

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 6月19日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15541

研究課題名(和文) 免疫クロマト法を用い唾液を検体とする抗BP180抗体の迅速検査法の確立

研究課題名(英文) Immunochromatographic method using the salive for rapid diagnosis of bullous pemphigoid

研究代表者

澤村 大輔 (SAWAMURA, Daisuke)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：60196334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：水疱性類天疱瘡は、全身に表皮下水疱が多発する高齢者に後発する皮膚疾患である。本症では、抗基底膜に対する自己抗体が存在するため、自己免疫性水疱症と理解されている。現在行われている、血清を用いた蛍光抗体法やELISA法は時間がかかることが問題となっている。そこで、我々は、簡便で迅速な検査の確立を試みた。今回の研究で、我々は抗体の検出検査において、唾液の有用性を蛍光抗体法とELISA法を用いて確認した。さらに、BP180のいろいろなリコンビナント蛋白を作成し、それを用いたELISA法を作成した。さらに、それらの蛋白を用いて免疫クロマト法も作成した。

研究成果の概要(英文)：Bullous pemphigoid is a skin disease which shows generalized blisters and occurs mostly in the elderly. This disease is characterized by autoantibodies to basement membrane zone and considered as autoimmune blistering disease. Immunofluorescence study and ELISA analysis using serum usually take long time and we tried to generate a simple and quick method to diagnose bullous pemphigoid. In this study, we demonstrated that saliva is useful for Immunofluorescence study and ELISA analysis of BP180. Furthermore, we development ELISA method and also immunochromatographic method using several recombinant peptides of BP180.

研究分野：皮膚科学

キーワード：自己免疫 遺伝子 皮膚 水疱 ELISA イムノクロマトグラフィー ベットサイド

1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡は全身に表皮下水疱が多発する、最も頻度が高い自己免疫性水疱症であり、高齢者に好発する。高齢化社会を向かえ、皮膚科診療においても高齢者に好発する疾患が増加し、他科入院中の患者や在宅の寝たきりの患者に、水疱性類天疱瘡を目にする機会も多い(図1)。本症患者の血清中には、皮膚の基底膜を認識する抗基底膜抗体が存在する。その自己抗体が認識する自己抗原として、BP230 と BP180 の類天疱瘡抗原が同定されたが、その後の研究から病態形成に關与している自己抗原は、BP180 と考えられている(図2)。

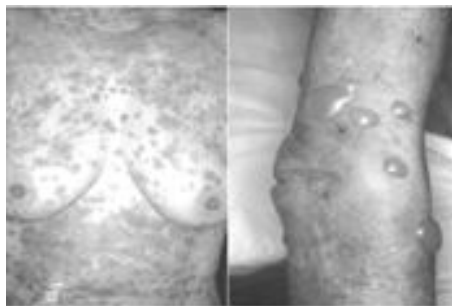


図1 類天疱瘡の臨床

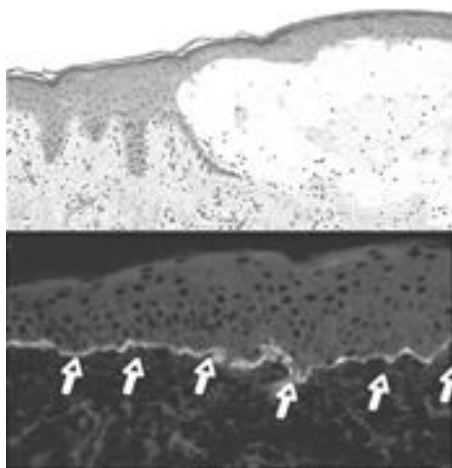


図2 病理組織と蛍光抗体

我々は、30年に渡り本症の研究を継続し、本症の診断法や治療法の進歩に貢献してきた。本症の診断は、病理検査による表皮下水疱、蛍光抗体法による抗基底膜抗体の検出、血中にあるBP180に対する自己抗体の検出で可能であるが、実際の臨床の場では、CLEIA法による抗BP180抗体検出が容易である。しかし、この検査でも外注検査であるため、少なくとも2-4日を要する。また、在宅患者の場合、診察は通常2週間ごとに行うので、水疱性類天疱瘡の結果が届いて、内服治療を始

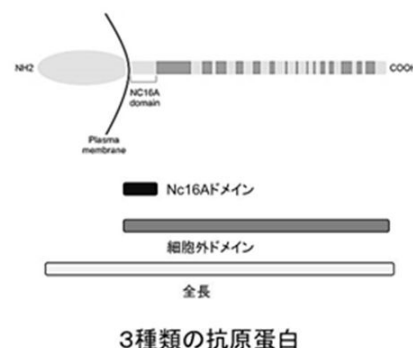
められるのは、2週間後であり、患者本人はもとより、介護による水疱のガーゼ交換などの処置も大変である。そこで、より簡便に、ベッドサイドで、迅速に、本症を診断する画期的な検査法の開発が臨床の場から望まれている。本研究は、簡便で短時間で結果の出る免疫クロマト法を用い、かつ簡単に採取できる唾液を検体として、画期的な抗BP180抗体検出法の確立を目指している。

