

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006 年～ 2008 年

課題番号：18790543

研究課題名（和文）

酸化ストレスの精密測定システム確立に関する研究

研究課題名（英文）

Study on establishing the precise measurement system for oxidative stress

研究代表者

平野 綱彦 和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00382333

研究成果の概要：

まず高速液体クロマトグラフィー（HPLC）に電気化学検出（ECD）を組み合わせた方法を用いた喀痰中の蛋白結合 3-ニトロタイロシンの測定は窒素化ストレスの定量法として有益であり、気道・肺における窒素化ストレスの産生亢進が COPD の発症や進展に関与していることを示した。次に実際に人において窒素化ストレスの制御が COPD の気道炎症を改善すると仮定し、クロスオーバースタイルにて COPD 患者にテオフィリンを投与し、検討を行った。活性窒素種の測定に関して、上述の HPLC/ ECD 法による定量的な検討もあわせて行ったところ、テオフィリン投与群では、気道中の活性窒素種産生量が減少し、好中球性の気道炎症が抑制されることを見出し、同薬剤が COPD の新たな抗炎症薬となる可能性が示唆された。今後は本システムを用いて COPD の気道・肺炎症に関連する原因物質を特定し、その病的意義及び特異的に制御し得る薬剤の検証をすすめて、COPD の病態解明・治療効率の向上へ寄与できると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
18 年度	800,000	0	800,000
19 年度	1,200,000	0	1,200,000
20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器病学

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は主として喫煙に伴う慢性の気道・肺炎症が主病態であり、この病態形成機序のひとつとして、酸化・窒素化ストレスの関与が示唆されている。喫煙により産生される活性酸素・窒素種は一連の経路によりタイロシンのニトロ化を生じ、3-ニトロタイロシンが形成される。この 3-ニトロ

タイロシンは活性窒素種産生のバイオマーカーとして有用であることが報告されている。しかしながら、従来の方法では気道・肺において活性窒素種の産生量や生物活性を解析するには、半定量的であるという欠点があった。これに対して COPD の診断、治療、病態解明をすすめるためには、さらに精密な酸化・窒素化ストレスの定量システムの確立

は重要な課題である。

2. 研究の目的

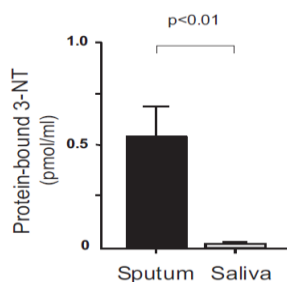
本研究の目的は気道・肺における酸化・窒素化ストレス関連物質の精密測定法のシステムを確立することである。

3. 研究の方法

具体的には、喫煙者および COPD 患者の誘発喀痰を用いて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に電気化学検出 (electrochemical detection; ECD) 法を組み合わせ、誘発喀痰上清中の蛋白結合 3-ニトロタイロシンの精密定量測定を行い、本定量検査法自体の妥当性を検証し、有用な酸化・窒素化ストレスの検出法としてのシステムを確立する。さらに、本定量検査法を応用して、COPD の気道・肺炎症を制御しうる有効な薬剤の検証や、疾患の経時的変化の把握としての有用性についても明らかにする。

4. 研究成果

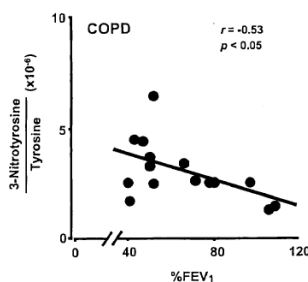
(1) 初年度において HPLC/ECD 法による 3-ニトロタイロシンの定量化のため標準曲線と検出感度を測定した結果 retention time は 13.5 分、検出感度は 10 fmol であり、1000fmol までの直線性も確認した。さらに、実際の検体の 3-ニトロタイロシン量も 100fmol まで、この標準曲線の範疇に入ることを確認した。同時に HPLC/ECD 法によるタイロシンの retention time が 5.35 分で、0.1~10 μ mol の範囲で標準曲線が作成できることを確認した。次に喀痰中の蛋白結合 3-ニトロタイロシン量測定に及ぼす唾液の影響を検討するため、COPD 患者の検体を用いて唾液中の 3-ニトロタイロシン量を HPLC/ECD 法により図 1 のとおりそれぞれ測定した。その結果、唾液の影響は僅少であり、気道・肺の窒素化ストレスマーカーとして喀痰中の蛋白結合 3-ニトロタイロシンの発現量を測定する妥当性を得た。



(図 1)

