

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 572 号		学位申請者	今給黎 亮
審査委員	主査	金蔵 拓郎	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	嶽崎 俊郎	副査	井上 博雅
	副査	原 博満	副査	岡本 康裕

主査および副査の5名は、令和2年7月20日、学位申請者 今給黎 亮 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) 魚アレルギー患者での症状の再現性はあるか。魚を食べると必ず症状が出るか。

(回答) 蛋白質の変性の度合いと摂取の総量に依存する。アレルゲン性の残存した魚を一定量以上摂取した場合には、症状の再現性がある。

質問2) 食物アレルギー診療における食物経口負荷試験の信頼度のレベルは高いか。

(回答) 食物アレルギーの診断の gold standard になっており、信頼度は高い。

質問3) 食物アレルギーへの年齢の影響はあるか。

(回答) 食物アレルギーは一般的には小児期に発症し年齢が上がるとともに寛解していくことが多いと言われているが、成人発症の症例もみられる。魚アレルギーは調理時の経皮感作と考えられる成人発症例も観察される代表的な食材であり、今回の研究に成人例も含んでいる理由である。

質問4) 魚種毎のアレルギーの有無別に好塩基球活性化試験(BAT) scoreを比較したグラフで、ばらつき度合いが異なる理由は。

(回答) BAT scoreは陽性コントロールへの反応性の個体によるばらつきが大きい検査で、今回はBAT scoreを陽性コントロールへの反応との比で算出したため、1つの魚種でBATの検査を行った症例の陽性コントロールへの反応性に偏りがあるとBAT scoreのばらつきにも偏りが生じる可能性がある。

質問5) BAT scoreを用いて、臨床医の正診率を評価する、というような使い道もあり得るか。

(回答) BATの検査の信頼性が確立できれば、そのような使い道の可能性はある。

質問6) Low-responderについては、再現性があるか。

(回答) BATの検査でのLow-responderの集団が存在することはこれまでも報告されており、その集団では再現性が見られる。

質問7) BATの結果と特異的IgE抗体価と一致しない症例はいたか。

(回答) いた。特異的IgE抗体価が陽性で、BATの結果が陰性の症例の割合が多く、そのような症例では臨床診断としても魚アレルギーではないという診断である率が高かった。

質問8) 標準化されたパルブアルブミンのBATで、スクリーニングができる可能性があるか。

(回答) 今回の研究では標準化されたパルブアルブミンを使用したBATは行っていない。パルブアルブミンに対する特異的IgE抗体価の測定は比較的高い診断予測能を有していたので、それはスクリーニングとして利用できる可能性はある。

質問9) CD63の発現の観察と、CD203cの発現の観察では何が違うのか。CD203cを選択した理由は。

(回答) BATとして最初に確立されたのはCD63の発現を観察する検査であり、その後CD203cの発現増強を観察する方法が確立された。検査の精度についてはCD63の感度が高いとする報告とCD203cの感度が高いとする報告のどちらもみられ、現在はどちらもほぼ同等の評価がなされている。今回はベックマンコールター社のCD203c発現増強を観察するキット製材が利用できたので、それを利用するためCD203cを選択することになった。

質問10) CD63を測定するキットもあるのか。

(回答) CD63を測定するキットと、CD63とCD203cを同時測定するキットが存在する。

質問11) 今回はCD63の発現での検討はしていないのか。

(回答) 今回はCD63の検討はしていない。

質問12) CD63、CD203cはいずれもエンドソームに存在するものが細胞膜上に発現するのか。

(回答) そのように理解している。

最終試験の結果の要旨

質問 1 3) 蛋白抽出液の作成で電子レンジでの加熱沸騰を行っているが、生魚でのみ症状が出現する患者の検査結果への影響はあるか。加熱処理をする理由は、加熱処理の有無で検査結果に違いがあるか。

(回答) パルプアルブミンは短時間の加熱では変性しにくいと言われており、120℃で60分間加熱することでパルプアルブミンのアレルゲン性の低下が観察されるという文献がある。本研究でも加熱処理を行っておりアレルゲン性の残存しているパルプアルブミンがある程度減少している可能性はあるが、今回は沸騰後最大で2分間の加熱であるため大部分のアレルゲン性は残存しており検査結果への影響は少ないと考えられる。加熱処理は蛋白抽出の効率を上げるために行った。加熱処理を行った抽出液と行っていない抽出液での検討は行っていない。

