

【32】

氏 名	よし だ なる お 生 吉 田 匠 生
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	乙第789号
学位授与の日付	平成31年2月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	Improved sensitivity to venom specific-immunoglobulin E by spiking with the allergen component in Japanese patients suspected of Hymenoptera venom allergy (ハチ毒アレルギーが疑われる日本人患者におけるアレルギーコンポーネント添加によるハチ毒特異的免疫グロブリンEの感度の改善)
論文審査委員	(主査) 教授 倉 沢 和 宏 (副査) 教授 松 原 知 代 教授 春 木 宏 介

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

ハチ毒アレルギーの診断には問診による全身アナフィラキシー症状の既往の他、ハチ毒特異的immunoglobulin (Ig) E抗体の測定が重要である。特異的IgE抗体の定量的測定法として、ImmunoCAP (CAP) やIMMULITE 3gAllergy (MMULITE) が有用であり、即時型アレルギー疾患の診断補助に用いられる。CAP法（蛍光色素法）およびIMMULITE法（化学蛍光酵素法）は其々、固相および液相の粗抽出されたアレルギーに結合したIgE抗体を測定する方法である。臨床的には、CAP法が幅広く用いられており、ハチ毒アレルギー患者におけるハチ毒特異的IgE抗体の検出感度は低いもので76%、特異度は85%と報告されており、さらなる精度向上が望まれる。粗抽出されたハチ毒の構成成分の中で、最も重要なmajor antigenとして、タンパクであるantigen 5が知られている。スズメバチ毒に感作された日本人の92.6%が、antigen 5に対する特異的IgE抗体が陽性であることを既に申請者らは報告している。

【目 的】

本研究では、スズメバチ毒またはアシナガバチ毒アレルギーが強く疑われる患者に対し、CAP法を用いて抗原として粗抽出されたハチ毒を用いたもの（従来法）と、従来法にantigen 5を加えた（添加）改良法において、感度および特異度について、比較、検討した。

【対象と方法】

2013年3～12月に、獨協医科大学 内科学（呼吸器・アレルギー）に受診された41名（男性28名、女性13名：平均年齢 62.3 ± 11.7 歳、範囲39～86歳）のスズメバチまたはアシナガバチに刺され全身症状を経験した患者を対象とした。ただし、ハチ毒にはヒスタミンが含まれているため、同時に多数刺された場合、全身症状が惹起されるIgE非依存的なtoxic反応と考えられる者と、ハチ毒抽出エキスをを用いたアレルギー免疫療法施行経験者は除外した。これらの患者は外来で診察（問診）時に採血（10ml）を行い、CAP法を用いて、従来法（粗抽出されたハチ毒）および改良法（粗抽出されたハチ毒にantigen 5を添加）による特異的IgE抗体の測定を行った。一方、過去に一度もハチ刺傷の経験のない20名のボランティアを対照とした。antigen 5はハチの種族の違いにより、スズメバチではVes v5およびアシナガバチではPol d5と呼称が変わる。

ハチ刺傷による全身症状は、日本アレルギー学会のアナフィラキシーガイドライン（2014年）に従い決定した。診察（問診）はアレルギー専門医により行われ、ハチ刺傷時の状況（刺傷数や刺傷時のハチの種類など）、全身症状出現歴（重症度）が聴取された。重症度は最も重篤な症状をMueller分類（Grade I：14名、II：5名、III：6名、IV：16名）に従い決定した。

antigen 5（Ves v5、Pol d5）、従来法（粗抽出されたハチ毒）および改良法（粗抽出されたハチ毒にantigen 5を添加）における特異的IgE抗体を測定し、カット・オフを $0.35 \text{ IU}_{\text{A}}/\text{mL}$ とした。

各特異的IgE値における相関において、Pearsonの相関係数を用いた。P値は0.05未満を有意とした。

本研究は、獨協医科大学生命倫理委員会の承認を得て、指針に従って行った。また、本研究を実施するにあたり、全ての被験者から同意書による承諾を得て行った。

【結 果】

従来法の感度：41名のスズメバチまたはアシナガバチに刺され全身症状を経験した患者のうち、33名（感度80.5%）が従来法におけるハチ毒（スズメバチまたはアシナガバチ）特異的IgE試抗体が陽性（ $\geq 0.35 \text{ UA} / \text{ml}$ ）であった。

