

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小野 哲也

---

近年、ポイントオブケアテスト(POCT)と呼ばれる迅速簡易検査に注目が集まるようになってきており、医療費増大に悩む先進国のみならず、多額の医療コストをかけられない発展途上国においても医療の質の向上に寄与すると考えられている。

一方、喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症に代表されるアレルギー疾患の原因アレルゲン検査として最も普及しているアレルゲン特異的 IgE 抗体価検査は、現在専用自動機器で精度良く測定出来るようになっているが、検査室を持たない一般開業医にとって導入は不可能であった。

本研究は妊娠検査薬やインフルエンザ検査薬で普及してきたイムノクロマトグラフ法を応用し、世界中で増加しているアレルギー疾患の診断に有用なアレルゲン特異的 IgE 抗体測定を迅速・簡易化するための技術開発検討とその製品化に関するものである。

第 1 章では、従来測定に数時間必要であったアレルゲン特異的 IgE 抗体をより短時間で測定可能にするため、より高感度の測定系の開発検討を行った。部分精製スギアレルゲン蛋白(SBP)をイムノクロマトグラフ膜に塗布し、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgE マウスモノクローナル抗体と酵素発色基質を用い、血清中にスギ特異的 IgE 抗体が存在する場合は SBP 塗布ラインが 20 分で青色染色される仕組みの酵素イムノクロマトグラフ測定(EICA)法を開発した。測定検出限界は 0.2U/ml であり、ELISA 法と同等の測定感度を達成した。青色染色度はスギ特異的 IgE 抗体濃度依存的に増加し、定量性を持つことが確認された。従来法との相関も良好でスピアマン順位相関係数は 0.95 であった。測定内及び測定間再現性はそれぞれ CV8%~12%、4~7%であり、臨床現場での使用に耐えうるレベルと考えられた。

一方従来法においては、患者より採血した血液から血清を得るには遠心分離操作が必要であった。第 2 章ではこれに換わる方法として界面活性剤により血球を溶解する方法を開発した。全血と Triton4%溶液を 4:6 比率で混和することで安定的にイムノクロマトグラフ展開、及びライン染色が行われることを発見した。この方法は、全血中のヘマトクリット値 30%~60%、また Total IgE 値 20000IU/ml まで染色度に影響を与えないことから、ほぼ全ての患者血液を測定に用いることができることがわかった。採血に用いる抗凝固剤の影響は見られなかった。

第 3 章では、第 1、2 章で開発した技術を応用し、実際の医療の現場にて容易に使用可能な製品開発を行った。スギ以外にダニ、ネコアレルゲンを加え、3 項目のアレルゲン特異的 IgE 抗体価を同時に測定可能とした。また正常測定を確認する為のコントロールライン、安全かつ簡便使用の為の反応カセット、そして界面活性剤を含んだ「検体処理液」や固相化した発色基質を展開させる「展開液」、そして、測定機器なしにクラススコア判

定する為の色見本などの開発を行った。12 ヶ月におよぶ保存安定性試験では試薬の劣化及び性能低下は確認されず、血中の代表的干渉物質(ビリルビン, 乳び, ヘモグロビン)の影響は観察されなかった。測定温度は 20 ~ 37 °C では同等の染色結果が得られ、141 例に及ぶ開業医における測定でも問題は生じなかった。また測定値は高精度測定法と良好に相関(スピアマン順位相関係数スギ 0.927, ダニ 0.966, ネコ 0.937)するものだった。この製品は、2004 年 7 月に厚生労働省より医薬品として認可され、2004 年 11 月より日本国内で発売を開始した。

アレルギー性結膜炎等において眼はアレルギー炎症の主要な場である。第 4 章では血液の代わりに涙液からアレルギー特異的 IgE 抗体価を測定する意義を検討した。シルマー試験紙を用いて非侵襲的に涙を採取し、スギ花粉特異的 IgE 抗体価の変動を 11 ヶ月の長期に渡り調査した。涙液中スギ花粉特異的 IgE 抗体価は臨床症状及び血中特異的 IgE 抗体価が増大する前から上昇を始め、そのピークは血中特異的 IgE 抗体価と同様、花粉飛散期後期からその後 2 ヶ月までの間に見られた。スギ花粉「非」飛散期になると多くの血中特異的 IgE 抗体価が陽性であり続けるのに対し、涙液中特異的 IgE 抗体価は大幅に減少し、陰性化する検体が多く見られた。シルマー試験紙を用い涙液中スギ花粉特異的 IgE 抗体価を測定することで、スギ花粉飛散期では非侵襲的方法として血清の代替が可能であり、非飛散期にはアレルギー性結膜炎などの眼疾患の原因アレルギーを、血中特異的 IgE 抗体価測定よりも効率的に絞り込める可能性が示唆された。

以上、本論文は、アレルギー疾患の診断に有用なアレルギー特異的 IgE 抗体測定を迅速・簡易化するための技術開発検討とその製品化に関するものであり、学術的および産業応用的に貢献するところが多い。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。