(2) COPD 患者、および呼吸機能正常喫煙者の誘発喀痰を採取し、HPLC/ECD 法により 3-ニトロタイロシンおよびタイロシンを測定した。その結果呼吸機能正常喫煙者に比較し、COPD 患者は有意に 3-ニトロタイロシン量および 3-ニトロタイロシン/タイロシン比が増大し、気道の閉塞性障害の程度と有意な逆相関を示した (図 2)。以上より HPLC/ECD 法を

用いた喀痰中の蛋白結合 3-ニトロタイロシン測定は窒素化ストレスの定量法として有益で、さらに気道・肺における窒素化ストレスの産生亢進が COPD の発症や進展に関与している可能性が示唆された。



(図 2)

(3)

次年度から最終年度にかけて (1) (2) の結果に基づいて、実際に人において窒素化ストレスの制御が COPD の気道炎症を改善すると仮定し、クロスオーバースタイルにて COPD 患者にテオフィリンを投与し、検討を行った。窒素化ストレスの測定に関して、誘発喀痰の細胞成分を用いた従来の免疫組織学的な検討に加え、喀痰の上清成分を用いた上述の HPLC/ECD 法による、定量的な検討もあわせて行った。さらに肺機能、気道の炎症性マーカーである IL-8 測定も合わせて施行した。エントリー数は 16 例で、テオフィリン投与により誘発喀痰中の炎症細胞数は有意に減少し、その減少した細胞の 8 割程度を好中球が占めていた (図 3)。その機序としてテオフィリンが IL-8 の減少を介して好中球性炎症を抑制しうると考えられた (図 4)。窒素化ストレスに対する効果については、まず免疫染色による検討を行い、テオフィリン投与により気道中のニトロタイロシン陽性細胞が減少すること、つまり、COPD 気道においてテオフィリンは窒素化ストレスを改善させる効果をもつことが示された (図 5)。次に本研究課題である酸化ストレスの精密測定システム (HPLC/ECD 法) を用いて、誘発喀痰上清中の蛋白結合 3-ニトロタイロシンの精密定量測定を加えた。その結果テオフィリン投与によりタイロシンに占める窒素化の比率が有意に減少していることが示され、精密な定量法においてもテオフィリンが窒素化ストレス改善効果を持つことを示し、またテオフィリンによる COPD 気道での窒素化ストレス減少程度は好中球浸潤抑制程度と相関し (図 6)、両者の因果関係が示唆され、同薬剤が COPD の新たな抗炎症薬となる可能性があると考えられた (図 7)。今後は本システムを用いて COPD の気道・肺炎症に関連する原因物質を特定し、その病的意義及び特異的に制御しうる薬剤の検証をすすめて、COPD の病態解明・治療効率の向上へ寄与

