

最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 論 第	33 号	学位申請者	宮下 圭一
審 査 委 員	主 査	橋口 照人	学 位	博士 (医学)
	副 査	井上 博雅	副 査	原 博満
	副 査	西 順一郎	副 査	松口 徹也

主査および副査の5名は、平成30年11月26日、学位申請者 宮下 圭一 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) IL-12p40 の測定のとときに、BALB/c マウスと異なるマウスを使用したのはなぜか。
 (回答) 使用したのは BALB/c のナイーブマウスである。また PC の樹状細胞への影響をみるため、免疫したマウスではなくナイーブマウスを使用した。

質問2) Th2 型のサイトカインである IL-5 や IL-13 は調べているのか。
 (回答) Th1 と Th2 のバランスを比較するため、IL-4 と IFN- γ のみ測定したが、IFN- γ は検出限界以下であったので、IL-4 のみ提示した。IL-5 や IL-13 もアレルギー性炎症の発症に関与することから、測定する必要があったと考える。

質問3) PC はどのようにマウスやヒトの生体内に存在しているのか。
 (回答) 例えば一般的に PC はセラミドと結合してヒトの細胞膜に存在する膜リン脂質の一種であるスフィンゴミエリンを形成している。そのため、神経細胞の軸索を覆うミエリン鞘や赤血球膜にも存在する。

質問4) 樹状細胞 (DC) の TLR4 が関与している根拠はあるのか。
 (回答) 今回の研究結果からは DC の TLR4 が直接関与している根拠を示すことはできない。しかし LPS は DC の TLR4 と結合して、MyD88-シグナル伝達経路を介して IL-12 の産生を誘導することが報告されており、PC を含む糖タンパクである ES-62 も TLR4 と結合することから、PC 刺激においても LPS と同様に TLR4 を介して IL-12p40 の産生が亢進したと推測した。

質問6) PC ではなく、例えば LPS や CPG の使用を検討してもよいのではないか。
 (回答) LPS や CPG でも今回と同様にアレルギー性鼻炎を抑制できると考えられる。しかし、本研究では PC が粘膜免疫応答を誘導し、細菌感染症を抑制するのみならず、アレルギー性炎症をも抑制できるかどうかを明らかにするため、PC を使用した。

質問7) PC はどのように KLH にコンジュゲートされているのか。ポリバレントな抗原と考えていいのか。
 (回答) PC とキャリア蛋白である KLH とのコンジュゲート方法については添付文書に記されていないため不明である。(論文中の考察にも記しているが) KLH 以外にも、卵白アルブミンとコンジュゲートした PC-OVA、PC を含む ES-62 や酸化物質を用いた研究がなされているが、それぞれで免疫応答が異なることから、PC はポリバレントな抗原 (ハプテン) と考えられる。

質問8) Treg の関与は見たか。また考察で記載されている寄生虫の文献について、寄生虫の種類は何か。
 (回答) Treg の関与は見えていない、寄生虫の種類は線虫である。

質問9) 今回は PC-KLH を用いているが、KLH のみを投与したときの影響はどうか。

最終試験の結果の要旨

(回答) 予備実験として検討している。KLH 単独刺激の場合でもアレルギー性鼻炎症状や血清中の IgE の産生が若干抑制されていたが、有意ではなかった。

質問 10) 今回は OVA 感作前の PC 投与の実験であるが、例えば OVA 感作後に PC を投与しても同じような結果がでると考えているのか。

(回答) OVA 感作後に PC を投与する実験を本研究の後に行っており、感作後の PC 投与でもアレルギーの症状と血清 IgE の産生が抑制された。

質問 11) メスの BALB/c マウスを使用したのはなぜか。

(回答) オスを同じゲージ内で飼育すると喧嘩をするため、免疫関連の実験では通常メスが使用されている。また創傷によって PC に対する免疫応答に影響があることが危惧されたこともその理由である。

質問 12) PC は、細胞膜それとも細胞壁に存在するのか。

(回答) 細胞膜にも存在するが、肺炎球菌などのグラム陽性菌では細胞壁に、インフルエンザ菌などグラム陰性菌では細胞壁の外側にある外膜に主として存在する。

質問 13) ヒトの生体内にある PC は細胞の表面に表出しているのか。

(回答) ヒトの生体内にも PC は存在し、例えば赤血球の細胞膜にも含まれ、表出している。しかし、自然抗体である PC 特異的 IgM 抗体はこれを攻撃することではなく、これらの細胞が壊されたときに活性化されるため、自己免疫疾患は発症しないと考えられる。

質問 14) 口腔内常在菌にも PC は含まれると思われるが、PC ワクチンによる影響はないのか。

(回答) PC をワクチンとして使用すると口腔内常在菌叢を乱すことが危惧される。しかし口腔内常在菌は PC の発現が低く、また PC 以外の接着因子により上皮に接着するため、PC 特異的免疫応答の誘導によって口腔内常在菌が影響を受けることは少ないと考えられる。

質問 15) PC はどこに作用するのか。

(回答) PAF-R が存在する上皮細胞や血管内皮細胞、好中球など様々な細胞に作用すると考えられている。

質問 16) PAF のアレルギー性鼻炎における役割は何か。

(回答) PAF は血管内皮細胞の PAF-R と結合し、血管拡張や透過性亢進を齎すことが知られている。

質問 17) PC と KLH の結合の状態はどのようになっているのか。

(回答) チロシンを介して結合することが知られているが、その詳細については不明である。

質問 18) PC-KLH はコマーシャルベースで存在するものを使用したのか。

(回答) Biosearch 社から購入した。

質問 19) IgE は免疫後に自然経過として低下するとは考えられないか。

(回答) IgE 抗体はその半減期が 2 日と他の免疫グロブリンよりも短く、アレルゲンによる刺激がなくなれば、自然経過として低下すると考えられる。しかし本研究では、PC 経鼻免疫で IgE の産生が有意に抑制されており、自然経過の影響はないと考える。

質問 20) Treg は MAST 細胞と関連があると言われているが、今回の鼻粘膜組織で MAST 細胞は確認したのか。

(回答) MAST 細胞については確認していない。

質問 21) KLH はタンパク質の一種か。

(回答) KLH はスカシ貝の麻痺性貝毒から精製され、免疫研究では PC のキャリア蛋白として使用されている。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。