




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 号	氏 名	安田 愛子
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	西園 晃 
		副査氏名	山岡 吉生 
		副査氏名	野口 剛 
<p>論文題目 A novel diagnostic monoclonal antibody specific for <i>Helicobacter pylori</i> CagA of East Asian type (ヘリコバクター・ピロリ菌が有する東アジア型 CagA タンパクに対する、新しい診断用モノクローナル抗体の開発)</p> <p>論文掲載雑誌 Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica</p> <p>ヘリコバクター・ピロリ菌（ピロリ菌）の胃・十二指腸病変における関わりは周知だが、分子生物学および分子疫学研究から、病原遺伝子をコードする CagA のアミノ酸配列に特徴があり、東アジア型 CagA を有するピロリ菌は欧米型 CagA を有するピロリ菌よりも病原性が高いことが示唆されている。ピロリ菌により引き起こされる胃発癌における役割を評価するうえで、CagA の 2 つのタイプを正しく診断する事は非常に重要である。このため、東アジア型 CagA を特異的に認識するモノクローナル抗体(MAb)を作製し、これを用いた免疫組織化学法ならびにサンドイッチ enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法で両者を正しく診断することを目的とする研究を行った。</p> <p>東アジア型 CagA 蛋白に特徴的なペプチド AINRKIDRINKIASAGKG を免疫されたマウスの脾臓とミエローマ細胞株 Sp2/0-Ag14 を細胞融合させハイブリドーマを得た。ELISA 法でスクリーニングを行い限界希釈法で MAb を樹立し、ウェスタンブロットリング、免疫組織化学、蛍光免疫組織化学にて抗体の特異性の検証を行った。東アジア型 CagA を特異的に検出するサンドイッチ ELISA 法の開発は、4,000 倍に希釈した MAb を含む腹水を ELISA プレートにコートした後、250µg/ml に調整したピロリ菌抽出液を反応させた。次に、抗東アジア CagA ポリクローナル抗体を、さらに 2 次抗体を反応させた後 o-phenylenediamine を基質として発色させ、15 分後の吸光度を測定した。本学総合診療部消化器内科に保存してあるピロリ菌 32 株（東アジア型 25 株、欧米型 7 株）に対してサンドイッチ ELISA 法を行い、その結果を receiver-operator characteristic(ROC)法で解析した。</p> <p>ウェスタンブロットリング法により、作製した MAb は東アジア型 CagA のみに反応し、欧米型 CagA には反応しなかった。ホルマリン固定パラフィン包埋されたピロリ菌感染胃粘膜の、MAb による免疫組織化学では、東アジア型 CagA 陽性ピロリ菌が感染している胃粘膜のみでピロリ菌に一致した強いシグナルを検出した。ピロリ菌感染胃粘膜において、CagA の局在を MAb と抗ピロリ菌抗体により免疫蛍光二重染色により検討したところ、ピロリ菌の CagA の発現は胃粘膜に近傍で発現が亢進していた。サンドイッチ ELISA 法で測定した吸光度を ROC 法で解析したところ、area under the curve(AUC)は 0.96 と高い正確性を示した。ROC 法により決定したカットオフ値をもとにした ELISA 法の感度、特異度はそれぞれ 88.0%、100% であり、非常に良好な結果であった。</p> <p>東アジア型 CagA 陽性ピロリ菌に対する MAb を樹立し、免疫組織化学で東アジア型 CagA 陽性ピロリ菌感染を正確に診断できた。また、以前作製したポリクローナル抗体と組み合わせてサンドイッチ ELISA 法を開発し、その精度の高さ（感度、特異度はそれぞれ 88.0%、100%）を証明した。また、胃粘膜近傍のピロリ菌で CagA の発現レベルが上昇を認めたことは、CagA の発現調節にピロリ菌と宿主細胞の接触が重要である可能性を示唆している。</p> <p>今回新たに開発された MAb は、CagA タイピングを蛋白レベルで評価可能なばかりか、組織化学的、細胞生物学的な解析ツールとしてその有用性が期待され、ゲノムタイピングとは異なる診断への応用も示唆される。よって審査員の合議により、本論文は学位（博士）に値するものと判定した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 安田 愛子