質問 1 4) アニサキスへの感作の確認方法は、

(回答) 保険収載されている臨床検査であるアニサキス特異的 IgE 抗体価の測定で行った。

質問 1 5) Low-responder で除外された症例の中に、食物経口負荷試験で陽性だった症例はあるか。

(回答) あった。Low-responder はあくまで検査上でのみられる判定不能な集団であり、BAT で Low-responder である症例が臨床症状としてアレルギー反応を起こさない、ということではない。

質問 1 6) 陽性コントロールとの比で見なかった場合の検査結果はどうなるか。

(回答) 陰性コントロールとの比で抗原刺激試験の結果を表した Stimulation Index 値も算出して検討したが、ほぼ同様の結果だった。

質問 1 7) 全血での検査ということは、赤血球の混入があると考えるとよいか。

(回答) 検体処理のなかで溶血処置を行うので、赤血球の混入はない。

質問 1 8) 正診率が魚種によってばらつきがあり、低いもので60%というのはあまり診断予測能は高くないのでは。

(回答) 食物アレルギーの診断のゴールドスタンダードは食物経口負荷試験であり、臨床検査の正診率は一般的にあまり高くないので、今回の結果は他の検査と比較して十分な診断予測能があると考えられる。

質問 1 9) どれかの魚種の BAT で陽性に出れば、魚アレルギーと診断できるのか。

(回答) 魚全体としてのアレルギーの有無を確認することではなく、特定の魚種に対してのアレルギーがある可能性を評価する検査、という位置づけになるので、アレルギーを疑った魚種もしくは摂取が確認できていない魚種について BAT を行い、その可能性を確認することになる。

質問 2 0) 陰性コントロールには何かのアレルゲンを用いているのか。

(回答) 用いていない。検査検体には該当する魚種の抗原抽出液を PBS で溶解したものを反応させ、陰性コントロールは PBS のみを反応させている。

質問 2 1) 陰性コントロールの PBS での刺激で CD203c の発現増強が起きる症例はあるか。

(回答) 今回検討した症例では、陰性コントロールでの発現増強はほとんど起きていなかった。

質問 2 2) この検査結果を実際に臨床に用いているのか。

(回答) 研究的な検査なので、直接臨床の判断に用いることはしていない。食物経口負荷試験を行う魚種の選定や優先順位を決める際に参考にしている。

質問 2 3) サバの診断予測能が他の魚種よりも劣るようにみえるが、どのように考察しているか。

(回答) サバはヒスタジンの含有量が多くヒスタミン中毒を起こす代表的な魚種として知られている。今回はヒスタミンの産生を抑えるために迅速な魚肉の処理を行ったが、今回の抽出液中のヒスタミン濃度の測定を行っていないので、他の魚種よりもヒスタミンによる検査結果の誤差が出ている可能性は否定できない。

質問 2 4) 魚抽出液中のアレルギーコンポーネント4つの含有量について確認はしているか。

(回答) していない。

質問 2 5) BAT のための採血を行う時点での食物アレルギーの治療・介入が検査結果に影響を与えている可能性はあるか。

(回答) 食物アレルギーの介入は原因食物の除去であり、治療薬はない。合併している他のアレルギー疾患の治療で抗ヒスタミン薬や抗アレルギー薬を内服している症例はあったが、採血前72時間は内服を中止してもらっているため影響はないと考えられる。

質問 2 6) シェーマで CD63 が好塩基球の細胞膜上に載っているように記載されているが、正しいか。

(回答) CD63 はエンドソーム内の分泌顆粒に発現している膜蛋白で、脱顆粒の際にヒスタミンなどの分泌顆粒が分泌されることにより細胞表面で CD63 が検出されるようになる。

質問 2 7) HRT(ヒスタミン遊離試験)と BAT の違いは、

(回答) BAT は全血を用いてアレルゲンと反応した後の好塩基球表面の CD63 もしくは CD203c の発現増強をフローサイトメトリで検出する方法で、HRT は全血から好塩基球を分離しアレルゲンと反応させた後に放出されたヒスタミンを ELISA で測定しヒスタミン遊離率を算出して好塩基球の反応を観察する。ハプテンなど低分子のアレルゲンは単独では Fcε 受容体を架橋できず、特定の蛋白質と結合して分子量が大きくなって初めて Fcε 受容体を架橋して好塩基球の活性化が起きるので、抗原反応時に患者血清が存在する BATの方が検出率が高くなる。

質問 2 8) CD203c の分子の機能は、

(回答) CD203c は ATP 分解酵素であり、活性化された好塩基球は ATP を分泌し分泌された ATP が好塩基球のアレルギー反応をさらに増強させる作用を持つため、活性化された好塩基球の細胞膜上に CD203c の発現が増強して ATP を分解することで、過剰なアレルギー反応が惹起されることを予防している。

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