

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：82690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08641

研究課題名(和文) 間質性肺炎患者における羽毛抽出抗原を用いた沈降抗体反応の陽性率とその特徴の解析

研究課題名(英文) Analysis of the positivity rate and characteristics of the precipitin antibody reaction using feather extract antigen in patients with interstitial pneumonia.

研究代表者

成本 治 (Narumoto, Osamu)

独立行政法人国立病院機構東京病院(臨床研究部)・臨床研究部・医長

研究者番号：20637011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性過敏性肺炎に関し、日本においては、厚生労働省びまん性肺疾患研究班から鳥関連過敏性肺炎が最も多いことが報告されている。近年普及が著しい羽毛布団による過敏性肺炎は相当数存在することが疑われるものの、今まではハト糞由来のタンパク質で検査がされている実情があった。過敏性肺炎の強く疑われる患者に対して羽毛業者から直接取り寄せた羽毛から直接抽出した抗原を用いて沈降抗体反応陽性であるがハト糞抽出抗原の沈降抗体反応は陰性である患者を多く認め、未知のタンパク質への反応が疑われたため、当院ではそのたんぱく質の同定を試み、Selenium binding protein 1を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過敏性肺炎は上述の通り診断が難しい疾患である。過敏性肺炎の中では鳥関連が最も多いと厚生労働省びまん性肺疾患研究班から報告されている。鳥関連の抗原の暴露の機会、現代では羽毛が最も多いと推測される。しかしながら羽毛布団に使用されるダックやグースからの羽毛からの直接抗原の抽出は、既に洗浄済みの羽毛からはごく少量しか取れず、代わりにハト糞からの抽出抗原が使用されてきた。しかし、ダックの羽毛からの抽出抗原とハト糞からの抽出抗原では一部の患者において反応性が異なっていた。この研究の結果は羽毛布団に関連した過敏性肺炎患者の診断の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Chronic hypersensitivity pneumonitis is a difficult disease to diagnose. In Japan, it has been reported that bird-related hypersensitivity pneumonitis is the most common form. Although it is suspected that there is a considerable number of cases of hypersensitivity pneumonitis caused by the increasingly popular down feather duvets, until now, testing has been conducted for proteins derived from pigeon droppings. In many patients strongly suspected of having hypersensitivity pneumonitis, a direct extraction antigen from feather duvet was used to perform the precipitin antibody reaction, which yielded positive results. However, the precipitin antibody reaction using pigeon droppings extraction antigen was often negative in these patients. Due to the suspicion of a reaction to an unknown protein, our hospital attempted to identify that protein and identified Selenium binding protein 1.

研究分野：Respiratory medicine

キーワード：過敏性肺炎 羽毛 Selenium Binding protein 沈降抗体 間質性肺炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特定の吸入抗原に対する III 型および IV 型アレルギー反応で起こる過敏性肺炎は診断が非常に難しい疾患である。なかでも慢性の経過をとる慢性過敏性肺炎は、画像所見において特発性間質性肺炎との鑑別が困難であり、慢性進行性であることから環境の隔離や暴露による変化も目立って呈さないことも多く、診断が極めて難しい。日本においては、2000 年～2009 年の厚生労働省びまん性肺疾患研究班からの報告で鳥関連過敏性肺炎 (Bird-Related Hypersensitivity Pneumonitis: BRHP) が過敏性肺炎の 6 割程度を占めることが報告されており (びまん性肺疾患研究班研究報告書、厚生科学研究特定疾患対策研究事業びまん性肺疾患研究班)、鳥関連の過敏性肺炎は非常に重要である。特に、近年普及がめざましい羽毛による過敏性肺炎は潜在的に相当数存在することが疑われるものの、鳥関連抗体の測定は 2021 年 6 月まで保険収載されておらず、診断が困難であった。慢性的な経過の多い鳥関連過敏性肺炎のかなりの割合が特発性間質性肺炎として診断、治療されている可能性がある。(Lancet Respir Med. 2013. 1(9):685)。

そこで、BRHP の実態を明らかにすることを目的として、2017 年 4 月より 2018 年 3 月において予備検討を行った。国立病院機構東京病院に通院中の間質性肺炎患者のうち、胸部 CT 画像上粒状影、地図状の分布を示す患者や、非典型的な画像を示す症例の一部、合計 22 例において羽毛業者から直接取り寄せたダックの羽毛から我々が研究室で直接抽出した抗原を用いて沈降抗体反応を行った。その結果として 2 つの興味深い結果を得た。