論 文 題 目

A novel diagnostic monoclonal antibody specific for *Helicobacter pylori* CagA of East Asian type

(ヘリコバクター・ピロリ菌が有する東アジア型 CagA タンパクに対する、新しい診断用モノクローナル抗体の開発)

要 旨

緒言 (目的)

分子生物学および分子疫学研究により、ヘリコバクター・ピロリ菌(ピロリ菌)の中で東アジア型 CagA を有するピロリ菌が欧米型 CagA を有するピロリ菌よりも病原性が高いことが示唆されている。そのため、CagA の2つのタイプを正しく診断する事は非常に重要である。

本研究では、東アジア型 CagA を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、これを用いた免疫組織化学法ならびにサンドイッチ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で両者を正しく診断することを目的とする。

研究対象及び方法 (材料を含む)

東アジア型 CagA 蛋白に特徴的なペプチド AINRKIDRINKIASAGKG を免疫されたマウスの脾臓とミエローマ細胞株 Sp2/0-Ag14 を細胞融合させハイブリドーマを得た。ELISA 法でスクリーニ

ングを行い限界希釈法でモノクローナル抗体を樹立し、ウェスタンブロットティング、免疫組織化学、蛍光免疫組織化学にて抗体の特異性の検証を行った。

東アジア型 CagA を特異的に検出するサンドイッチ ELISA 法の開発は、4,000 倍に希釈したモノクローナル抗体を含む腹水を ELISA プレートにコートした後、250 $\mu\text{g/ml}$ に調整したピロリ菌抽出液を反応させた。次に、抗東アジア CagA ポリクローナル抗体を、さらに 2 次抗体を反応させた後 o-phenylenediamine を基質として発色させ、15 分後の吸光度を測定した。本学総合診療部消化器内科に保存してあるピロリ菌 32 株(東アジア型 25 株、欧米型 7 株)に対してサンドイッチ ELISA 法を行い、その結果を receiver-operator characteristic (ROC)法で解析した。

結果

ウェスタンブロットティング法により、作製したモノクローナル抗体は東アジア型 CagA のみに反応し、欧米型 CagA には反応しなかった。

ホルマリン固定パラフィン包埋されたピロリ菌感染胃粘膜の、モノクローナル抗体による免疫組織化学では、東アジア型 CagA 陽性ピロリ菌が感染している胃粘膜のみでピロリ菌に一致した強いシグナルを検出した。

ピロリ菌感染胃粘膜において、CagA の局在をモノクローナル抗体と抗ピロリ菌抗体により免疫蛍光二重染色により検討したところ、ピロリ菌の CagA の発現は胃粘膜に近傍で発現が亢進していた。

サンドイッチ ELISA 法で測定した吸光度を ROC 法で解析したところ、area under the curve (AUC)は 0.96 と高い正確性を示した。ROC 法により決定したカットオフ値をもとにした ELISA 法の感度、特異度はそれぞれ 88.0%、100%であり、非常に良好な結果であった。

考察および結語 (まとめ)

東アジア型 CagA 陽性ピロリ菌に対するモノクローナル抗体を樹立し、免疫組織化学で東アジア型 CagA 陽性ピロリ菌感染を正確に診断できた。また、以前作製したポリクローナル抗体と組み合わせるサンドイッチ ELISA 法を開発し、その精度の高さ(感度、特異度はそれぞれ 88.0%、100%)を証明した。また、胃粘膜近傍のピロリ菌で CagA の発現レベルが上昇を認めたことは、CagA の発現調節にピロリ菌と宿主細胞の接触が重要である可能性を示唆している。