従来法および改良法におけるスズメバチ毒とアシナガバチ毒の特異的IgE抗体値の相関性：スズメバチ毒の相関係数は $R=0.92$ ($P<0.01$)、アシナガバチ毒では $R=0.78$ ($P<0.01$) で、何れも強い相関を示した。

従来法と改良法の特異度：過去に一度もハチ刺傷の経験のない20名のボランティアにおいて、スズメバチ毒およびアシナガバチ毒の特異的IgE抗体を従来法（特異度100%）および改良法（特異度100%）で測定したが、何れも全て陰性だった。

改良法の感度：従来法において、スズメバチ毒およびアシナガバチ毒特異的IgE抗体陰性だった8名の患者において改良法で測定したところ、5名がスズメバチ毒またはアシナガバチ毒の特異的IgE抗体値が陽性（41名中38名、感度92.7%）となった。

これらの結果、CAP法を用いた従来法と比較し改良法では、スズメバチ毒とアシナガバチ毒の特異的IgE抗体測定において、特異度を変えず感度の向上が得られた。

【考 察】

ハチ毒における特異的IgE抗体の感度と特異度はそれぞれ76～91.2%と85～100%と報告されている。申請者の研究においても、スズメバチまたはアシナガバチに刺され全身症状が出現した経験41名のうち33名(80.5%)が、従来法によるハチ毒特異的IgE抗体が陽性であり、これまでの報告と類似していた。また、従来法および改良法共に特異度は100%であり、これまでの報告の中で最も高かった。一般に、スズメバチ毒およびアシナガバチ毒アレルギー患者において、antigen 5に対する特異的IgE抗体の陽性率は85～90%と極めて高い。一方、粗抽出したハチ毒にもantigen 5は存在するが抗原量が僅かである。このため、本研究では、粗抽出されたハチ毒に加えantigen 5を添加することで、感度の向上(80.5%→92.7%)が得られた。一方、ハチ毒アレルギーが強く疑われるが、41名中3名(7.3%)が改良法でも陰性であった。この理由として、ハチ毒に感作され特異的IgE抗体が陽性になった者は、時間経過と共に抗体値が低下し、時に陰転化する。刺傷直後でもハチ毒と抗原抗体反応により陰転化することがあるため、刺傷1か月以降に測定する必要がある。このことから、CAP法による検査上の偽陰性者も存在する。また、スズメバチ毒およびアシナガバチ毒にはantigen 5の他に、フォスフォリパーゼやヒアルロニダーゼも主要抗原として考えられている。antigen 5とフォスフォリパーゼの特異的IgE抗体を組み合わせることで診断感度の向上が得られた報告もあり、antigen 5に幾つかの主要抗原を加えることで、さらなる感度向上が期待できる。

【結 論】

ハチ毒アレルギーの補助的診断の一つとして、ハチ毒特異的IgE抗体の測定は有用であり、粗抽出されたハチ毒に加え、主要抗原を添加することで、感度の向上が得られた。この結果、ハチ毒以外の他の即時型アレルギー疾患における補助的診断として、臨床応用されることが将来期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

ハチ毒アレルギーの診断には問診による全身アナフィラキシー症状の既往の他、ハチ毒特異的IgE抗体の測定が重要である。粗抽出されたハチ毒の構成成分の中で、重要な主要抗原としてAntigen 5というタンパクが存在し、ハチの種族により、スズメバチではVes v5、アシナガバチではPol d5と呼称が変わる。一般に、Antigen 5に対する特異的IgE抗体の陽性率は85～90%と極めて高い。粗抽出したハチ毒にもAntigen 5は存在するが、その抗原量は僅かである。粗抽出抗原を用いた従来法によるハチ毒特異的IgE抗体の感度は十分とは言えない。本研究は、スズメバチ毒またはアシナガバチ毒アレルギーの患者に対し、ImmunoCAP法(CAP法)を用いて、ハチ毒粗抽出抗原による従来法と従来法にrAntigen 5を添加した改良法による、ハチ毒(スズメバチ、アシナガバチ)特異的IgE抗体の感度および特異度について、比較、検討を行った。対象者は、41名(男性28名、女性13名：平均年齢 62.3 ± 11.7 歳、範囲39～86歳)のスズメバチまたはアシナガバチに刺傷し全身症状を経験した患者である。特異度の解析のため、ハチ刺傷歴のない20名のボランティアを対照群とした。採血は、ハチ刺傷後1か月以上経過した時点で行った。Cut-offは0.35 UA/mlとした。従来法で測定した結果、