2. 研究の目的

水疱性類天疱瘡は全身に表皮下水疱が多発する高齢者に好発する重篤な疾患である。近年の高齢化社会を迎え、他科入院中の患者や在宅の寝たきりの患者に本症が多くなってきている。水疱性類天疱瘡の診断はCLEIA法による抗BP180抗体検出が容易であるが、外注であるため時間がかかり、より簡便にベッドサイドで迅速に本症を診断できる画期的な検査法の開発が望まれている。本研究では、簡便で短時間で結果の出る免疫クロマト法を用い、かつ簡単に採取できる唾液を検体として、画期的な抗BP180抗体検出法の確立に挑戦する。

3. 研究の方法

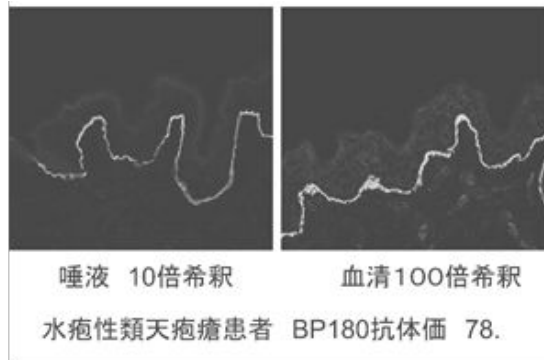
BP180は表皮と真皮の基底膜領域に貫通して存在する蛋白である。また、細胞内はグロビュラー構造をとる。細胞外はコラーゲン構造、すなわち三本鎖構造となる。コラーゲン構造をとる蛋白は親水性の部分と疎水性の部分の混在するため、その精製は極めて難しい。したがって、抗原蛋白の作成については、BP180のcDNAをクローニングし、目的の蛋白に対応する部分を制限酵素で消化する。その後、目的に対応するベクターに導入し、蛋白の合成を行う。唾液の検査：水疱性類天疱瘡患者の唾液から、蛍光抗体法を行やELISAを行い、陽性の有無を確認する。その他、通常



の蛍光抗体法、免疫プロットの方法などは通常の方法に従った。

4. 研究成果

唾液の有用性：2～3人の患者の唾液を用いて蛍光抗体間接法を行った。その結果、陽性所見を得た。(下図)。抗体力価は血清の1/5



から 1/20 程度であり、唾液には十分に BP180 抗体が存在した。また、BP180ELISA キットでも同様の結果を得ている。また、ごく最近、同様の研究がイランのグループ (Esmaili et al. CED, 2015) からあり、唾液でも十分自己抗体が存在し、診断できると報告されている。BP180 抗原蛋白の作成：Kobayashi らの方法 (Matsumura, et al, ADR, 1996) を参考に細菌よりリコンビナント蛋白を作成した。すなわち、NC16A ドメインと glutathione S-transferase (GST) の融合蛋白のベクターを作成。大腸菌に導入し、大量合成した。イムノプロットで抗原性を確認した後、glutathione sepharose 4B カラムにて精製する。Nishie らの方法 (personal communication) を参考にして、ヒト細胞よりリコンビナント蛋白を作成した。すなわち、BP180 の全長の N 末端に His タグのついたベクターを作成。HEK293 細胞に導入し、大量に合成した。イムノプロットで抗原性を確認した。次に、TALON affinity metal resin カラムにより精製を行った。抗原蛋白の検証：それらの抗原蛋白の ELISA の作成 ELISA 法キットの作成はイムノクロマト法キットよりも容易であるので、3 種類の蛋白で ELISA を作成した。ELISA プレートを 10 μ g/ml から 200 μ g/ml の蛋白をコートした。BSA でブロッキングした後、水疱性類天疱瘡患者の希釈血清を加えた。その後は通常の方法で、2 次抗体で処理し、発色を行う。蛋白抗原の有効量やその有用性の確認をした。イムノクロマ

