

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	古賀 祐基
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
<p style="text-align: center;">Amplified luminescence proximity homogeneous assay 法を用いた 自己免疫性蕁麻疹の新規検査法の開発</p>			
論文審査担当者			
主査	教授	小池 透	印
審査委員	教授	高野 幹久	
審査委員	准教授	柳瀬 雄輝	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>自己免疫性蕁麻疹（aiCSU）患者の多くは，IgE 抗体や高親和性 IgE 受容体 α サブユニット（FcϵRIα）に対する IgG 自己抗体を有している。現在，aiCSU は，自己血清皮内テスト（ASST）やヒスタミン遊離試験（HRT）の結果をもとに診断されている。しかし，ASST はしばしば偽陽性が認められ，HRT は検査に健常者の好塩基球を必要とするなど汎用性に欠点がある。また，ELISA 法などの免疫学的検査法は，ヒスタミン遊離活性を持たない自己抗体が検出されることがあり，aiCSU 診断の特異性が低い。本研究では，簡便かつ高精度な自己免疫性蕁麻疹の新規検査法を開発することを目的として，FcϵRIα または IgE 抗体で標識した amplified luminescence proximity homogeneous assay ビーズを用い，FcϵRI 受容体架橋能を有する自己抗体を検出する方法（AlphaCL 法）を構築し，その有用性を評価した。</p> <p>ASST または HRT で陽性を示した aiCSU 患者 21 名，および健常者 9 名（コントロール）の血清を用いた。HRT は，2 名の健常者末梢血から得られた好塩基球を用いて実施した。未処理および乳酸処理により IgE を除去した好塩基球に患者血清を添加し，37°C で 40 分間反応させ，上清中および細胞に残存したヒスタミン量を HPLC で測定した。各ヒスタミン量からヒスタミン遊離率を算出し，遊離率が 5% 以上を陽性とした。本研究では，乳酸処理した好塩基球からのヒスタミン遊離率が未処理の遊離率より高い場合を抗 FcϵRIα 自己抗体型と定義した。AlphaCL 法による抗 FcϵRIα 自己抗体の検出は，リコンビナントヒト FcϵRIα で標識したアクセプタービーズ（終濃度 20 μg/mL）およびドナービーズ（5 μg/mL）を用い，4% に希釈した血清と室温・遮光下で 1 時間反応させた。また，抗 IgE 自己抗体の検出では，ヒト IgE で標識したアクセプタービーズ（20 μg/mL）とドナービーズ（20 μg/mL）を 1% の血清と室温・遮光下で 24 時間反応させた。反応終了後，マルチモードプレートリーダーで発光強度を測定した。</p> <p>HRT の結果，21 名の aiCSU 患者のうち，抗 FcϵRIα 自己抗体型の患者は 9 名，抗 IgE 自己抗体型の患者は 4 名，どちらにも陰性を示した患者は 8 名であった。</p>			

AlphaCL を用いて、aiCSU 患者血清中の抗 FcεRIα 自己抗体を検出した結果、健常者血清ではシグナルが検出されなかったが、患者血清では 21 名のうち 13 名（62%）で蛍光シグナルが検出された。このとき、抗 FcεRIα 自己抗体に対する HRT 陽性を示した患者 9 名のうち 7 名（78%）でシグナルが検出された。一方、HRT 陰性患者 12 名のうち 6 名でもシグナルが検出された。HRT 陽性患者における AlphaCL のシグナル平均値（7,053 counts）は、陰性患者（291 counts）よりも高い値（ $P = 0.07$ ）を示した。以上の結果から、AlphaCL は HRT で検出できなかった抗 FcεRIα 自己抗体も検出できる可能性が示唆された。今後、さらに検体数を増やして AlphaCL の感度や特異度、カットオフ値を定める必要がある。

次に、AlphaCL を用いて、aiCSU 患者血清中の抗 IgE 自己抗体を検出した結果、健常者血清ではシグナルは検出されなかったが、患者血清では 21 名のうち 3 名（14%）でシグナルが検出された。このとき、抗 IgE 自己抗体に対する HRT で陽性を示した患者 4 名のうち 2 名（50%）でシグナルが検出された。HRT 陽性患者における AlphaCL のシグナル平均値（1,042 counts）は、陰性患者（159 counts）よりも高い値（ $P = 0.05$ ）を示した。本研究では、AlphaCL による抗 IgE 自己抗体の検出感度は抗 FcεRIα 自己抗体の検出感度よりも低かった。その要因として、血清タンパク質が抗 IgE 自己抗体の IgE 抗体への結合を阻害している可能性が考えられる。今後、血清タンパク質を除去するなどの方法で検出感度を向上させる必要があると考えられた。

以上、本研究では、aiCSU 患者の血清中に含まれる抗原架橋能を有する自己抗体を検出する新規検査法の開発に成功した。AlphaCL による抗 FcεRIα と抗 IgE 自己抗体の検出感度（15/21, 71%）は HRT（13/21, 62%）よりも高く、簡易的かつ実用的な検査法であることを明らかにした。本研究の成果は今後、aiCSU 患者の新しい臨床診断法への実用化が期待される。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。