陽性率は80.5% (33/41名) であり、諸外国の報告と同様であった。従来法および改良法におけるハチ毒特異的IgE抗体は (スズメバチ毒: 従来法vs改良法 $R=0.92$ 、アシナガバチ毒: 従来法vs改良法 $R=0.78$) と、いずれも強い相関を示した。また、改良法における特異的IgE抗体価 (改良法スズメバチ: 9.2 ± 17.9 UA/mL、改良法アシナガバチ: 15.3 ± 25.3 UA/mL) は有意 ($P < 0.01$) に上昇した。20名の対照群に於いて、改良法における特異度 (100%) は従来法と同様であった。従来法が陰性であった8名の患者のうち改良法で5名 (33/41→38/41名) が陽性となり、感度の向上 (80.5→92.7%) が得られた。一方、41名中3名 (7.3%) が改良法でも陰性であった。この要因として、ハチ毒に感作され特異的IgE抗体が陽性になった者は、時間経過と共に抗体価が低下し、時に陰転化することがあるためと考察された。また、刺傷直後もハチ毒の抗原抗体反応によりIgEが消費され陰転化することがあるため、刺傷から1か月以降に測定する必要がある。これらの事から、CAP法による偽陰性者は存在し得る。ハチ毒アレルギーの補助的診断としてハチ毒特異的IgE抗体の測定は有用であり、粗抽出されたハチ毒に加え、主要抗原であるrAntigen 5を添加することで、特異度を変えずに感度の向上が得られることを国内外問わず初めて証明した。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、獨協医科大学病院呼吸器・アレルギー内科の外来を受診したスズメバチまたはアシナガバチ刺傷歴があり全身症状の出現歴のある41名の患者と対照群20名を対象に解析を行った。統計解析を行うにあたり、十分な対象患者数および適切な対照群の設定を行い、CAP法を用いて、従来法、rAntigen 5、改良法による特異的IgE抗体を各々測定し、多角的に解析している。統計解析は主にPearsonの相関係数やWilcoxon符号順位検定などの確立された統計手法を用いて結論を導き出している。また、使用した医療情報については、生命倫理委員会での承認の上、ガイドラインに即して取り扱っており、かつ全ての被験者から同意書による承諾を得ている。以上より、本研究の方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

ハチ毒アレルギーに於いて、従来のハチ毒粗抽出抗原を用いた特異的IgE抗体測定による感度は不十分なものであった。従来法、rAntigen 5、改良法を用いて特異的IgE抗体の測定および解析を行い、ハチ毒 (スズメバチ毒、アシナガバチ毒) の共通抗原性や改良法の感度向上を証明した点は新奇的と評価できる。また、粗抽出抗原にrAntigen 5を添加した改良法に関する報告はこれまでになく、本研究は独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、統計解析に必要な十分な症例数に対して、適切な統計解析手法を用いて、ハチ刺傷歴および全身症状を呈した患者に対する、従来法、rAntigen 5、改良法による特異的IgE抗体測定の検討を行い、その特性を明らかにした。そこから導き出された結論は、論理的、経験的に矛盾するものではなく、また、アレルギー学、免疫学などの関連領域の知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

本研究の結果による検査感度の向上によって、ハチ毒アレルギーの補助的診断に寄与し、生活環境

(職業など) でハチ刺傷のリスクが高いハチ毒特異的IgE抗体陽性者への注意喚起とアドレナリン自己注射製剤の適切な処方に結びつく研究であると位置付けられる。

【申請者の研究能力】

申請者は、アレルギー学の理論を学び実践した上で研究計画を立て、適切に本研究を遂行した。得られたデータを適確な統計手法を用いて解析し、貴重な知見を得ている。得られた研究成果は今後のハチ毒アレルギー診療に影響を与える優れた内容であり、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Allergology International

(64 : 248-252, 2015)