ト法による検証：上記実験で有用であった抗原を用いたイムノクロマト法キットを選択する。ある程度の濃度でキャプチャー抗原の量を段階的に変えてキット作成をした。得られたキットを用いて、患者血清を用いてその有用性検討した。さらに、ELISA キットと比較して、その半定量性の感度も検証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Nishikawa Y, Matsuzaki Y, Kimura K, Rokunohe A, Nakano H, Sawamura D. Modulation of Stimulator of Interferon Genes (STING) expression by interferon- in human keratinocytes. *Biochem Genet*. 査読有, 2018;56:93-102. Doi: 10.1007/s10528-017-9832-7.
2. Akasaka E, Nakano H, Takagi Y, Toyomaki Y, Sawamura D: Multiple Milia as an Isolated Skin Manifestation of Dominant Dystrophic Epidermolysis Bullosa: Evidence of Phenotypic Variability. *Pediatr Dermatol*. 査読有, 2017; 34(2):e106-e108. Doi: 10.1111/pde.13047.
3. Mizawa M, Makino T, Furukawa F, Torai R, Nakano H, Sawamura D, Shimizu T. The 6-year follow-up of a Japanese patient with silent erythropoietic protoporphyria. *JAAD Case Rep*. 査読有, 2017;3:169-171. Doi: 10.1016/j.jdcrr.2017.01.025.
4. Takadama S, Nakaminami H, Aoki S, Akashi M, Wajima T, Ikeda M, Mochida A, Shimoe F, Kimura K, Matsuzaki Y, Sawamura D, Inaba Y, Oishi T, Nemoto O, Baba N, Noguchi N. Prevalence of skin infections caused by Panton-Valentine leukocidin-positive methicillinresistant *Staphylococcus aureus* in Japan, particularly in

- Ishigaki, Okinawa. J Infect Chemother. 査読有, 2017;23:800-803.
Doi: 10.1016/j.jiac.2017.04.016.
5. Toyonaga E, Nishie W, Izumi K, Natsuga K, Ujiie H, Iwata H, Yamagami J, Hirako Y, Sawamura D, Fujimoto W, Shimizu H. C-Terminal Processing of Collagen XVII Induces Neopeptides for Linear IgA Dermatitis Autoantibodies. J Invest Dermatol. 査読有, 2017;137:2552-2559.
Doi: 10.1016/j.jid.2017.07.831.
 6. Akasaka E, Hagiwara C, Takiyoshi N, Aizu T, Nakano H, Sawamura D, Ota T: Elevated levels of circulating immunoglobulin E autoantibodies against BP180 and BP230 in an intractable case of bullous pemphigoid. J Dermatol Sci. 査読有, 2016;84(1):110-113.
Doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.07.011.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 澤村大輔:最近経験した遺伝性皮膚疾患、第 133 回山陰・第 29 回島根合同開催地方会、2017 年
2. Akasaka E, Matsui A, Sawamura D, Nakano H: Mutational analysis of porphyria in Japan. 8th Asia and Oceania Conference on Photobiology, 2017 年
3. Akasaka E, Nakano H, Sawamura D: Peripheral blood mononuclear cells may contain a small amount of mesenchymal stem cells which express type VII collagen. 17th World Dermatology Congress, 2017 年
4. 赤坂英二郎、高橋実か、原 憲司、是川 あゆ美、会津隆幸、中野 創、澤村大輔: 外科手術を契機に再燃し免疫グロブリン大量静注時に血小板減少をきたした水疱性類天疱瘡、第 39 回水疱症研究会、2017

年

5. Akasaka E, Nakano H, Sawamura D: Mutational analysis of dystrophic epidermolysis bullosa. The 13th International Congress of Human Genetics, 2016 年
6. 赤坂英二郎、中野 創、神田由紀、鷹木由里子、豊巻由香、澤村大輔: 栄養障害型表皮水疱症における末梢血単核球から分離した mRNA を用いた COL7A1 変異検索。第 23 回分子皮膚科学フォーラム、2016 年
7. 赤坂英二郎、中野 創、鷹木由里子、豊巻由香、澤村大輔: 稗粒腫を初発症状とし家系内で異なる臨床病型を呈した優性栄養障害型表皮水疱症の 1 家系例。第 115 回日本皮膚科学会総会、2016 年
8. 澤村大輔: 日常診療でみられる遺伝性皮膚疾患、遺伝子診断。第 6 回城南皮膚病カンファレンス、2016 年
9. 澤村大輔: 表皮水疱症の最近の話題。皮膚病態学アフェレシスフォーラム、2016 年
10. 澤村大輔: 遺伝性皮膚疾患のトピックス。皮膚科セミナー、2016 年
11. 赤坂英二郎、中野 創、神田由起、鷹木由里子、豊巻由香、澤村大輔: 栄養障害型表皮水疱症の遺伝子診断における末梢血単核球の型コラーゲン発現についての検討。第 38 回水疱症研究会、2016 年

〔図書〕(計 1 件)

1. 澤村大輔 他、診断と治療社、皮膚科研修ノート、2016 年、536-538 頁
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
澤村 大輔 (SAWAMURA, Daisuke)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 6 0 1 9 6 3 3 4
 - (2) 研究分担者
会津 隆幸 (AIZU, Takayuki)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 0 0 4 0 0 1 3 5

滝吉 典子 (TAKIYOSHI, Noriko)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30568895