓, 金田一孝, 南谷幹夫ほか: 2-5A 合成酵素活性値の臨床的意義について—各種感染症における 2-5A 酵素活性の比較—. *医学と薬学* 15 : 955-958, 1986
 - 11) **Torrence PF, Clercq EDE:** Interferon inducers: general survey and classification. *Methods Enzymol* 78 : 291-299, 1981
 - 12) **Preble OT, Rothko K, Klippel J et al:** Interferon-induced 2'-5' adenylate synthetase in vivo and interferon production in vitro by lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with and without circulating interferon. *J Exp Med* 157 : 2140-2146, 1983
 - 13) **Hooks JJ, Jordon GW, Cupps T et al:** Multiple interferons in the circulation of patients with systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Arthritis Rheum* 25 : 396-400, 1982
 - 14) **Ytterberg S, Schnitzer TJ:** Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25 : 401-406, 1982
-