




## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第 577 号	氏 名	松 尾 祐 一
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	松 浦 恵 子 	
	副査氏名	村 上 邦 成 	
	副査氏名	松 本 俊 郎 	
論文題目 Novel CagA ELISA exhibits enhanced sensitivity of <i>Helicobacter pylori</i> CagA antibody ( <i>Helicobacter pylori</i> の CagA に対する抗体を高感度で検出する新規 ELISA 測定系の構築)			
論文掲載雑誌名 <i>World Journal of Gastroenterology</i>			
論文要旨 【緒言】ピロリ菌はヒトの胃に感染することで、胃炎や胃がんなどの様々な消化器疾患を引き起こす。東アジア地域は胃がんの罹患率が高い。これにはピロリ菌の cytotoxin-associated gene A ( <i>cagA</i> ) 遺伝子が関与するとされている。 <i>cagA</i> 遺伝子型は、主に欧米型と東アジア型に分類される。アジア地域のピロリ菌の大部分は、欧米型と比較して病原性が高いとされる東アジア型 <i>cagA</i> 遺伝子を有する。日本でも大部分が東アジア型 <i>cagA</i> ピロリ菌に感染しているが、抗 CagA 抗体の陽性率は低いことが報告されている。従来型 CagA 抗体 ELISA は欧米型 CagA タンパク質が抗原として使用されているため、本研究では東アジア型 CagA タンパク質を抗原とした ELISA 測定系を構築することで、東アジア地域における抗 CagA 抗体と臨床症状の関連について明らかとすることを目的とした。			
【研究対象及び方法】 1、東アジア型 CagA タンパク質を抗原とした、抗 CagA 抗体の ELISA 測定系の構築 ①大分大学で分離されたピロリ菌臨床株から東アジア型 <i>cagA</i> 遺伝子をクローニング、②大腸菌発現系を用いて組み換え CagA タンパク質の発現を行い、Glutathione Sulfate-Transferase を用いたアフィニティー精製により、組換え CagA タンパク質を精製、③②で得られたタンパク質を抗原として、抗 CagA 抗体の新規 ELISA 測定系を構築した。 2、従来型と新規抗 CagA 抗体 ELISA の性能の比較 ベトナム人の 110 例のピロリ菌感染症例 (欧米型 <i>cagA</i> : 38 症例、東アジア型 <i>cagA</i> : 72 症例) と、107 例のピロリ菌非感染症例の血清中抗 CagA 抗体価を双方の ELISA により測定した。 <i>cagA</i> 遺伝子型はサンガー法により塩基配列で分類した。さらに、ピロリ菌感染症例から、95 症例の胃炎患者群を抽出し、抗 CagA 抗体価と胃粘膜組織の病理学的炎症スコアとの相関を検討した。胃粘膜炎症の程度の評価には Updated Sydney system を用いた。			
【結果】ピロリ菌感染症例と非感染症例を用いた Receiver operating characteristic 解析の結果、新規抗 CagA 抗体 ELISA の Area under the curve は従来型とほぼ等しかった。また、東アジア型 <i>cagA</i> ピロリ菌に対しては新規抗 CagA 抗体 ELISA の感度が有意に高かったが、欧米型 <i>cagA</i> ピロリ菌に対しては従来型抗 CagA 抗体 ELISA の感度が高い傾向があった。さらに、新規 ELISA で測定した CagA 抗体価は単核球の浸潤と正の相関がみられる傾向があり、ピロリ菌数と負の相関がみられた。			
【考察・結語】抗 CagA 抗体 ELISA の感度はピロリ菌の <i>cagA</i> 遺伝子型に依存し、東アジア地域において本研究で構築した新規 ELISA 測定系が高感度で有用であることが分かった。また、新規 ELISA で測定した抗 CagA 抗体価は、胃粘膜における単核球の浸潤と相関する傾向がみられることから、抗 CagA 抗体価は胃粘膜の慢性炎症の活動を反映している可能性が示唆される。			

