

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬学）	氏名	秋本 菜里
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
エビによる食物依存性運動誘発アナフィラキシーの抗原解析			
論文審査担当者			
主査	教授	小澤 孝一郎	印
審査委員	教授	古武 弥一郎	
審査委員	准教授	湯元 良子	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>食物依存性運動誘発アナフィラキシー（FDEIA）を含む食物アレルギーの簡便かつ安全な検査法として，血清中の抗原特異 IgE 抗体価を測定する検査がある。しかし，本検査はエビによる FDEIA を診断する際に偽陽性や偽陰性を生じることが知られている。この理由として，特異 IgE 抗体の検出にエビの粗抽出タンパク質が利用されていることが考えられる。近年，精製抗原コンポーネントを利用した特異 IgE 検査である component-resolved diagnostics が，食物アレルギーの検査精度を向上させることが報告されている。本研究では，エビ FDEIA の血清学的検査の精度を向上させることを目的に，エビ FDEIA 患者の原因抗原を同定し，その精製を試みた。</p> <p>エビを摂取し運動を行った際にアナフィラキシーを生じた病歴を有する 8 名の FDEIA 患者血清と 2 名の健常者血清を用いて解析を行った。4 種の食用エビ（バナメイエビ，ブラックタイガー，タイショウエビ及びクルマエビ）のむき身から 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) で Tris 可溶性画分，および不溶性画分を抽出分離した。分画したタンパク質と患者血清 IgE 抗体との反応をウエスタンブロット法で解析した。その結果，4 名中 3 名の患者血清がバナメイエビ Tris 可溶性画分中の 43 kDa タンパク質，1 名が 70 kDa タンパク質と結合した。一方，4 名の患者血清はいずれも Tris 不溶性タンパク質と反応しなかった。同法にて，4 種のエビ可溶性画分と患者血清との反応を解析した結果，患者血清と 70 kDa タンパク質との反応は 4 種のエビ間で同程度であったが，43 kDa タンパク質との反応はバナメイエビで最も強かった。患者 IgE 抗体が特異的に結合したバナメイエビの 43 kDa および 70 kDa 抗原を同定するため，Tris 可溶性画分を二次元電気泳動で分離した後，ウエスタンブロット法にて IgE 結合タンパク質を検出した。その結果，患者 IgE 抗体は 70 kDa で等電点 pI 6 のタンパク質，および 43 kDa で pI 7.2, 7.6 及び 7.9 の 3 つのタンパク質に結合した。それぞれのタンパク質をゲルから切り出し質量分析法で解析した。70 kDa のタンパク質は fast muscle P75 protein の相同体（P75 homologue），40 kDa の 3 つのタンパク質は全て fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBPA) と同定された。以上の結果より，エビ FDEIA 患者の IgE 抗体が結合するバナメイエビの</p>			

P75 homologue と FBPA が、エビ FDEIA の新規抗原であることが示唆された。

次に、バナメイエビより P75 homologue と FBPA の精製を試みた。Tris 可溶性画分を硫酸アンモニウム分別沈殿法で濃縮・分離した結果、40–60%及び 20–40%の硫酸アンモニウム沈殿画分に P75 homologue と FBPA がそれぞれ濃縮された。40–60%画分を逆相カラムクロマトグラフィーでさらに精製した結果、純度の高い P75 homologue を得ることができた。また、20–40%画分を陰イオン交換クロマトグラフィーと疎水性相互作用クロマトグラフィーで順次分離した結果、純度の高い FBPA を得ることができた。以上の結果から、硫酸アンモニウム分別沈殿法と各種クロマトグラフィーを組み合わせる方法で、バナメイエビの Tris 可溶性画分から P75 homologue と FBPA を精製することに成功した。

さらに、精製した P75 homologue 及び FBPA に対するエビ FDEIA 患者 IgE 抗体の結合をウエスタンブロット法で確認した結果、P75 homologue の陽性率は 12.5% (8 名中 1 名)、FBPA は 37.5% (8 名中 3 名) であった。また、健常者や即時型エビアレルギー患者の血清では反応が認められなかった。以上の結果から、P75 homologue と FBPA はエビ FDEIA 患者の特異的な抗原であることを明らかにした。

以上、本研究では、1) エビによる FDEIA の抗原として P75 homologue と FBPA が重要であること、2) 硫酸アンモニウム分別沈殿法と各種クロマトグラフィー法を組み合わせる方法でバナメイエビより両抗原を精製できること明らかにした。本研究で純度の高いエビ抗原を用いた検査が可能となったことで、エビ FDEIA の診断の精度の飛躍的な向上、および精製抗原を利用した減感作療法の開発が大いに期待される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（薬学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。