まず一点は 22 例中 6 例 (27.3%) が羽毛抽出抗原に対して沈降抗体反応陽性を示し、当初予想していたよりもずっと多くの患者が陽性であった。

2 点目は、一般的に鳥抗原の検査はハトやインコ由来の抗原で検査が行われることが多いが、ダック (アヒル) またはグース (ガチョウ) 由来の羽毛から直接抽出した抗原の沈降抗体反応が陽性であった患者 6 例のうち、ハト糞・インコの糞からの抽出抗原の沈降抗体反応陰性である患者が 2 例あり、現在知られていない抗原に反応している患者が一定数いる可能性が考えられた。上記の結果から、過敏性肺炎患者は現在特発性間質性肺炎あるいは原因の分からない過敏性肺炎として治療されているダックの羽毛由来の抗原による過敏性肺炎患者がそれなりに存在する可能性を考え、本研究を行うこととした。

2. 研究の目的

羽毛製品の普及は目覚ましく、この数十年で利用者が増加傾向にあることは明らかである。今回、予備検討により羽毛に過敏性肺炎の抗原となる因子が含まれ、それが従来の鳥由来抗原とは異なる可能性があることから、近年の間質性肺炎増加の一部に特に羽毛の中に含まれる新規抗原による過敏性肺炎が存在する可能性があることを仮定した。そこで、本研究は、羽毛に含まれる抗原による過敏性肺炎の実態を明らかにし、その原因抗原を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 羽毛からの抗原抽出

布団の原料である羽毛をガラスビーカーに入れ、ジエチルエーテル (富士フィルム和光純薬) を加え、5 分間静置後エーテル部分を除去する操作を 3 回繰り返した。ビーカー内の羽毛を一晩かけて乾燥させた後、滅菌精製水に浸し、24 時間ローターで攪拌し、抗原を抽出した。さらに濃縮するため、凍結乾燥させ、得られたパウダーを少量の PBS で再溶解した。

また、二次元泳動のサンプルとして用いるため、Ez Apply 2D Kit solution2(ATTO)で抽出を行った。

(2)沈降抗体検査

患者血清および濃縮した羽毛抗原液を Double Diffusion Plates (Microgen Bioproducts)に加え、7日後まで沈降線の有無を確認した。

(3)ウエスタンブロット

ハト糞および羽毛抽出抗原を SDS 化、還元熱処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。セミドライ式の Pierce Power Blotter および Pierce 1-Step Transfer buffer(Thermo fisher)を用いて、PVDF メンブレンに転写した。Immobilon Block-CH で 1,000 倍希釈した患者血清と反応させ、10,000 倍希釈した anti IgG-HRP(BETHYL)で標識後化学発光し、Amersham Imager 600(GE Healthcare Japan)で撮影した。

(4)二次元電気泳動

Ez Apply 2D Kit solution2 で抽出したタンパク質をアガーゲル(ATTO)で等電点電気泳動した。等電点電気泳動したゲルを SDS 平衡化し、二次元電気泳動用ゲル e-PAGEL (5-20%) (ATTO)を用いて SDS-PAGE をおこなった。セミドライ式で PVDF メンブレンに転写した。Immobilon Block-CH で 1,000 倍希釈した患者血清と反応させ、10,000 倍希釈した anti IgG-HRP(BETHYL)で標識後化学発光し、Amersham Imager 600(GE Healthcare Japan)で撮影した。

(5)質量分析

二次元電気泳動した e-PAGEL を Q-stain (日本ジェネティクス)で染色し、患者血清と反応した部分と同じ位置のバンドを切り出し、質量同定分析(MALDI-TOF/TOF ,GENOMINE, Inc.)を行った。Flexanalysis biotool mascot により NCBI nr DB において Mascot Search を行い、候補となるタンパク質を検索した。

(6) リコンビナントタンパク質作成

リコンビナントタンパク質の作製は、ジェンスクリプトジャパンに依頼した。NCBI データベースに記載されている *Anas platyrhynchos* 由来の Selenium-binding protein 1(SBP1)の遺伝子配列(Accession No. EOA96215)および Serum albumin の遺伝子配列(Accession No. NP_001297323)を参照し、大腸菌発現系を用いて、発現・精製を行った。