できると考えられる。

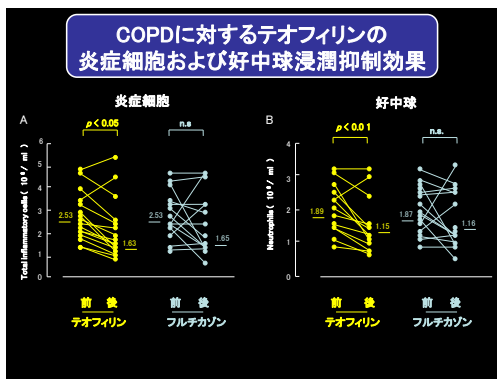


図 3

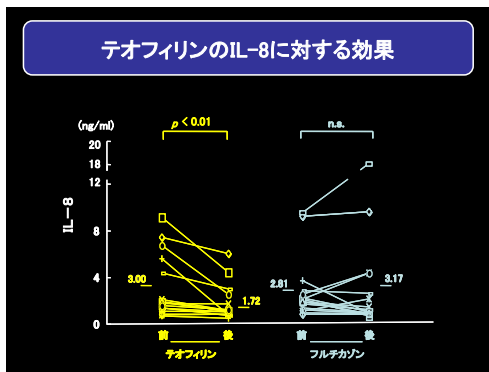


図 4

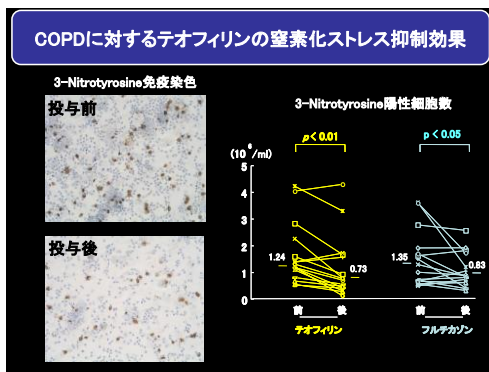


図 5

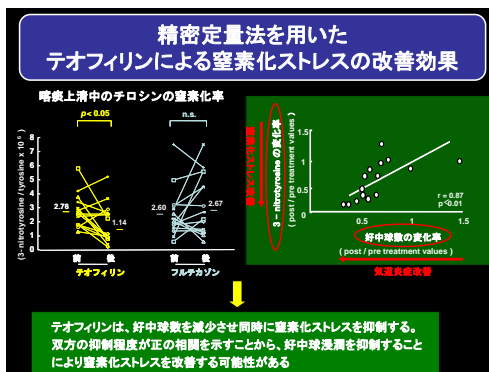


図 6

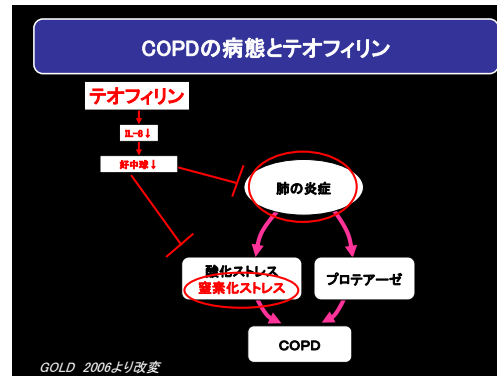


図 7

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① □ Minakata Y, Sugiura H, Yamagata T, Yanagisawa S, Ichikawa T, Koarai A, Akamatsu K, Hirano T, Matsunaga K, Ichinose M. : Prevalence of COPD in primary care clinics: correlation with non-respiratory diseases. *Internal medicine*. 47(2):77-82, 2008 査読有
- ② □ Yamagata T, Hirano T, Sugiura H, Yanagisawa S, Ichikawa T, Ueshima K, Akamatsu K, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M. Comparison of bronchodilatory properties of transdermal and inhaled long-acting beta(2)-agonists. *Pulm Pharmacol Ther*. 2008;21(1):160-5 査読有
- ③ □ K. Matsuaga, M. Kanda, A. Hayata, S. Yanagisawa, T. Ichikawa, K. Akamatsu, A. Koarai, T. Hirano, H. Sugiura, Y. Minakata, M. Ichinose. : Peak Expiratory Flow Variability Adjusted by Forced Expiratory Volume in One Second is a Good Index for Airway Responsiveness in Asthmatics. *Intern Med* 2008;47 : 1107-1112 査読有
- ④ □ T. Ichikawa, H. Sugiura, A. Koarai, S. Yanagisawa, M. Kanda, A. Hayata, K. Furukawa, K. Akamatsu, T. Hirano, M. Nakanishi, K. Matsunaga, Y. Minakata, M. Ichinose. Peroxynitrite augments fibroblast-mediated tissue remodeling via myofibroblast differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295 : 800-808 査読有
- ⑤ □ T. Yamagata, H. Sugiura, T. Yokoyama, S. Yanagisawa, T. Ichikawa, K. Ueshima, K. Akamatsu, T. Hirano, M. Nakanishi, Y. Yamagata, K. Matsunaga, Y. Minakata, M. Ichinose: Overexpression of CD-11b and CXCR1 on Circulating Neutrophils:

