

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論文題目

Antibodies to tissue transglutaminase: comparison of ELISA and immunoprecipitation assay in the presence and in the absence of calcium ions

(組織トランスグルタミナーゼ抗体: カルシウムイオン存在下, 非存在下における ELISA 法と免疫沈降法での比較検討)

氏名 地 健 菑

【緒言】

セリアック病は吸収不良症候群の原因の1つであり、ヨーロッパで頻度の高い自己免疫性腸疾患である。Endomysial抗体はセリアック病に特徴的な抗体として知られていた。

1997年に endomysial 抗原の主要成分が組織トランスグルタミナーゼ (tTG) と判明した。セリアック病の診断に患者血清中 tTG 抗体が測定されるようになった。

これまで tTG の構造と活性は Ca^{2+} に著しく影響されると考えられてきた。 Ca^{2+} は tTG と tTG 抗体の結合部位の形成にも重要と考えられてきた。tTG と tTG 抗体の結合における Ca^{2+} の影響について研究した。

【検体】

セリアック病患者 39 人とセリアック病でない者 20 人の血清を用いた。セリアック病の確定診断は十二指腸粘膜生検で行った。

【方法】

ELISA 法と免疫沈降アッセイ法 (IPA 法) を

用いて血清中の tTG 抗体を測定した。ELISA 法の抗原は guinea pig tTG、IPA 法の抗原は ^{35}S 標識リコンビナントヒト tTG を用いた。これら 2 つのアッセイを Ca^{2+} を「含む」または「含まない」2 種類のバッファーを用いて行った。前者 Ca^{2+} を含むものを Ca^{2+} 存在下とし、後者 Ca^{2+} を含まないものを Ca^{2+} 非存在下と便宜上した。

【結果】

セリアック病患者 39 例を検討した。




- 1) tTG 抗体 (IgA) 陽性率は ELISA 法では Ca^{2+} 存在下、非存在下ともに 92% で差はなかった。IPA 法では Ca^{2+} 存在下で 74%、非存在下で 87% であった。 Ca^{2+} 非存在下で陽性率が高かった。
- 2) tTG 抗体価 (IgA) は ELISA 法では Ca^{2+} 存在下と非存在下の間で強い相関があった ($r=0.99$)。IPA 法でも強い相関があった ($r=0.93$)。
- 3) tTG 抗体価 について Bland and Altman プロットによる解析を行った。ELISA 法では Ca^{2+} 存在下および非存在下の間で良好な一致をみた (37/39 サンプルで抗体価の差が $\pm 2\text{SD}$ 以内)。

IPA 法でも良好な一致であった (35/39 サンプルで抗体価の差が $\pm 2SD$ 以内)。

4) Ca^{2+} 非存在下の ELISA 法の測定結果 (抗体価) と IPA 法の測定結果 (index) をそれぞれ対数変換して Bland and Altman プロットにより解析した。ELISA 法と IPA 法の間で良好な一致をみた (37/39 サンプルで差が $\pm 2SD$ 以内)。

【考察と結論】

tTG 抗体はセリアック病診断の良いマーカーであることがわかった。また、tTG と tTG 抗体の結合に Ca^{2+} は影響しないことがわかった。 これまでは Ca^{2+} による tTG の活性化および三次元構造の変化が tTG 抗体結合部位の形成に重要と考えられていた。しかし我々の結果は Ca^{2+} による tTG の活性化および三次元構造の変化は tTG と tTG 抗体の結合には重要でないことをはじめて示した。 さらに IPA 法では Ca^{2+} 非存在下で tTG 抗体をより多く検出することができた。これらの結果は今後 tTG の tTG 抗体結合主要エピトープの検索および解析をしていく上で重要な示唆を与える。

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏名	仲地 健
		平成 14 年 12 月 26 日		
論文審査委員	主査教授	西 巻	正	
	副査教授	山 根	誠久	
	副査教授	斎 藤	博	
(論文題目)				
Antibodies to tissue transglutaminase: comparison of ELISA and immunoprecipitation assay in the presence and in the absence of calcium ions				
(論文審査結果の要旨)				
研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準につき検討し、以下のような審査結果を得た。				
1. 研究に至る背景と目的				
<p>Coeliac病は欧州で頻度の高い小腸自己免疫疾患である。Gluten摂取で小腸粘膜が傷害され吸収不良症候群を呈し消化管悪性腫瘍も合併する。Coeliac病の診断は小腸粘膜生検による組織学的診断が主であった。しかしCoeliac病は乳児、小児、高齢者にも多く非侵襲的診断法が望まれる。治療はGluten-free dietである。早期に診断し治療を開始すれば症状の改善、消化管悪性腫瘍の発症も予防できる。これまで血清学的診断には抗endomysial抗体が用いられてきた。最近endomysial抗原の主要成分が組織トランスグルタミナーゼ(tTG)と判明し、診断にtTG抗体が測定されるようになった。tTGの活性と三次構造はCa²⁺に著しく影響されるとされてきたが不明な点が多い。tTGとtTG抗体の結合部位に与えるCa²⁺の影響も不明であった。これまでにCa²⁺を含むバッファーと含まないバッファーを用いてtTGとtTG抗体の結合について比較した報告はなかった。ELISA法と免疫沈降アッセイ法(IPA法)でtTGとtTG抗体の結合におけるCa²⁺の影響を明らかにすることを目的に本研究は行われた。</p>				

- 備考
- 1 用紙の規格は,A4とし縦にして左横書とすること。
 - 2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。

2. 研究内容

Coeliac病39人の血清を用いた。Coeliac病は十二指腸粘膜生検で確定診断した。ELISA法とIPA法で血清 tTG抗体を測定した。前者の抗原はguinea pig tTG、後者は³⁵S標識リコンビナントヒトtTGを用いた。これら2つのアッセイをCa²⁺存在下と非存在下で行った。

- 1) tTG抗体 (IgA)陽性率はELISA法ではCa²⁺存在下、非存在下ともに92%で差はなかった。IPA法ではCa²⁺存在下で74%、非存在下で87%であった。Ca²⁺非存在下で陽性率が高かった。
- 2) tTG抗体価 (IgA)はELISA法、IPA法ともにCa²⁺存在下と非存在下の間で強い相関があった($r=0.99$ 、 $r=0.93$)。
- 3) tTG抗体価についてBland and Altman プロット解析を行った。ELISA法、IPA法ともにCa²⁺存在下と非存在下の間で良好な一致をみた(37/39、35/39サンプルで抗体価の差が $\pm 2SD$ 以内)。
- 4) Ca²⁺非存在下のELISA法とIPA法の測定結果を各々対数変換してBland and Altmanプロット解析した。ELISA法とIPA法の間で良好な一致をみた(37/39サンプルで差が $\pm 2SD$ 以内)。

これまでCa²⁺によるtTGの活性化および三次構造の変化がtTG抗体結合部位の形成に重要と考えられていた。本研究の結果はCa²⁺によるtTGの活性化および三次構造の変化はtTGとtTG抗体の結合には重要でないことを初めて示した。さらにIPA法ではCa²⁺非存在下でtTG抗体をより多く検出することができた。これらの結果は今後tTGのtTG抗体結合主要エピトープを解明していく上で重要な示唆を与える。

3. 研究成果の意義と学術水準

ELISA法とIPA法におけるtTGとtTG抗体の結合に、Ca²⁺によるtTGの活性化および三次構造の変化は重要でないことを初めて示した。これまでの知見と異なるものであり、本研究の結果はtTG上のtTG抗体結合主要エピトープを解明していく上で重要と考えられ国際的にも評価できる。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。