(7)ELISA によるリコンビナントタンパク質に対する血清 IgG 抗体価の測定

Carbonate-Bicarbonate Buffer(SIGMA)で希釈したリコンビナントタンパク質を 96well マイクロプレート(Corning)にコーティングし、4 で一晩インキュベートした。0.1% Tween20/PBS で洗浄した後、ChonBlock Blocking/Sample Dilution Buffer (chondrex)でブロッキングを行った。ChonBlock Blocking/Sample Dilution Buffer で 20 倍希釈した患者血清を加え、37 で 60 分インキュベートした。ChonBlock Detection Antibody Dilution Buffer で 100,000 倍希釈した anti IgG-HRP を加え、37 で 60 分インキュベートした。TMB(Surmodics)を加えて 6 分間室温で発色させ、2N 硫酸を加え、発色反応を停止させた。主波長 450nm、副波長 570nm をマイクロプレートリーダー(Biorad)で測定した。リコンビナントタンパク質をコーティングしたウェ

ルの吸光度からリコンビナントタンパク質をコーティングしていないウェルの吸光度を引いた。

4. 研究成果

(1) 鳥関連抗原に対する沈降抗体検査

当院に 2017 年 4 月～2021 年 4 月に受診した鳥関連過敏性肺炎の可能性を疑う患者（夏型過敏性肺炎や加湿器等明らかに原因が判明している患者は除く）254 名の患者血清において羽毛業者から直接取り寄せたダック羽毛から抽出した抗原あるいはハト糞抗原抽出液を用いて沈降抗体反応を行った結果 254 例中 75 例が陽性を示した。ダック羽毛抽出抗原が陽性であったのは 67 名であり、ハト糞抽出抗原の沈降抗体反応陽性である患者は 19 例であった

75 名の患者について、ATS/JRS/ALAT 公式臨床診療ガイドラインにおける、画像検査の組み入れ、曝露評価、BAL リンパ球の増加、病理組織学的所見に基づく過敏性肺炎の診断(表 1)に基づいて、過敏性肺炎の確信度を分類を行った。HRCT、リンパ球の増加(20%をカットオフに使用)組織学的所見から分類を行った(表 2)。病理検査がない症例は 24/74 (32.4%)であった。

Table 1 表 2 ATS/JRS/ALAT 公式臨床診療ガイドラインに基づく過敏性肺炎の確信度分類

確信度	確定的	高い	中程度	低い	除外されず
ハト糞のみ陽性	5	0	0	1	2
羽毛のみ陽性	17	6	13	9	11
両方陽性	3	1	4	2	1

(2) ウエスタンブロット

ハト糞抽出物・羽毛抽出物を泳動・転写後、確定的と考えられる患者の血清と反応させ、HRP 標識付きの抗 IgG 抗体を二次抗体として作用させ、ハト糞、羽毛抽出物それぞれに反応しているタンパク質を検出した。羽毛のみ陽性であった患者 17 人にいくつか共通するバンドを認めた。特に 6 人に共通して 50-60kDa の間にバンドを認めた(Fig1)。また、一部では 60～80kDa 付近にもバンドが検出された。30kDa 以下のバンドは健常人でも検出されたため、50～60kDa および 60～80kDa のバンドに着目した。

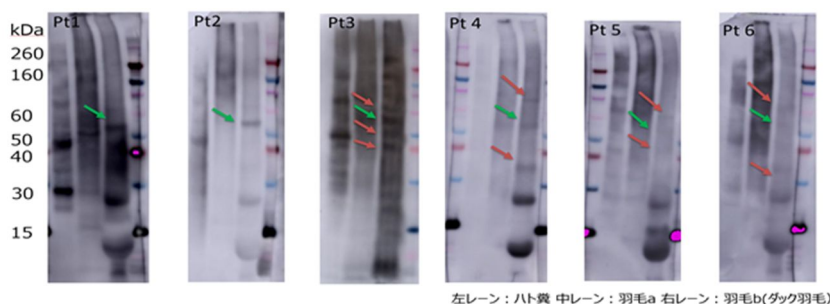


Fig. 1 ハト糞、および羽毛のウエスタンブロット

(3) 二次元電気泳動

通常の電気泳動では、1本のバンドの中に同じサイズのタンパクが数種類混在している可能性も考えられたため、二次元電気泳動を行い、さらにタンパクを分離することにした。

抽出した羽毛抗原を泳動し、PVDF メンブレンに転写した後、先に行ったウエスタンブロットでバンドが検出された患者血清と反応させたところ、50kDa 付近および 70kDa 付近にバンドが検出された(Fig.2)。このバンドを切り出し、質量同定分析(MALDI-TOF/TOF, GENOMINE, Inc.)