- Its Possible Role in COPD. *Chest* 132: 890-899, 2007 査読有
- ⑥□K. Akamatsu, T. Yamagata, T. Takahashi, K. Miura, S. Maeda, Y. Yamagata, T. Ichikawa, S. Yanagisawa, K. Ueshima, T. Hirano, M. Nakanishi, K. Matsunaga, Y. Minakata, M. Ichinose: Improvement of pulmonary function and dyspnea by tiotropium in COPD patients using a transdermal β_2 -agonist. *Pulm Pharm Ther* 20: 701-707, 2007 査読有
- ⑦□K. Ueshima, Y. Minakata, H. Sugiura, S. Yanagisawa, T. Ichikawa, K. Akamatsu, T. Hirano, M. Nakanishi, K. Matsunaga, T. Yamagata, M. Ichinose: The Influence of Free 3-Nitrotyrosine and Saliva on the Quantitative Analysis of Protein-Bound 3-Nitrotyrosine in Sputum. *Analytical Chemistry Insights* 1: 1-7, 2007 査読有
- ⑧□T. Ichikawa, K. Matsunaga, Y. Minakata, S. Yanagisawa, K. Ueshima, K. Akamatsu, T. Hirano, M. Nakanishi, H. Sugiura, T. Yamagata, M. Ichinose: Possible impact of salivary contamination on cytokine analysis in exhaled breath condensate. *Analytical Chemistry Insights* 2: 85-92, 2007 査読有
- ⑨□松永和人, 柳澤 悟, 市川朋宏, 上嶋千史, 赤松啓一郎, 平野綱彦, 中西正典, 山縣俊之, 南方良章, 一ノ瀬正和: 気管支喘息における呼気凝縮液中の炎症関連物質発現と呼吸生理パラメーターとの関連. *呼吸* 26: 2-4, 2007 査読有
- ⑩□T. Hirano, T. Yamagata, M. Gohda, Y. Yamagata, T. Ichikawa, S. Yanagisawa, K. Ueshima, K. Akamatsu, M. Nakanishi, K. Matsunaga, Y. Minakata, M. Ichikawa: Inhibition of reactive nitrogen species production in COPD airways: comparison of inhaled corticosteroid and oral theophylline. *Thorax* 61: 761-766, 2006 査読有
- ⑪□K. Matsunaga, S. Yanagisawa, T. Ichikawa, K. Ueshima, K. Akamatsu, T. Hirano, M. Nakanishi, T. Yamagata, Y. Minakata, M. Ichinose: Airway cytokine expression measured by means protein array in exhaled breath condensate: Correlation with physiologic properties in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 118: 84-90, 2006 査読有
- ⑫□K. Matsunaga, S. Yanagisawa, T. Ichikawa, K. Ueshima, K. Akamatsu, T. Hirano, M. Nakanishi, T. Yamagata, Y. Minakata, M. Ichinose: Two Cases of Asthma in Handicapped Elderly Persons in Which Assisted Inhalation Therapy Was Effective. *Allergology International* 55: 347-351, 2006 査読有
- ⑬□松永和人, 柳澤 悟, 市川朋宏, 上嶋千史, 赤松啓一郎, 平野綱彦, 中西正典, 山縣俊之, 南方良章, 一ノ瀬正和: 気道過敏性の簡便な臨床指標の検討. *呼吸* 25: 41-42, 2006 査読有
- ⑭□南方良章, 柳澤 悟, 市川朋宏, 上嶋千史, 赤松啓一郎, 平野綱彦, 中西正典, 松永和人, 山縣俊之, 一ノ瀬正和: COPD 気道における微小血管透過性亢進. *呼吸* 25: 45-46, 2006 査読有
- ⑮□郷田三賀子, 平野綱彦, 福井浩二, 山縣俊之, 山縣優子, 中西正典, 上嶋千史, 松永和人, 南方良章, 一ノ瀬正和: COPD 患者に対する新しいテオフィリンの効果の検討: 抗炎症作用とその機序. *和歌山医学* 57: 8-13, 2006 査読有
- [学会発表] (計4件)
- ① 平野綱彦: Inhibition of reactive nitrogen species production in COPD airway : comparison inhaled corticosteroid and oral theophylline. 第76回和歌山医学会総会(青洲賞受賞記念講演), 2008.07.06, 和歌山
- ② 平野綱彦: COPD における気道炎症と窒素化ストレス 第48回日本呼吸器学会学術講演会(シンポジウム), 神戸, 2008.06.15
- ③ 平野綱彦, 中西宏公, 池田剛司: 胸腔鏡で診断しえた悪性胸膜中皮種の2例. 第36回和歌山肺癌研究会, 2007.07.07, 和歌山
- ④ T. Hirano, S. Yanagisawa, T. Ichikawa, K. Ueshima, M. Nakanishi, K. Matsunaga, T. Yamagata, Y. Minakata, M. Ichinose: Comparison of Bronchodilator Property between Inhaled and Transdermal β_2 -Stimulants. 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, 2006.11.21, Kyoto, Japan
- [図書] (計3件)
- ① 平野綱彦, 一ノ瀬正和: COPD の病因と病態 中外医学社 : 108-15, 2008
- ② 平野綱彦, 一ノ瀬正和: 「血液検査, 喀痰検査, 呼気ガス検査」診断と治療 96 : 1067-1072, 2008
- ③ 平野綱彦, 一ノ瀬正和: 薬物療法の基礎知識 気管支拡張薬 22. 抗コリン薬の種類・使用法. 高齢者診療のツボ COPD. 福地義之助編, 日本医事新報社, p66-72, 2006

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 綱彦

和歌山県立医科大学医学部 助教

研究者番号：00382333

(2) 研究分担者

(なし)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(なし)

研究者番号：