最終試験

の結果の要旨

学力の確認

審査区分 題・論	第577号	氏名	松尾祐一
審査委員会委員		主査氏名	松浦恵子 (印)
		副査氏名	村上和成 (印)
		副査氏名	松本俊郎 (印)
<p>松尾 祐一氏 (以下、申請者) は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察等について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 今回東アジア型 CagA に対する抗体を作る目的はどこにあるか。東アジア型は欧米型に比べてどういう違いがあるか。</li> <li>2. ベトナム人の東アジア型 CagA と日本人の CagA の違いはあるか。</li> <li>3. ベトナム国でのピロリ菌感染患者は、地域により <i>cagA</i> の遺伝子型 (中央は欧米型、北部は東アジア型) が異なるため、両方の CagA 抗体 ELISA での評価がしやすいベトナム国の病院を今回対象に選んだと論文の Introduction で述べている。何故同じ国内で <i>cagA</i> の遺伝子型に違いがあるか。</li> <li>4. 市販の ELISA では何が抗原として用いられているのか。</li> <li>5. 胃炎の判定場所は決まっているのか。</li> <li>6. ROC の方法とカットオフ値の求め方はどのようにされているのか。</li> <li>7. Pylori 菌の数の数え方はどのようにされているのか。</li> <li>8. Western blot で用いた抗体は何か、東アジア型 CagA に対する抗体は用いたか。</li> <li>9. リコンビナント CagA を作成したが、天然の CagA と同じものであることは確認したか。</li> <li>10. 電気泳動の蛋白が切断されたバンドがブロードになっているがこれはすべて CagA か。</li> <li>11. リコンビナントタンパク質が短くなっているのはなぜか、過去の報告と同じか。</li> <li>12. Table 1 はベトナム人のデータであるが、ピロリ未感染の証明はどのようにしたか。欧米型と東アジア型で疾患に差はあるか。</li> <li>13. ピロリ感染により単核球だけではなく好中球も浸潤しているが、CagA 抗体との相関がない理由は何か。</li> <li>14. 新規 ELISA で測定した CagA 抗体価は単核球の浸潤と正の相関 (<math>r=0.25</math>, <math>P&lt;0.058</math>) があつたと述べているが、好中球との関連性はなかったのか。相関指数 <math>r</math> が 0.25 と極めて弱い相関関係であるにも関わらず、抗 CagA 抗体価は胃粘膜の慢性炎症の指標として使用できる可能性があるかと述べたが、適切な cut off 値を設定することにより可能になるのか。</li> <li>15. 論文 Figure 6 のなかで、新規 ELISA での CagA 抗体価と単核球浸潤との相関係数 <math>r</math> が 0.25 で、ピロリ菌数の相関が負の相関ながら <math>r=-0.26</math> となっている。二つの相関係数 <math>r</math> は、正と負の差はあるものの値はほとんど変わらず、またグラフの縦・横の指標が同じなのに、何故 <math>r=-0.26</math> の傾きは <math>r=0.25</math> の傾きと比べ急峻なのか。</li> <li>16. Table 1 でピロリ菌非感染 107 症例のうち、内視鏡での胃炎診断が 98 例と 90% を超える高い数値になっているが、どうして正常胃粘膜と診断される症例が少ないのか。</li> <li>17. 東アジア型 CagA 抗体を用いた CagA 自体の検出より、今回の東アジア型 CagA 抗体の検出のほうが意味があるのか。</li> <li>18. リコンビナントタンパク質でなく、ペプチドを抗原とすることはできないのか。</li> <li>19. 治療後には抗体価は下がるという報告はあるのか。</li> <li>20. 抗 CagA 抗体は萎縮性胃炎になると下がるということであるが、癌のリスクは萎縮性胃炎のほうが高いので、癌のリスクを検出できるということにならないのではないか。</li> <li>21. 結果として、東アジア型 <i>cagA</i> ピロリ菌に対しては、新規抗 CagA 抗体 ELISA の感度 (従来型 ELISA vs 新規 ELISA ; 51.4% vs 73.6%) が有意に高かったと述べているが、80% を超える程の高い感度ではなく、その要因はどこにあるのか。</li> <li>22. Fig3 のバーの色は gray でなく black なのではないか。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。