を行った。Flexanalysis biotool mascot により NCBI nr DB において Mascot Search を行い、候補となるタンパク質を検索した。Mascot 分析の結果、54.5kDa の Selenium-Binding Protein 1 (Anas platyrhynchos) と 68.5kDa の Serum albumin(Anas platyrhynchos)が候補として挙げられた。

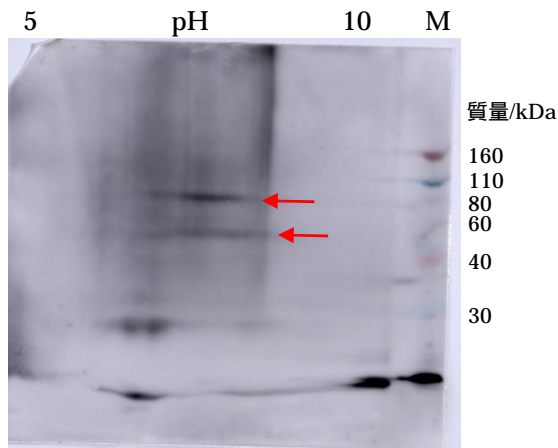


Fig. 2 羽毛抗原の二次元電気泳動

(4)ELISA 法によるリコンビナントタンパク質に対する血清中の特異的 IgG 抗体価の測定
SBP1 および Serum albumin が患者血清中の IgG と特異的に結合するか確認するため、ELISA 法を用いて検証を行った。BRHP 患者が疑われる患者 74 名、健常者 18 名で比較した。SBP1 に対しては、BRHP 患者群が健常者群よりも優位に高い抗体価を示した(Fig.3 a)。Serum albumin でも、有意な差は認められなかったものの、BRHP 患者群で高い傾向が見られた(Fig.3 b)。

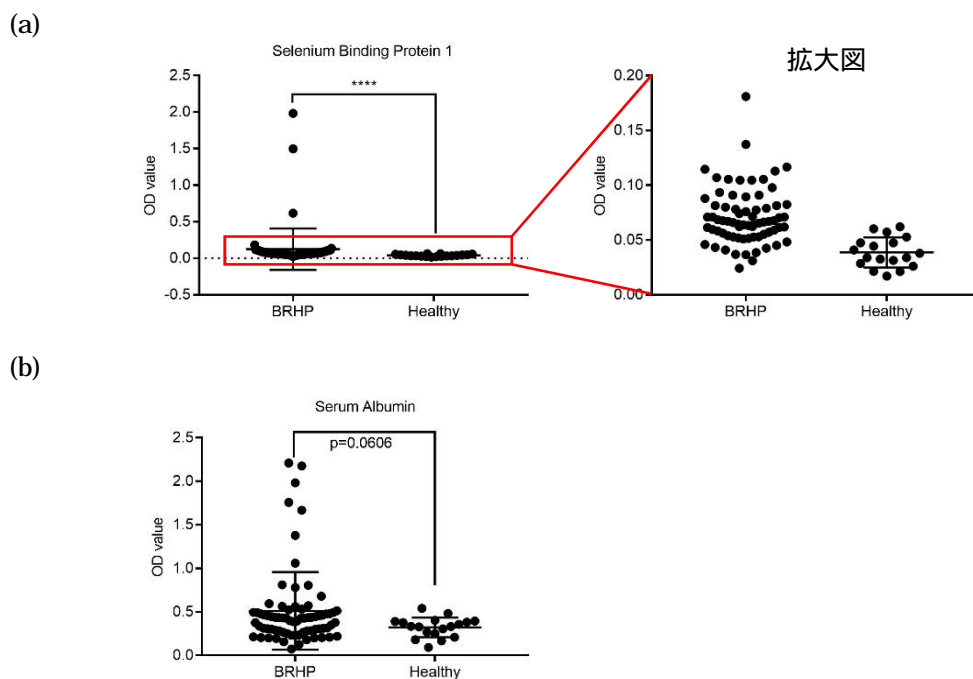


Fig. 3 ELISA 法によるリコンビナントタンパク質に対する血清中の特異的 IgG 抗体価の測定

(5) まとめ

SBP1 に関しては有意差があり、BRHP の抗原として可能性が高いと考えられる。今後 IPF 及び CTD-ILD 患者において上昇していないことを確認できれば BRHP の特異的タンパク質の候補として報告する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本橋 巧 成本 治 佐藤 亮太 田下 浩之 鈴川 真穂 守尾 嘉晃 赤川志のぶ 永井 英明 松井 弘稔
2. 発表標題 過敏性肺炎における沈降抗体反応の検討
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 五十嵐彩夏、鈴川真穂、瀬戸美也子、浅里功、成本治、田下浩之、古川宏、大田健
2. 発表標題 二次元電気泳動を利用した鳥関連過敏性肺炎の抗原同定の試み
3. 学会等名 国立病院総合医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------