

論 文 内 容 要 旨

題目 Measurement of allergen-specific secretory IgA in stool of neonates, infants and toddlers by protection against degradation of immunoglobulins and allergens

(免疫グロブリンとアレルゲン分解を抑制することによる新生児、乳児、幼児便中のアレルゲン特異的分泌型 IgA の測定)

著者 Norio Kamemura*, Miwa Takashima*, Hideaki Morita, Kenji Matsumoto, Hirohisa Saito, and Hiroshi Kido

*These two authors contributed equally to this work

平成 27 年 8 月発行 The Journal of Medical Investigation
第 62 巻第 3, 4 号に掲載予定

内容要旨

アレルギーは年々罹患率が上昇しており、国民病の一つとして位置づけられている。新生児、乳幼児期のアレルギーの一つに、Gastrointestinal food allergy があり時に重度の消化器症状を伴うが、その発症原因や予防法と共に、便中のアレルゲン特異的分泌型 IgA の測定法は未だ開発されていない。本論文では、新生児、乳児、幼児便中のアレルゲン特異的分泌型 IgA の測定方法を検討した。

実験では、生後 0-36 ヶ月齢の 10 人の健康な新生児、乳児、幼児の便を採取後、速やかに蛋白質分解酵素阻害剤の存在下と非存在下で免疫グロブリンを抽出して測定に用いた。アレルゲン特異的分泌型 IgA の定量は、各種牛乳抗原と卵抗原を搭載した Densely carboxylated protein chip (DCP chip) を用いて測定した。DCP chip 法は当研究室が開発した微量検体による高感度アレルゲン特異的抗体価測定法で、多項目のアレルゲン特異的抗体を一度に定量するだけでなく、アレルゲンプロファイリングパターンを観察できるデバイスである。

蛋白質分解酵素阻害剤非存在下の便抽出検体を DCP chip と反応させたところ、アレルゲン特異的分泌型 IgA が全く検出されないだけでなく、内部標準として搭載した IgA シグナルが著しく減弱しており、便中のプロテアーゼによる IgA とアレルゲンの分解が示唆された。そこで便中の各種プロテアーゼ活性を測定し、免疫グロブリンとアレルゲン分解を抑制する蛋白質分解酵素阻害剤を検討して以下の結果を得た。

様式(8)

- 1) 新生児期から乳児期への移行に伴って、便中の serine protease と metalloprotease はそれぞれ 8-9 倍、6-7 倍増加したが、cystein protease と amino peptidase は 2 倍程度の増加であった。また乳児期から幼児期への移行では、各種 protease の値に大きな変化は認められなかった。
- 2) IgA 分解に係わる便中の protease は、各種阻害剤の検討から Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 感受性の serine protease と判定された。serine protease の中でも消化酵素の trypsin や chymotrypsin 阻害剤が無効であったことから、IgA 分解は主に腸内細菌が分泌する protease によると推定された。
- 3) 乳児期、幼児期の便の中には、PMSF によって IgA 分解が 100% 阻害されない検体があったが、さらに leupeptin を添加することで阻害率 100% が達成された。
- 4) DCP chip に搭載された牛乳と卵の各種アレルゲンも、便中の protease で分解されたが、この分解も PMSF でほぼ 100% 阻害された。なお protease 阻害物質である ovomucoid だけは、便中の protease による分解を受けなかった。

以上の結果から、生後 0-36 ヶ月齢の新生児、乳児、幼児の便中のアレルゲン特異的分泌型 IgA の定量には、便中の protease を予め PMSF に leupeptin を加えた阻害剤カクテルで処理し、アレルゲンと IgA の分解を抑制した上で測定する必要があることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第1241号	氏名	高島 美和
審査委員	主査 香美 祥二 副査 福井 清 副査 坂口 末廣		

題目 Measurement of allergen-specific secretory IgA in stool of neonates, infants and toddlers by protection against degradation of immunoglobulins and allergens
 (免疫グロブリンとアレルゲン分解を抑制することによる新生児、乳児、幼児便中のアレルゲン特異的分泌型 IgA の測定)

著者 Norio Kamemura*, Miwa Takashima*, Hideaki Morita, Kenji Matsumoto, Hirohisa Saito, and Hiroshi Kido

*These two authors contributed equally to this work.

平成 27 年 8 月発行 The Journal of Medical Investigation 第 62 巻第 3, 4 号に掲載予定
 (主任教授 木戸 博)

要旨 アレルギーは年々罹患率が上昇して、国民病の一つとして位置づけられている。新生児、乳幼児期のアレルギーに Gastrointestinal food allergy があり、時に重度の消化器症状を伴うが、その発症原因や予防法、便中のアレルゲン特異的分泌型 IgA (SIgA) の測定法は未だ開発されていない。

申請者らは、新生児、乳児、幼児便中のアレルゲン特異的 SIgA の測定方法を検討した。アレルゲン特異的 SIgA の定量は、牛乳抗原と卵抗原を搭載した Densely carboxylated protein chip (DCP chip) を用いて測定した。

便を蛋白質分解酵素阻害剤非存在下に抽出して、アレルゲンと内部標準 IgA を搭載した DCP chip と反応させたところ、アレルゲン特異的 SIgA が検出されないだけでなく、内部標準 IgA シグナル

の著しい減弱が見られた。このことから、便中プロテアーゼによる IgA とアレルゲンの分解が示唆された。そこで便中の各種プロテアーゼ活性を測定し、IgA とアレルゲン分解を抑制する蛋白質分解酵素阻害剤を検討して以下の結果を得た。

- 1) 新生児期から乳児期への移行に伴って、便中の serine protease と metalloprotease はそれぞれ約 8-9 倍、6-7 倍増加したが、cysteine protease と aminopeptidase は約 2 倍程度の増加であった。また乳児期から幼児期への移行では、各種 protease の値に大きな変化は認められなかった。
- 2) 1 ヶ月齢乳児の便中の IgA 分解に係わる protease は、阻害剤の検討から phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 感受性の serine protease と判定された。中でも消化酵素の trypsin や chymotrypsin 阻害剤が無効であったことから、この時期の便中の IgA 分解 protease は主に腸内細菌の分泌する protease によると推定された。
- 3) 6-7 ヶ月齢乳児、1-3 歳幼児の便中には、IgA 分解が PMSF によって完全に阻害されない検体があったが、さらに leupeptin を添加することで阻害率 100%が達成された。
- 4) DCP chip に搭載された牛乳と卵アレルゲンも便中の protease で分解されたが、この分解も PMSF でほぼ 100%阻害された。
- 5) PMSF と leupeptin を含む阻害剤カクテルで便を処理することで、便中のアレルゲン特異的 SIgA の分解も抑制され、定量が可能となった。

以上の結果から、生後 0-36 ヶ月齢の新生児、乳児、幼児の便中のアレルゲン特異的 SIgA の定量には、予め PMSF と leupeptin を含んだ阻害剤カクテルで便中の protease 活性を抑制した上で測定する必要があることが明らかになった。

本研究は、新生児、乳児、幼児の便中アレルゲン特異的 SIgA 測定法開発の進歩に寄与するものと考えられ、その医学的意義は大きく学位授与に値すると判定した。